



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE
AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS



MATHEUS JUAN ALARCON SAMPAIO

**Diversidade genética, filogeografia e taxonomia de cladóceros
(Crustacea, Branchiopoda) em uma planície de inundação
Neotropical, Brasil**

Maringá
2025

MATHEUS JUAN ALARCON SAMPAIO

**Diversidade genética, filogeografia e taxonomia de cladóceros
(Crustacea, Branchiopoda) em uma planície de inundação
Neotropical, Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Limnologia. Área de concentração: Ecologia e Limnologia.

Orientadora: Dr.^a Cláudia Costa Bonecker
Coorientador: Prof. Dr. Francisco Diogo Rocha Sousa

Maringá
2025

"Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)"
(Biblioteca Setorial - UEM. Nupélia, Maringá, PR, Brasil)

S192d Sampaio, Matheus Juan Alarcon, 1999-
Diversidade genética, filogeografia e taxonomia de cladóceros (Crustacea, Branchiopoda) em uma planície de inundação Neotropical, Brasil / Matheus Juan Alarcon Sampaio. -- Maringá, 2025.
93 f. : il. (algumas color.).

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais)--
Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2025.
Orientadora: Dr.^a Cláudia Costa Bonecker.
Coorientador: Prof. Dr. Francisco Diogo Rocha Sousa.

1. Cladocera (Crustacea, Branchiopoda) – Taxonomia integrativa - DNA *barcoding* - Planície de inundação - Alto rio Paraná. 2. Cladocera (Crustacea, Branchiopoda) - Descrição de espécie - Planície de inundação - Alto rio Paraná. 3. Cladocera (Crustacea, Branchiopoda) - Biodiversidade - Filogeografia - Planície de inundação - Alto rio Paraná. I. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

CDD 23. ed. -595.321309816

MATHEUS JUAN ALARCON SAMPAIO

**Diversidade genética, filogeografia e taxonomia de cladóceros
(Crustacea, Branchiopoda) em uma planície de inundação
Neotropical, Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Limnologia e aprovada pela Banca Examinadora composta pelos membros:

BANCA EXAMINADORA

Dr.^a Claudia Costa Bonecker
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof.^a Dr.^a Lourdes Maria Abdu Elmoor-Loureiro
Universidade Federal de Jataí (UFJ)

Dr. Jonathan da Rosa
Universidade Estadual de Maringá (Pós-Doutorando PEA/UEM)

Aprovada em: 23 de junho de 2025.

Local de defesa: Anfiteatro Prof. “Keshiyu Nakatani”, Nupélia, Bloco G-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

Dedico este trabalho a todos que estiveram comigo nesta jornada.

AGRADECIMENTO

Acima de qualquer coisa, eu sou extremamente grato por pertencer a uma família que sempre me apoiou e continua apoiando os meus sonhos e as minhas escolhas, permitindo que eu seja feliz fazendo exatamente o que eu gosto de fazer. A minha mãe, Rosana, é a pessoa que eu mais admiro na minha vida, sendo, acima de tudo, minha melhor amiga e companheira. O meu pai, Nait, sempre me ensinou que apesar dos grandes problemas da vida, a gente não pode perder o nosso sorriso e devemos sempre seguir em frente. Aos meus irmãos, Rafael e Adrielle, eu sou extremamente grato por tudo, pois se hoje eu estou realizando esta grande conquista, ela também pertence a vocês.

Claro que eu não poderia deixar de citar os meus amigos de Fernandópolis, que cresceram junto comigo e sempre estiveram do meu lado, independente do momento da vida. Apesar de ter mudado pra bem longe (algumas vezes), quando eu volto, é como se nada tivesse mudado e eu sou muito grato por isso. Marcius, Leonardo, Perseu, Joãozinho, Felipe, Matheus (SOS), Siqueira, Yasmin, Diego, Ednei e Andressa, obrigado por tudo!

Uma das maiores aventuras da minha vida, foi ter me mudado para o Mato Grosso do Sul para cursar biologia, 700km de casa, em um estado e uma cidade que eu não conhecia ninguém e estava sozinho. Mas eu não tinha ideia do quão pouco isso iria durar. Logo de início eu conheci a trevosa (Karol), uma das pessoas mais incríveis que eu já conheci, além de ser uma amiga pra qualquer hora, desde fazer coletas no sol quente do MS até ajudar em mudança. Obrigado por tudo!

Quando cheguei em Maringá, para fazer o mestrado, o sentimento foi o mesmo. Não conhecia ninguém e não tinha ideia de como seria. No entanto, tive uma grande surpresa, conheci pessoas incríveis nesta jornada e quero levar todas elas para o resto da minha vida. Claro que não poderia deixar de citar diretamente duas pessoas que me deram forças não sei nem quantas vezes. A Andressa e a Gabi foram peças fundamentais para a realização deste trabalho e para a manutenção da minha sanidade. Obrigado por estarem na minha vida.

Quero agradecer todas as pessoas que estiveram envolvidas diretamente neste trabalho. A minha orientadora, Claudinha, é uma das pessoas mais incríveis que eu já conheci, não só profissionalmente falando, mas como humana. Sempre cuidou muito de mim e me ensinou muito durante esse processo de construção e, acho que nunca vou

conseguir demonstrar o quanto sou grato por tudo isso. A Alessandra, que disponibilizou o seu laboratório de genética e aceitou de imediato a nossa parceria, sou muito grato, sem você esse trabalho não seria possível. A Mayara, que eu não sei nem por onde começar, mesmo quando estava na correria da sua qualificação de doutorado e, ao mesmo tempo, arrumando as mala e documentos para viajar pra Espanha, não deixou de me ajudar nem por um segundo. Seu espírito alegre, disposição e conhecimento me ajudaram muito, obrigado por tudo isso. Ao Diogo, um grande amigo, sou extremamente grato por ter dedicado tanto o seu tempo (e provavelmente muita paciência kkkk) para me ensinar sobre taxonomia. A sua paixão pelos cladóceros foi, sem dúvidas, uma das grandes motivações que tive para seguir com este trabalho. Obrigado por tudo!

Gostaria de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento da bolsa de pesquisa durante os dois anos de duração do Mestrado.

Gostaria de agradecer a todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA), do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura e da Universidade Estadual de Maringá, sem vocês nada disso seria possível.

Um agradecimento a Salete e João da Biblioteca Setorial do Nupélia por sempre estarem disponíveis quando precisamos de algo.

E um agradecimento mais que especial para a Bete, secretária do PEA, por sempre facilitar a nossa vida, além das longas e maravilhosas conversas que funcionam como uma terapia. Obrigado por tudo!

“Você pode saber o nome de um pássaro em todas as línguas do mundo, mas no fim das contas, você não saberá absolutamente nada sobre o que quer que seja o pássaro. Então, vamos observar o pássaro e ver o que ele faz...”

(RICHARD FEYNMAN)

Diversidade genética, filogeografia e taxonomia de cladóceros (Crustacea, Branchiopoda) em uma planície de inundação Neotropical, Brasil

RESUMO

A biodiversidade desempenha um papel fundamental na manutenção dos ecossistemas, conferindo maior resistência e resiliência a impactos externos, além de garantir uma gama de serviços ecossistêmicos essenciais. Nos ambientes de água doce, os cladóceros se destacam como filtradores muito eficientes, com uma função crucial na teia trófica ao intermediar a transferência de matéria e o fluxo de energia entre os produtores primários e os níveis tróficos superiores. Investigou-se a diversidade genética de *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981 e *Moina minuta* Hansen, 1899, que ocorrem na planície de inundação do alto rio Paraná, utilizando o fragmento do gene mitocondrial Citocromo *c* Oxidase subunidade I (*COI*). Os resultados foram usados para comparação com sequências disponíveis nos bancos de dados BOLD Systems Versão 4 e GenBank®. Utilizando o método de máxima verossimilhança (modelo HKY + G4) para construção de cladogramas e o software Hapsolutely com o algoritmo *median-joining* para redes de haplótipos, observou-se que populações brasileiras de *D. birgei* não apresentaram divergência genética significativa entre si. No entanto, as sequências provenientes da região Neártica mostram variações genéticas significativas entre os ambientes em que ocorrem e estão geneticamente distantes do haplótipo brasileiro, sugerindo que *D. birgei* constitui um complexo de espécies. A partir deste resultado, uma análise morfológica e uma análise de sobreposição de nicho climático foram conduzidas, culminando na descrição de *Diaphanosoma* sp. nov., uma nova espécie para a região Neotropical dentro do complexo de *D. birgei*. Os cladogramas indicaram que os espécimes brasileiros de *Diaphanosoma* sp. nov. formaram um grupo irmão com *D. cf. heberti*, distanciando-se geneticamente dos exemplares do hemisfério norte. Para *M. minuta*, sem registros de sequências disponíveis para comparação nos bancos de dados, o indivíduo encontrado na lagoa Fechada e sequenciado apresentou grande distância genética em relação a outras espécies do gênero, variando de 13,9 a 21,1%. Os resultados evidenciaram uma diferenciação genética marcante entre os cladóceros sequenciados no Brasil e as sequências disponíveis globalmente, com enfoque no velho mundo. Isso indicou uma nova perspectiva sobre o processo evolutivo do gênero *Moina*. Essas descobertas reforçam a necessidade de mais estudos moleculares e de medidas de conservação para preservar a diversidade genética desses organismos de importância ecológica para ciclagem de nutrientes no ambiente aquático.

Palavras-chave: Complexo de espécies; biodiversidade; escala especial; DNA barcoding; morfologia.

Genetic diversity, phylogeography, and taxonomy of cladocerans (Crustacea, Branchiopoda) in a Neotropical floodplain, Brazil

ABSTRACT

Biodiversity plays a fundamental role in maintaining ecosystems, providing greater resistance and resilience to external impacts, in addition to ensuring a wide range of essential ecosystem services. In freshwater environments, cladocerans stand out as highly efficient filter feeders, playing a crucial role in the food web by mediating the transfer of matter and energy from primary producers to higher trophic levels. In this study, the genetic diversity of *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981 and *Moina minuta* Hansen, 1899, which occur in the Upper Paraná River floodplain, was investigated using a fragment of the mitochondrial gene Cytochrome c Oxidase subunit I (COI). The results were used for comparison with sequences available in the BOLD Systems Version 4 and GenBank® databases. Using the maximum likelihood method (HKY + G4 model) for cladogram construction and the Hapsolutely software with the median-joining algorithm for haplotype networks, it was observed that Brazilian populations of *D. birgei* did not show significant genetic divergence among themselves. However, sequences from the Nearctic region exhibited significant genetic variation among the environments in which they occur and are genetically distant from the Brazilian haplotype, suggesting that *D. birgei* constitutes a species complex. Based on this result, a morphological analysis and a climatic niche overlap analysis were conducted, culminating in the description of *Diaphanosoma* sp. nov., a new species for the Neotropical region within the *D. birgei* complex. The cladograms indicated that the Brazilian specimens of *Diaphanosoma* sp. nov. formed a sister group with *D. cf. heberti*, showing genetic divergence from Northern Hemisphere specimens. For *M. minuta*, which has no available sequence records for comparison in the databases, the individual found and sequenced from the Fechada lagoon showed a large genetic distance from other species of the genus, ranging from 13.9 to 21.1%. The results revealed a marked genetic differentiation between the cladocerans sequenced in Brazil and those available globally, with an emphasis on Old World records. This indicated a new perspective on the evolutionary process of the genus *Moina*. These findings reinforce the need for further molecular studies and conservation measures to preserve the genetic diversity of these ecologically important organisms.

Keywords: species complex; biodiversity; spatial scale; DNA barcoding; morphology.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas *Zoological Journal of the Linnean Society* e *Hydrobiologia*.

Disponíveis em:

https://academic.oup.com/zoolinnea/pages/General_Instructions<

<https://link.springer.com/journal/10750/submission-guidelines>>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
REFERÊNCIAS	16
2 UMA NOVA ESPÉCIE NEOTROPICAL DESCRITA A PARTIR DO COMPLEXO <i>Diaphanosoma birgei</i> Korinek, 1981 (Cladocera: Sididae) POR MEIO DA TAXONOMIA INTEGRATIVA	19
ABSTRACT	20
2.1 Introdução	21
2.2 Material e métodos	23
2.2.1 Área de estudo.....	23
2.2.2 Delineamento de amostragem.....	23
2.2.3 Amostragem, identificação e análise taxonômica.....	24
2.2.4 Caracterização das condições ambientais.....	26
2.2.5 Extração, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento.....	27
2.2.6 Análise dos dados.....	28
2.2.7 Sobreposição de nicho climático.....	29
2.2.8 Variáveis ambientais.....	30
2.2.9 Análise de componentes principais (PCA).....	31
2.3 Resultados	31
2.3.1 Análise molecular.....	32
2.4 Sobreposição de nicho climático	33
2.5 Sistemática	34
2.6 Discussão	48
2.7 Conclusão	53
2.8 APÊNDICE A - Código de acesso genético	53
REFERÊNCIAS	56
3 POSIÇÃO FILOGENÉTICA DE <i>Moina minuta</i> Hansen, 1899 (Crustacea: Moinidae) SUGERE A NÃO VALIDADE DO GÊNERO <i>Exomoina</i>	62
ABSTRACT	63
3.1 Introdução	64
3.2 Material e métodos	66

3.2.1 Área de estudo.....	66
3.2.2 Delineamento de amostragem.....	66
3.2.3 Amostragem, identificação e análise taxonômica.....	67
3.2.4 Extração, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento.....	68
3.2.5 Análise dos dados.....	69
3.3 Resultados.....	69
3.3.1 Sistemática.....	71
3.4 Discussão.....	80
3.5 Conclusão.....	83
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
APÊNDICE B – Código de acesso genético.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
NOTA INFORMATIVA COMPLEMENTAR – Lista de artigos publicados, submetidos e trabalhos apresentados em eventos durante o Mestrado.....	91

1 INTRODUÇÃO GERAL

O planeta Terra é composto por distintas regiões morfoclimáticas com características únicas (Tricart, Cailleux, 1972), resultando em uma distribuição desigual das espécies ao redor do globo, com maior concentração nas áreas tropicais (Gaston, 2000). A biodiversidade, além de seu valor intrínseco no funcionamento do ecossistema (Plas, 2019), exerce um papel fundamental na resiliência e resistência ambiental, contribuindo para a mitigação dos impactos antrópicos (Hong et al., 2021). Essa resistência e resiliência favorecem a disponibilidade e a manutenção de serviços ecossistêmicos (Isbell et al., 2017), como a pesca.

As contínuas transformações ambientais impulsionadas pelo avanço industrial, usos diversificados do solo (Newbold et al., 2015), introdução de espécies exóticas (Murphy, Romanuk, 2014; Briski et al., 2023) e alterações nos padrões climáticos (Northrup et al., 2019; Newbold et al., 2020) têm feito dos impactos antrópicos a principal causa da redução da biodiversidade. No entanto, as medidas implementadas para mitigar esses impactos ainda são insuficientes, em grande parte, devido à falta de um entendimento abrangente sobre a biodiversidade, incluindo sua diversidade genética e funcional (Pollock et al., 2017; Díaz et al., 2020).

Cladóceros, microcrutáceos frequentemente encontrados em elevada diversidade de espécies em ambientes de água doce, desempenham um papel ecológico crucial devido à sua capacidade de exercer pressão de pastagem sobre o fitoplâncton (Allan, 1976), o que confere a eles uma significativa importância econômica indireta pela sua função na rede trófica (Forró et al., 2008). No Brasil, os estudos ecológicos e taxonômicos sobre a biodiversidade desses organismos se destacam como os mais representativos entre os organismos planctônicos (Castilho-Noll et al., 2023). No entanto, há um grande déficit no conhecimento genético desses microcrustáceos (Elmoor-Loureiro et al., 2023).

Com o advento da taxonomia integrada a dados moleculares, a ocorrência de espécies crípticas em diferentes grupos zooplancônicos, que já era anteriormente relatada em estudos que utilizaram dados morfológicos, se tornou ainda mais evidente, revelando que espécies anteriormente classificadas como cosmopolitas eram, na verdade, um conjunto de espécies morfológicamente semelhantes, mas geograficamente isoladas (Elías-Gutiérrez, Valdez-Moreno, 2008), mostrando que a biodiversidade de cladóceros pode estar subestimada.

Com o uso da taxonomia integrativa, a sistemática da Superordem Cladocera Latreille, 1829 tem recebido novas abordagens, embora ainda existam grandes lacunas no conhecimento (Elías-Gutiérrez & Valdez-Moreno, 2008). Essas abordagens têm contribuído significativamente para reduzir os chamados “*shortfalls*” ou lacunas do conhecimento biológico, como os taxonômicos (Lineano), de distribuição (Wallaceano) e de processos evolutivos (Darwiniano) (Hortal et al., 2015). Aliadas à construção de árvores filogenéticas e à aplicação de métricas de distância genética, tais abordagens permitiram a separação e realocação de diversos complexos de espécies, como observado nos gêneros *Moina* Baird, 1850, *Diaphanosoma* Fischer, 1850 e na família Chydoridae Dybowski & Grochowski, 1894 (Bekker et al., 2016; Liu et al., 2018; Makino et al., 2023). Para a realização da taxonomia molecular, juntamente com os estudos descritivos morfológicos, a região da subunidade I do citocromo c oxidase (COI) é a mais utilizada nos estudos com cladóceros, e é capaz de agrupar ou separar espécies em nível de gênero ou família (Prosser et al., 2013; Bekker et al., 2016; Eliaz-Gutierrez et al., 2018; Liu et al., 2018; Dumont et al., 2021; Makino et al., 2023). Essa análise é uma ferramenta atual, extremamente efetiva e confiável, que deve acompanhar os processos de descrições e identificações taxonômicas (Hebert et al., 2003).

Cerca de 24% das espécies conhecidas de cladóceros de água doce do mundo ocorrem no Brasil (Elmoor-Loureiro et al., 2023; Elmoor-Loureiro, Sousa, 2023), sendo 63% registradas na planície de inundação do Alto rio Paraná (Bonecker et al., 2020). Essa região é caracterizada pela dinâmica dos pulsos de inundação (Junk et al., 1989) que promove uma alta conectividade entre os ambientes aquáticos e reduz as taxas de extinção das comunidades planctônicas, causadas por alterações locais (Thomaz et al., 2004). Como foi demonstrado por Bonecker et al. (2013), os cladóceros possuem uma diversidade alfa constante neste ecossistema e influenciam positivamente a diversidade beta, indicando um maior efeito dos processos ambientais locais sobre esse grupo a nível regional. A planície de inundação do Alto rio Paraná, que inclui o último trecho livre de barramento deste rio, é a área com o maior número de estudos sobre a comunidade zooplanctônica no Brasil (Castilho-Noll et al., 2023), principalmente pela presença do projeto Pesquisa Ecológica de Longa Duração (PELD/CNPq): A planície de inundação do alto rio Paraná (PELD-PIAP) (Silva et al., 2024). Apesar do amplo conhecimento da biodiversidade de cladóceros, a variação genética das populações neste ecossistema ainda é desconhecida, sendo o presente trabalho pioneiro.

Diante disto, esses tudo teve como principal objetivo expandir o conhecimento da diversidade genética e taxonômica da Superordem Cladocera no Brasil, a partir de amostragens em nove ambientes, distribuídos em três sub-bacias, na planície de inundação do Alto rio Paraná. No primeiro capítulo avaliamos a diversidade genética das populações de *Diaphanosoma birgei* Fischer, 1850 da região neártica em comparação com *Diaphanosoma* sp. nov., anteriormente identificada como *D. birgei* na planície e no Brasil, como um todo. A nova espécie foi descrita utilizando uma abordagem integrativa, com análise molecular, descrição morfológica e caracterização da amplitude de nicho climático. No segundo capítulo, caracterizamos molecularmente e taxonomicamente a espécie *Moina minuta* Hansen, 1899, também amostrada na planície, para avaliarmos a hipótese de sua posição filogenética indicada por Hudec (2010) como parte da linha conhecida como *Exomoina* Hudec, 2010 do táxon *Moina* ss., além de sequências moleculares de *Moina micrura* Kurtz, 1874, *Moina* cf. *brachiata* Jurine, 1820, *Moina weismanni* Ishikawa, 1896, *Moina macrocopa* Straus, 1820, *Moina* cf. *salina* Daday, 1888 e *Micromoina arboricola* Dumont et al., 2013 retiradas de bancos de dados.

REFERÊNCIAS

- ALLAN, J. D. Life history patterns in zooplankton. **The American Naturalist**, v. 110, n. 971, p. 165-180, 1976.
- BEKKER, E. I. *et al.* DNA barcoding reveals high cryptic diversity in the North Eurasian *Moina* species (Crustacea: Cladocera). **PloS one**, v. 11, n. 8, p. e0161737, 2016.
- BONECKER, C. C. *et al.* Temporal changes in zooplankton species diversity in response to environmental changes in an alluvial valley. **Limnologica**, v. 43, n. 2, p. 114-121, 2013.
- BONECKER, C. C. *et al.* Synergistic effects of natural and anthropogenic impacts on zooplankton diversity in a subtropical floodplain: a long-term study. **Oecologia Australis**, v. 24, n. 2, p. 524-537, 2020.
- BRISKI, E. *et al.* Does non-native diversity mirror Earth's biodiversity?. **Global Ecology and Biogeography**, v. 33, n. 1, p. 48-62, 2024.
- CASTILHO-NOLL, M. S. M. *et al.* A review of 121 years of studies on the freshwater zooplankton of Brazil. **Limnologica**, v. 100, p. 126057, 2023.

DÍAZ, S. *et al.* Set ambitious goals for biodiversity and sustainability. **Science**, v. 370, n. 6515, p. 411-413, 2020.

DUMONT, H. J. *et al.* Toward a phylogeny and biogeography of *Diaphanosoma* (Crustacea: Cladocera). **Aquatic Ecology**, v. 55, p. 1-16, 2021.

ELMOOR-LOUREIRO, L. M. A. *et al.* Towards a synthesis of the biodiversity of freshwater Protozoa, Rotifera, Cladocera, and Copepoda in Brazil. **Limnologica**, v. 100, p. 126008, 2023.

ELMOOR-LOUREIRO, L. M. A.; SOUSA, F. D. R. Taxonomic Catalog of the Brazilian Fauna: Superorder Cladocera (Crustacea: Branchiopoda), taxonomic history, diversity and distribution. **Zoologia (Curitiba)**, v. 40, p. e23020, 2023.

ELÍAS-GUTIÉRREZ, M.; VALDEZ-MORENO, M. A new cryptic species of *Leberis* Smirnov, 1989 (Crustacea, Cladocera, Chydoridae) from the Mexican semi-desert region, highlighted by DNA barcoding. **Hidrobiológica**, v. 18, n. 1, p. 63-74, 2008.

ELÍAS-GUTIÉRREZ, M. *et al.* Improved protocols to accelerate the assembly of DNA barcode reference libraries for freshwater zooplankton. **Ecology and evolution**, v. 8, n. 5, p. 3002-3018, 2018.

FORRO, L. *et al.* Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. **Freshwater animal diversity assessment**, v. 198, p. 177-184, 2008.

GASTON, K. J. Global patterns in biodiversity. *Nature*, v. 405, n. 6783, p. 220-227, 2000.

HEBERT, P. D. N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

HONG, P. *et al.* Biodiversity promotes ecosystem functioning despite environmental change. **Ecology Letters**, v. 25, n. 2, p. 555-569, 2022.

HORTAL, J. *et al.* Seven shortfalls that beset large-scale knowledge of biodiversity. **Annual review of ecology, evolution, and systematics**, v. 46, n. 1, p. 523-549, 2015.

ISBELL, F. *et al.* Linking the influence and dependence of people on biodiversity across scales. **Nature**, v. 546, n. 7656, p. 65-72, 2017.

JUNK, W. J. *et al.* The flood pulse concept in river-floodplain systems. **Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 106, p. 110-127, 1989.

- LIU, P. *et al.* Species and hybrids in the genus *Diaphanosoma* Fischer, 1850 (Crustacea: Branchiopoda: Cladocera). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 118, p. 369-378, 2018.
- MAKINO, W. *et al.* The first report of the non-indigenous *Chydorus brevilabris* Frey, 1980 (Crustacea: Cladocera) in Asian freshwaters. **Limnology**, v. 24 p. 151-159, 2023.
- MURPHY, G. E. P.; ROMANUK, T. N. A meta-analysis of declines in local species richness from human disturbances. **Ecology and evolution**, v. 4, n. 1, p. 91-103, 2014.
- NEWBOLD, T. *et al.* Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. **Nature**, v. 520, n. 7545, p. 45-50, 2015.
- NEWBOLD, T. *et al.* Tropical and Mediterranean biodiversity is disproportionately sensitive to land-use and climate change. **Nature Ecology & Evolution**, v. 4, n. 12, p. 1630-1638, 2020.
- NORTHRUP, J. M. *et al.* Synergistic effects of climate and land-use change influence broad-scale avian population declines. **Global Change Biology**, v. 25, n. 5, p. 1561-1575, 2019.
- PLAS, F. Biodiversity and ecosystem functioning in naturally assembled communities. **Biological Reviews**, v. 94, n. 4, p. 1220-1245, 2019.
- POLLOCK, L. J.; THUILLER, W.; JETZ, W. Large conservation gains possible for global biodiversity facets. **Nature**, v. 546, n. 7656, p. 141-144, 2017.
- PROSSER, S. *et al.* A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans. **Molecular ecology resources**, v. 13, n. 6, p. 1151-1155, 2013.
- SILVA, J. V. F. *et al.* 30 year review of the zooplankton in three conservation units on the Upper Paraná River, Brazil, with notes for stressors, flood pulse, and public politics. **Hydrobiologia**, p. 1-20, 2024.
- THOMAZ, S. M. *et al.* **The Upper Paraná River and its Floodplain**. 1. ed. Netherlands: Backhuys Publishers, Leiden, 2004. 391p.
- TRICART, J. **Introduction to climatic geomorphology**. 1. ed. London: Longman, 1972. 295p.

2 Uma nova espécie Neotropical descrita a partir do complexo *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981 (Cladocera: Sididae) por meio da taxonomia integrativa

RESUMO

Espécies que compõem a Superordem Cladocera, desde as primeiras descrições, frequentemente foram sugeridas como organismos cosmopolitas. No entanto, com estudos taxonômicos utilizando dados morfológicos e moleculares integrativos, foram descobertos inúmeros complexos de espécies geograficamente isolados. Neste estudo, utilizamos o fragmento do gene mitocondrial Citocromo *c* Oxidase subunidade I (*COI*), descrições morfológicas e caracterização da amplitude de nicho climática para comparar populações de *Diaphanosoma sp. nov.* da região Neotropical e populações de *Diaphanosoma birgei* da região Neártica. As análises moleculares e taxonômicas revelaram uma grande complexidade na filogenia do grupo, agrupando *Diaphanosoma sp. nov.* com *D. cf. heberti*, separando as linhagens críptica de *D. birgei* da América do Norte em um clado distinto. O gancho na margem posterior da valva e a amplitude de nicho climático suportam as diferenças genéticas. A expansão deste conhecimento sobre a biodiversidade Neotropical traz uma luz para grandes questões sobre o não cosmopolitismo em *Diaphanosoma* e sobre a problemática da elevada estase morfológica do grupo.

Palavras-chave: DNA barcoding; Ctenopoda; haplótipos; morfologia; novo mundo; planície de inundação.

A new Neotropical species described from the *Diaphanosoma birgei* complex Korinek, 1981 (Cladocera: Sididae) through integrative taxonomy

ABSTRACT

Species within the Superorder Cladocera have often been suggested to be cosmopolitan organisms since their earliest descriptions. However, taxonomic studies using integrative morphological and molecular data have revealed numerous geographically isolated species complexes. In this study, we used a fragment of the mitochondrial gene Cytochrome c Oxidase subunit I (COI), morphological descriptions, and characterization of climatic niche breadth to compare populations of *Diaphanosoma sp. nov.* from the Neotropical region with populations of *Diaphanosoma birgei* from the Nearctic region. Molecular and taxonomic analyses revealed great complexity in the group's phylogeny, grouping *Diaphanosoma sp. nov.* with *D. cf. heberti*, and placing cryptic lineages of *D. birgei* from North America in a distinct clade. The hook on the posterior margin of the valve and the climatic niche breadth support the genetic differences. Expanding our knowledge of Neotropical biodiversity sheds light on major questions regarding the non-cosmopolitan nature of *Diaphanosoma* and the issue of high morphological stasis within the group.

Keywords: DNA barcoding; Ctenopoda; haplotypes; morphology; new species; floodplain.

2.1 Introdução

Os cladóceros são microcrustáceos aquáticos de grande importância ecológica pelo seu papel como elo na cadeia trófica, transferindo a matéria e energia dos produtores para os demais níveis (Allan 1976). Os organismos que compõem a Superordem Cladocera Latreille, 1829 surgiram há mais de 400 milhões de anos (Anderson et al. 2003, Van Damme and Kotov 2016) e estão distribuídos em todas as regiões climáticas do planeta, compondo 169 espécies no Brasil, divididas em nove famílias (Elmoor-Loureiro et al. 2023; Elmoor-Loureiro and Sousa 2023). Apesar do grande conhecimento da diversidade de cladóceros, este número pode estar subestimado pelo esforço amostral, uma vez que há uma prioridade dos estudos em determinados ambientes, como rios e lagos perenes (Elmoor-Loureiro et al. 2023), ignorando os mais extremos, como poças rochosas e lagos temporários, que podem atuar como forte mecanismo de especiação (Frey 1991, Frey 1998).

A ocorrência de espécies crípticas dentre os cladóceros, que já era relatada com dados taxonômicos, ganhou maior suporte após o uso de dados morfológicos integrados aos dados moleculares, pois o que era definido como uma espécie cosmopolita, na verdade, passaram a ser interpretadas como inúmeras espécies morfológicamente similares e geograficamente isoladas (Elías-Gutiérrez and Valdez-Moreno 2008, Xu et al. 2009; Bekker et al. 2016). Com o uso de ferramentas moleculares, a identificação se tornou ainda mais delicada, uma vez que há alta diferenciação genética em um grupo morfológicamente parecido (Müller and Seitz 1995, Liu et al. 2018, Dumont et al. 2021). Na região Neotropical, especialmente no Brasil, estudos filogenéticos com dados moleculares de espécies crípticas de cladóceros são extremamente escassos (Abreu et al. 2010, Castilho et al. 2015, Garibian et al. 2021), evidenciando uma grande urgência para o conhecimento da biodiversidade em Cladocera (Elmoor-Loureiro et al. 2023).

A descrição original de *Daphnia crystallina* O.F. Müller, 1776, atualmente denominada *Sida crystallina* (O.F. Müller, 1776), realocada por Straus, 1820, ao descrever o gênero *Sida* Straus, 1820, foi o precursor das descrições dentro da família Sididae Baird, 1850. Em 1848, Liévin descreveu *Sida brachyura* Liévin, 1848, que posteriormente foi translocada para o gênero *Diaphanosoma*, considerando o tamanho corporal, padrão de espinhos na valva e características fisiológicas. Deste modo, o nome *Diaphanosoma brachyurum* passou a representar o material inicialmente descrito por Liévin (1848), representando a espécie tipo do gênero de acordo com o Artigo 69 do código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN). Atualmente sabe-se que o nome *D. brachyurum* foi utilizado para identificar de maneira equivocada populações ao redor do mundo, incluindo aquelas distribuídas na América do Norte (Korovchinsky 2002) e na América do Sul (Elmoor-Loureiro, 1990). Portanto, *Diaphanosoma leuchtenbergianum* Fisher, 1850, inicialmente descrita com caracteres subjetivos, deve ser considerado como sinônimo de *D. brachyurum*. Foi só em 1981, com a descrição de *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981, que a hipótese de um novo complexo de espécies, diferente de *D. brachyurum*, passou a ser difundido na literatura, acarretando na ampliação da distribuição geográfica de *D. birgei* na região Neártica e Neotropical, desde o Canadá até Argentina (Korinek 1981, Korovchinsky 1992, Korovchinsky 2002; Elías-Gutiérrez et al. 2008, Korovchinsky 2016, Korovchinsky 2018; Elmoor-Loureiro 2023).

A distribuição geográfica de *D. birgei* pode ser menor do que apresentado na literatura (Korinek 1981, Dumont et al. 2021), uma vez que dados moleculares e morfológicos têm revelando que algumas populações previamente identificadas como *D. birgei*, possuem pouca divergência genética quando comparado, por exemplo, a *Diaphanosoma heberti* Korovchinsky, 2002, mas muito distante entre elas (Elías-Gutiérrez et al. 2008). Por mais que o gênero *Diaphanosoma* tenha passado por grandes

processos de revisões taxonômicas e caracterizações filogenéticas (Korovchinsky 2018, Dumont et al. 2021, Karpowicz et al. 2022), o complexo de espécies relacionado a *D. birgei* ainda continua sendo uma grande incógnita, principalmente pela limitação dos materiais descritivos e de revisão (Korinek, 1981, Korovchinsky 1992, Dumont 1994, Korovchinsky 2018). Esta perspectiva abre caminho para novos estudos moleculares, taxonômicos e filogeográficos.

Do ponto de vista ecológico, os Ctenopoda apresentam uma maior contribuição para a biodiversidade em regiões tropicais e subtropicais quando comparado a regiões temperadas (Dumont 1994), além de possuírem uma das maiores contribuições para os valores de biomassa dentre os organismos planctônicos de água doce (Han et al. 2011). O entendimento sobre a biologia comportamental e fisiológica de *D. birgei* permaneceu negligenciada até o começo do século, quando foi possível entender melhor a relação direta do aumento da temperatura com a sua reprodução e crescimento (Sipaúba-Tavares and Pereira 2008), além de preferências alimentares (Sipaúba-Tavares and Bachion 2002, Sipaúba-Tavares et al. 2014). Ao mesmo tempo, fatores ambientais que influenciam a distribuição de *D. birgei* em grandes escalas espaciais necessitam ser investigados.

O objetivo deste estudo foi investigar populações brasileiras pertencentes ao complexo de *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981 a partir de uma abordagem integrativa. Nós avaliamos a morfologia, a divergência genética e estrutura filogeográfica comparando populações da América do Norte e Brasil, assim como testamos a amplitude de nicho climático.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Área de estudo

A planície de inundação do Alto rio Paraná (PR/MS) (22°40' - 22°50' S; 53°10' - 53°24' W), em território brasileiro, abrange aproximadamente 802,150 km². Localizada entre os reservatórios de Porto Primavera (SP) e Itaipu (PR), esse ecossistema é formado por uma heterogeneidade de ambientes aquáticos com seus diferentes graus de conectividade, tais como rios, canais, ressacos, lagoas temporárias e permanentes (Agostinho et al. 2004, Souza-Filho 2009).

A lagoa Fechada, localidade tipo da espécie, está localizada na planície de inundação do Alto rio Paraná. Esta região é afetada por constantes efeitos dos períodos do pulso de inundação (Junk et al. 1989, Thomaz et al. 2004), que conecta os ambientes e permite o fluxo de espécies (Lansac-Tôha et al. 2009, Bonecker et al. 2020), além de tornar as características ambientais homogêneas (Thomaz et al. 2007).

2.2.2 Delineamento amostral

Os indivíduos de *Diaphanosoma* sp. nov. utilizados para a análise molecular foram amostrados na Lagoa Fechada, localizada na sub-bacia do rio Baia, Estado de Mato Grosso do Sul, em março de 2024, juntamente com as amostragens do projeto Pesquisa Ecológica de Longa Duração (PELD/CNPq): A planície de inundação do alto rio Paraná (PELD-PIAP).

Para análise morfológica, os indivíduos também foram amostrados na Lagoa Fechada, além da Lagoa Ventura, sub-bacia do rio Ivinhema, Mato Grosso do Sul, Brasil e rio Paraná, na calha do rio e próximo a Ilha da Carioca, sub-bacia do rio Paraná, Brasil. Os demais indivíduos utilizados neste estudo foram obtidos em amostras já coletadas anteriormente.

2.2.3 Amostragem, identificação e análise taxonômica

As amostras dos cladóceros foram coletadas de forma composta nas regiões pelágicas e litorâneas, das lagoas e rio, por arrasto vertical e horizontal, com rede de plâncton (68 µm). Imediatamente, após a coleta, os indivíduos foram concentrados com auxílio de uma rede de mesma malhagem e fixados com etanol absoluto (Êxodo Científica®, COD: AE07145RA) resfriado. As amostras foram acondicionadas em freezer por uma semana e mantidas à 5°C posteriormente, conforme estabelecido por Prosser et al. (2013) e Elías-Gutiérrez et al. (2018). Em laboratório, foi triado, pelo menos, um organismo por local, identificada de acordo com literatura especializada (Korinek 1981, Korovchinsky 1992, Korovchinsky 2018), acondicionado individualmente em eppendorf com 10 ml de água Milli-Q e congelado para posterior sequenciamento.

O acesso ao patrimônio genético dos cladóceros analisados foi autorizado pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen nº A07E682.

Para a descrição da morfologia, os espécimes foram montados em gotas de glicerina sobre lâminas de vidro, cobertos com lamínulas e analisados sob microscópio óptico de contraste de fase Olympus BX41. Os indivíduos foram dissecados com auxílio de alfinetes e montados em lâminas com glicerina para melhorar a visualização de estruturas anatômicas (valvas; antenas, antênulas, mandíbulas, maxilas, pós-abdome e apêndices torácicos) (Korovchinsky 1992, Van Damme 2016, Korovchinsky 2018, Dumont et al. 2021). As cerdas e demais estruturas do sexto apêndice torácico (P6) foram enumeradas conforme o estudo de Dumont et al. (2021) (Figura 1) sem qualquer relação de homologia com cladóceros da ordem Anomopoda. Ilustrações foram realizadas com auxílio de câmara-lucida e transformadas em arquivos digitais usando mesa digitalizadora e um software livre e de código aberto para edição de gráficos vetoriais, Inkscape.

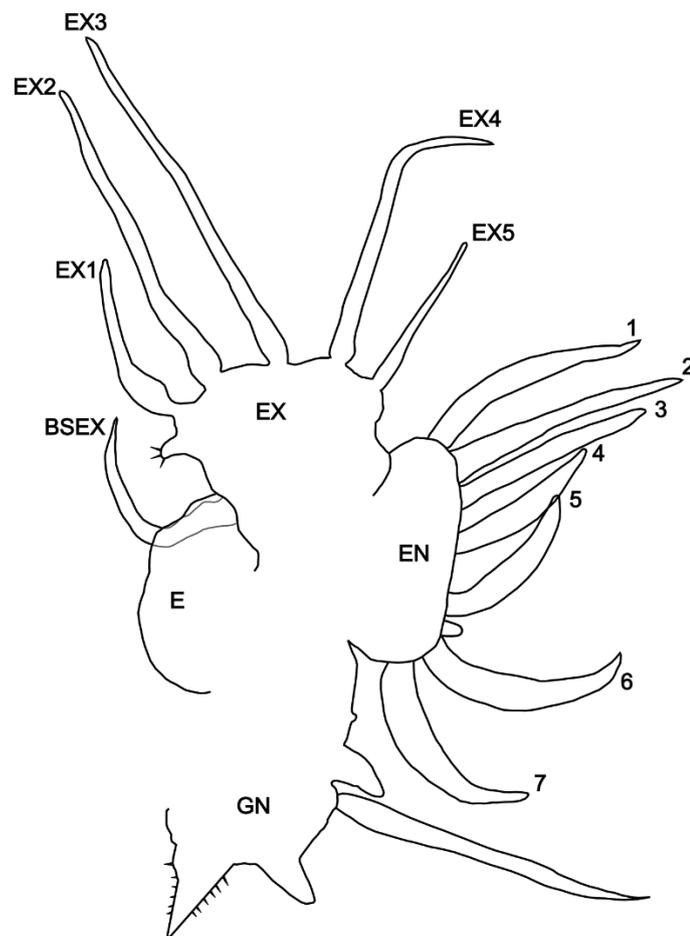


Figura 1. Estrutura do P6 de *Diaphanosoma* sp. nov., apresentando sete cerdas na estrutura do endopodito (EM); GN, gnatobase; EX, exopodito, Ex 1–5, cinco cerdas marginais do exopodito; BSEX, cerda basal do exopodito; E, epipodito.

A análise taxonômica e confirmação dos pontos de ocorrência da espécie foi realizada com organismos de diferentes partes do Brasil (Figura 2).

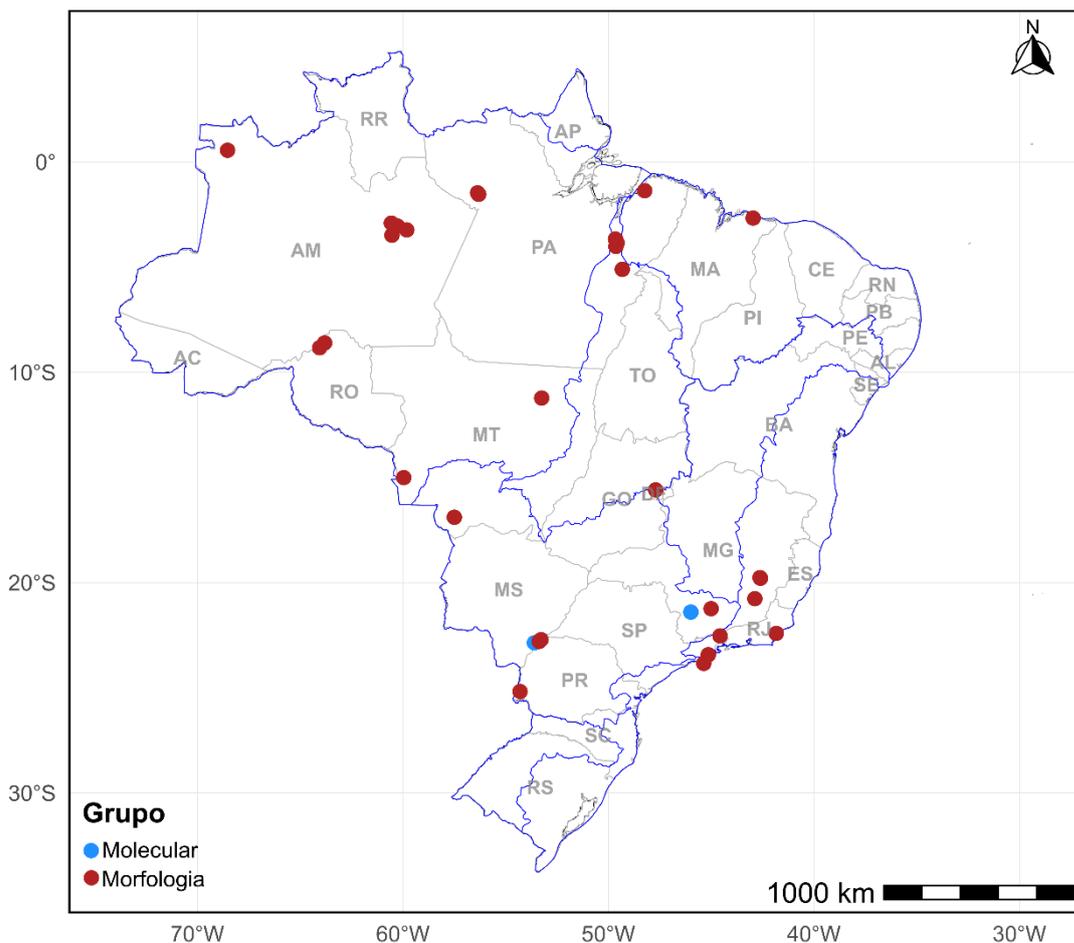


Figura 2. Mapa do Brasil evidenciando as ocorrências confirmadas das espécies e os locais de identificação molecular e morfológica, com enfoque nas divisões por regiões hidrográficas do país.

2.2.4 Caracterização das condições ambientais

Nos três locais de amostragens da planície de inundação do alto rio Paraná foram obtidos dados de Ph, temperatura, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica (Ms/cm) na sub-superfície, com auxílio de aparelhos portáteis DIGIMED. Amostras de água também foram obtidas a sub-superfície, com auxílio garrafa de Van Dorn (5 litros), e acondicionadas em galões e preservadas em gelo, para posterior análise em laboratório de nutrientes e clorofila. Dessas amostras preservadas, foram obtidas alíquotas de água

(250 ml) que foram preservadas em freezer (-20°C) para posterior determinação das concentrações de nutrientes totais.

Outras alíquotas de água, foram filtradas em micro filtro de fibra de vidro GF 52/C, 47mm para estimar a concentração de clorofila a ($\mu\text{g/L}$), de acordo com o método de Golterman (1978). Parte do volume filtrado (250 ml) foi acondicionado em frasco esterilizado e no freezer (-20°C) para posterior análise dos nutrientes dissolvidos em laboratório. Outras alíquotas de água, também foram filtradas em micro filtro de fibra de vidro GF 52/C, 47mm, previamente incinerados, para determinar a quantidade de material em suspensão total e as formas orgânicas e inorgânicas (mg/L), conforme Teixeira et al. (1965). Ambos os filtros foram mantidos em freezer (-20°C) para posterior análise desses parâmetros em laboratório.

Em laboratório, a concentração de clorofila-a ($\mu\text{g/L}$) foi estimada através do método de extração de Golterman et al. (1978). A concentração do N-Total ($\mu\text{g/L}$) foi determinada através do sistema de injeção de fluxo (Bergamin et al. 1978), e a análise do N-Nitrato ($\mu\text{g/L}$) foi realizada através do método de injeção de fluxo (Giné et al. 1980), seguindo o mesmo procedimento que converte o nitrato a nitrito (usado para o nitrogênio total). O N-amoniaco ($\mu\text{g/L}$) foi determinado pela oxidação por hipoclorito de sódio e fenol, em meio moderadamente alcalino e tendo como catalisador o nitroprussiato de sódio, resultando no composto indofenol, que é quantificado por espectrofotometria (Koroleff, 1976). A digestão das amostras de água para estimativa da concentração do P-Total ($\mu\text{g/L}$) foi realizada em autoclave, na presença de um catalisador, e para a leitura, seguiu o mesmo procedimento do P-ortofosfato ($\mu\text{g/L}$), que foi determinado conforme Mackereth et al. (1978).

2.2.5 Extração, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento

A extração do DNA de organismos de corpo inteiro foi realizada utilizando o kit em colunas QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®), conforme o protocolo sugerido pelo fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific®).

Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizado um termociclador ProFlex™ 3 x 32-well PCR System da Applied Biosystems®. A reação para a amplificação do DNA dos cladóceros foi realizada com 1,25 U de *Platinum Taq* DNA polimerase (5 U/ML, Invitrogen), Tris-KCL (20 Mm Tris-HCl Ph 8,4 com 50 Mm KCl), 1,50 Mm MgCl₂, 0,1 Mm de cada Dntp, 2,5 Mm de cada *primer* específico para a região mitocondrial do citocromo *c* oxidase subunidade I (*COI*), DNA molde (10 ng) e água Milli-Q para um volume final de 25 µL. Os *primers* utilizados e as condições de PCR estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Marcador molecular e *primer* Zplank com as sequências (5'-3') e as condições para a amplificação do DNA de *Diaphanosoma* sp. nov. da planície de inundação do Alto rio Paraná.

Marcador	Primers (5'-3')	Condição PCR	Referências
<i>COI</i>	ZplankF1_t1 (TCTASWAATCATAARGATATTGG)	1 ciclo de 5 min a 95°C, 40 ciclos de 60 s a 95°C (desnaturação), 90 s a 42°C (anelamento) e 90 s a 72°C (extensão), seguido por 1 ciclo de 6 min a 72°C	Prosser et al. (2013)
	ZplankR1_t1 (TTCAGGRTGRCCRAARAATCA)		Bekker et al. (2016)

Os produtos amplificados foram verificados em gel de agarose 1% e o tamanho dos fragmentos foi estimado com a utilização de um marcador de peso molecular conhecido (DNA *Ladder* 100 pb). Os produtos obtidos da amplificação do DNA foram purificados seguindo protocolo descrito por Rosenthal et al. (1993). O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático ABI 3500 da Applied Biosystems® e utilizando o kit BigDye® Terminator.

2.2.6 Análise dos dados

As sequências obtidas foram editadas de forma manual no software BioEdit v7 (Hall 1999). O alinhamento foi realizado pelo programa MEGA11 (Kumar et al. 2016), a partir do algoritmo de alinhamento múltiplo CLUSTAL W. A ferramenta BLASTn foi usada com o objetivo de comparar as sequências obtidas com aquelas disponíveis no GenBank[®]. A caracterização dos haplótipos foi realizada pelo programa DnaSP v6 (Rozas et al. 2017), a fim de obter o número de sítios variáveis (S), número de haplótipos (h) e diversidade haplotípica (Hd). A rede de haplótipos foi gerada pelo programa Hapsolutely (Vences et al. 2024) pelo algoritmo median-joining (Bandelt et al. 1999).

Além disso, sete sequências de *Diaphanosoma birgei* dos Lagos Little Joe, Lago Erie e Lago Pinehurst da região Neártica, provenientes do Canadá, e uma sequência proveniente do reservatório de Furnas, Brasil, foram utilizadas na rede de haplótipos e no cladograma. Outras espécies que compõem o gênero *Diaphanosoma* foram incluídas nas análises para comparar com amostras do Brasil (APÊNDICE A), e cujos dados estão disponíveis no BOLD Systems Versão 4 e GenBank[®]. Como grupo externo foi adicionada uma sequência de *Daphnia magna* retirada do GenBank[®] (GU680596).

Para realizar o cálculo da distância K2P foi utilizado o programa MEGA7. O modelo de substituição nucleotídica selecionado pelo software IQ-TREE (Trifinopoulos et al. 2016) foi o GTR + G4 (Hasegawa et al. 1985). A reconstrução filogenética foi realizada utilizando o programa MEGA11, construída pelo método de máxima verossimilhança com 1000 reamostragens de *bootstrap*.

2.2.7 Sobreposição de nicho climático

Devido à elevada similaridade morfológica entre os indivíduos do gênero *Diaphanosoma* Fischer (Kotov and Korovchinsky 2006), mesmo com uma grande distância filogenética evidenciada por trabalhos atuais (Elias-Gutierrez et al. 2008,

Dumont et al. 2021, Karpowicz et al. 2022), a seleção das coordenadas de ocorrência foi cuidadosamente baseada nos locais de coleta das descrições originais. Para *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981, foram utilizadas 13 coordenadas localizadas no Canadá. Já para *Diaphanosoma* sp. nov., descrita e identificada neste estudo a partir de indivíduos amostrados no Brasil, foram utilizadas 32 coordenadas confirmadas taxonomicamente. Coordenadas sobrepostas foram retiradas da análise, a fim de reduzir vieses na análise de nicho climático. Todas as análises foram realizadas no Rstudio, um ambiente de desenvolvimento integrado para a linguagem de programação R na versão 4.4.3 (R Core Team 2024).

2.2.8 Variáveis ambientais

Para a extração das variáveis climáticas e de altitude do banco de dados do *WorldClim 2.1* (<https://www.worldclim.org/data/worldclim21.html>) com 2,5 minutos de arco de resolução espacial (Fick and Hijmans 2017), foi estabelecida uma malha de 4.5km para extração das variáveis nas coordenadas de ocorrência das espécies, que foi realizada com a função “extract” do pacote “raster” (Hijmans and Van Etten 2014). As variáveis utilizadas foram: Dados de elevação (altitude); BIO1 = Temperatura média anual; BIO2 = Variação diurna média (Média das diferenças entre máximas e mínimas mensais); BIO3 = Isotermalidade (BIO2/BIO7) (* 100); BIO4 = Sazonalidade da temperatura (desvio padrão *100); BIO5 = Temperatura máxima do mês mais quente; BIO6 = Temperatura mínima do mês mais frio; BIO7 = Amplitude térmica anual (BIO5 – BIO6); BIO8 = Temperatura média do trimestre mais úmido; BIO9 = Temperatura média do trimestre mais seco; BIO10 = Temperatura média do trimestre mais quente; BIO11 = Temperatura média do trimestre mais frio; BIO12 = Precipitação anual; BIO13 = Precipitação do mês mais úmido; BIO14 = Precipitação do mês mais seco; BIO15 = Sazonalidade da precipitação (coeficiente de variação); BIO16 = Precipitação do trimestre mais úmido;

BIO17 = Precipitação do trimestre mais seco; BIO18 = Precipitação do trimestre mais quente; BIO19 = Precipitação do trimestre mais frio (WorldClim, 2020).

Para a seleção das variáveis mais adequadas a partir do filtro de colinearidade, foi feita uma matriz de correlação de Pearson (Pearson 1895) comparando cada variável par a par e retirando todas aquelas com o valor de $r > 0,7$ por meio da função “findCorrelation” do pacote “caret” (Kuhn 2008), evitando redundância na análise. Após a seleção foram utilizadas as seguintes variáveis: Dados de elevação (altitude); BIO6 = Temperatura mínima do mês mais frio; BIO7 = Amplitude térmica anual (BIO5 – BIO6); BIO10 = Temperatura média do trimestre mais quente; BIO11 = Temperatura média do trimestre mais frio; BIO12 = Precipitação anual; BIO18 = Precipitação do trimestre mais quente.

2.2.9 Análise de componentes principais (PCA)

Para essa análise, as variáveis climáticas foram previamente padronizadas com a função “*decostand*”, método “*standardize*” do pacote *vegan* (Oksanen et al. 2018) e a função “*prcomp*” foi utilizada para realizar a análise de componentes principais (PCA), que foi visualizada por meio do pacote “*ggplot2*” (Wickham 2016), para comparar a amplitude de nicho climático entre *Diaphanosoma* sp. nov. e *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981. Foi utilizada uma análise de variância permutacional multivariada (PERMANOVA) com a função “*adonis2*” do pacote “*vegan*” no R (Oksanen et al. 2018) considerando 999 permutações para testar se as médias multivariadas (variabilidade) dos grupos são diferentes com base nas variáveis ambientais ou se essa diferença ocorre por efeitos estocásticos. Também utilizamos a função “*permdisp*” do pacote “*vegan*” (Oksanen et al. 2018) para testar a homogeneidade da dispersão e a análise de variância (ANOVA) para testar se há diferença significativa entre essas dispersões.

2.3 Resultados

2.3.1 Análise molecular

As sequências *COI* dos vinte e um espécimes analisados apresentaram um alinhamento final de 523 pb, com 101 sítios variáveis. Segundo a ferramenta BLAST, a sequência obtida para o espécime da planície de inundação do Alto rio Paraná foi idêntica à sequência disponível no GenBank proveniente do reservatório de Furnas (MG), também demonstrado pelo teste de Pairwise Deletion calculado pelo modelo K2P.

Na rede de haplótipos foi possível observar que o Hap_1 é exclusivo do Brasil e que a região Neártica possui haplótipos diferentes entre os três locais amostrados. Os haplótipos Hap_2 e Hap_3 ocorrem apenas no Lago Pinehurst (Lago 1), o Hap_4 apenas no Lago Little Joe (Lago 2) e os Hap_5 e Hap_6 no Lago Erie (Lago 3) (Figura 3). Esses resultados revelam que as populações que ocupam os lagos na região Neártica, principalmente pelo número de mutações, são, provavelmente, espécies diferentes, assim como os haplótipos que ocupam a região Neotropical.

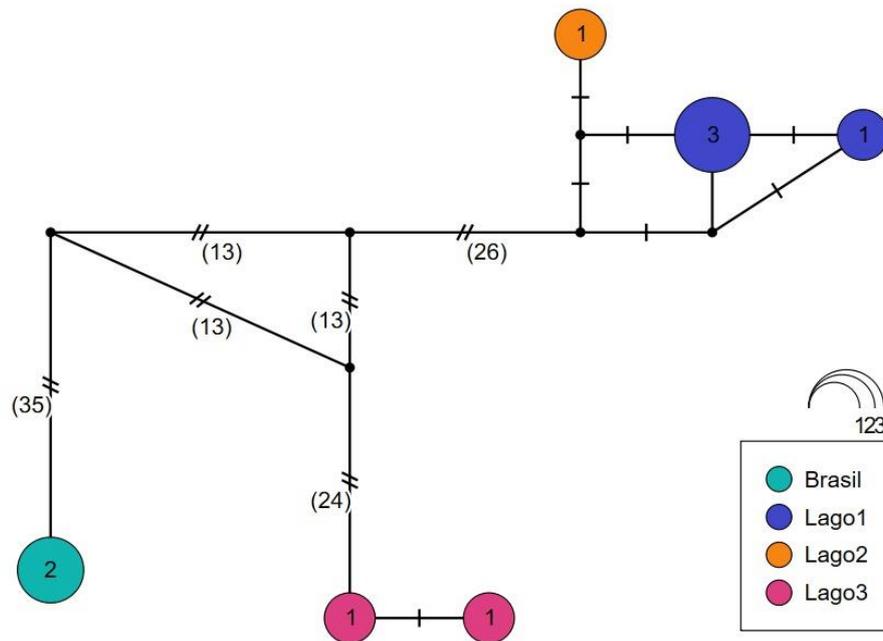


Figura 3. Rede de haplótipos construída pelo programa hapsolutely com as sequências de *Diaphanosoma birgei* da região Neártica disponíveis no BOLD e GenBank®, com as sequências de *Diaphanosoma* sp. nov. da região Neotropical.

A árvore gênica obtida demonstrou uma clara divisão entre o gênero *Diaphanosoma* e *Neodiaphanosoma*, com elevado suporte estatístico para o ramo. Até que haja uma descrição de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN), recomenda-se seguir apenas *Diaphanosoma volzi* Stingelin, 1905 e *Diaphanosoma bergamini* Paggi & Rocha, 1999 como subgênero *Neodiaphanosoma* (Korovchinsky, 2018; Sousa & Elmoor-Loureiro 2021). Os exemplares brasileiros de *Diaphanosoma* sp. nov., anteriormente descritos como *D. birgei*, formaram um grupo diferente das sequências de *D. birgei* da região Neártica, região tipo da espécie, sendo um grupo irmão de *D. cf. heberti*, revelando relações bastante claras envolvendo os clados, mas que podem ocasionar discussões morfológicas complexas (Figura 4).

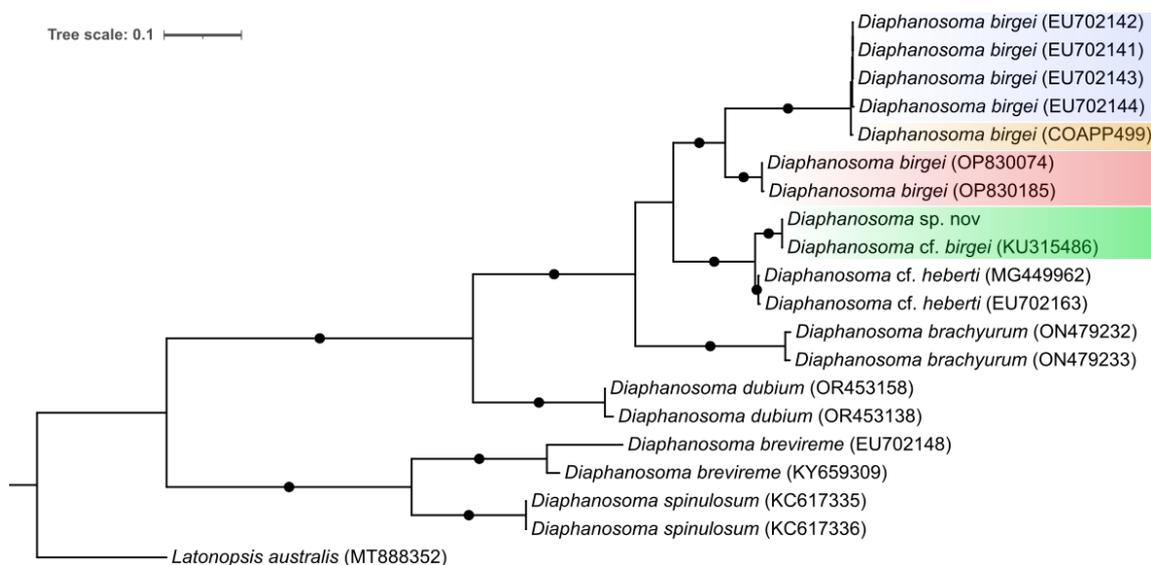


Figura 4. Árvore gênica construída a partir do método de máxima verossimilhança com a sequência de *Diaphanosoma* sp. nov. do presente estudo, com as demais sequências extraídas dos bancos de dados, com enfoque nas sequências de *D. birgei*.

2.4 Sobreposição de nicho climático

A espécie descrita para a região Neártica, mesmo em uma região tão climaticamente distinta da espécie nativa da região Neotropical, apresenta uma pequena sobreposição da amplitude de nicho climático (Figura 5), evidenciando uma possível relação de adaptação fisiológica ao longo do processo evolutivo. Os valores de R^2 da PERMANOVA indicam que 17,3% da variação dos dados ambientais podem ser explicados pela diferença que existe entre *Diaphanosoma* sp. nov. e *D. birgei*, com valor de $p = 0,001$ e a betadisper com valor de $p = 0,238$.

Amplitude de nicho climático

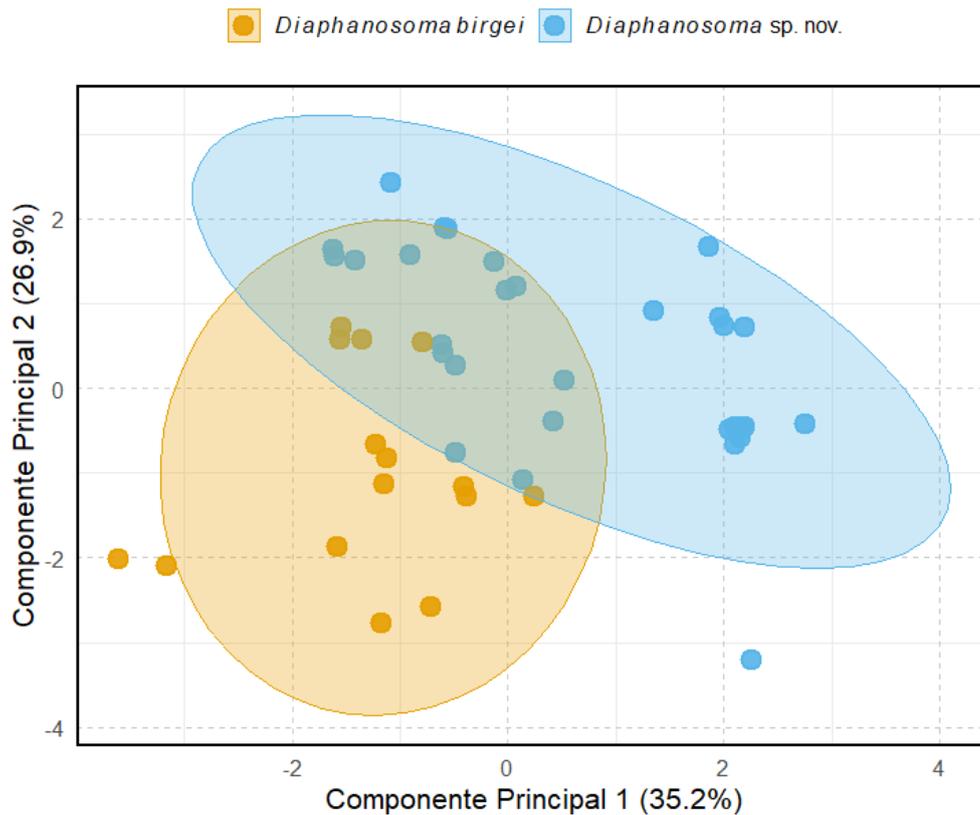


Figura 5. Análise de componentes principais comparando a amplitude de nicho climático entre *Diaphanosoma sp. nov.* e *D. birgei*.

2.5 Sistemática

Classe Branchiopoda Latreille, 1817

Ordem Ctenopoda Sars, 1865

Família Sididae Baird, 1850

Gênero *Diaphanosoma* Fisher, 1850

Diaphanosoma sp. nov.

Diaphanosoma birgei in Korinek, (1981) *partim*: Lago Jacaretinga, Amazonas, Brasil; Elmoor-Loureiro, (1990); Elmoor-Loureiro, (1997); Espíndola et al., (2000); Nogueira, (2001); Sousa & Elmoor-Loureiro (2021).

Localidade tipo: Lagoa Fechada (22°42'38"S,53°16'33"W), sub-bacia rio Baia, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Material examinado: Trinta e duas fêmeas partenogênicas da Lagoa Fechada, (22°51'24"S,53°36'01"O), sub-bacia rio Baia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Março de 2024, Coletor: Matheus Juan Alarcon Sampaio. Quatro fêmeas partenogênicas da Lagoa Ventura (22°42'38"S,53°16'33"O), Parque Estadual das Várzeas da sub-bacia do rio Ivinhema, Mato Grosso do Sul, Brasil. Março de 2024, Coletor: Matheus Juan Alarcon Sampaio. Duas fêmeas partenogênicas do rio Paraná (22°47'34.8"S,53°22'03.0"O), rio Paraná, próximo a Ilha da Carioca, Paraná, Brasil. Março de 2024, Coletor: Cláudia Costa Bonecker. Cinco fêmeas partenogênicas do rio Paraguai (16°53'20.90"S,57°29'37.75"O), Pantanal, Mato Grosso, Brasil. Março de 2020, Coletor: Wilkinson Lopes Lázaro. Dez fêmeas partenogênicas do rio Paraná (25°10'21"S, 54°17'46"O), rio Ócoi, reservatório de Itaipu, Paraná, Brasil. Setembro de 2024 e fevereiro de 2025, Coletor: João Vitor da Fonseca. Três fêmeas partenogênicas na Lagoa Bonita, Estação Ecológica de Águas Emendadas (15°35'22.1"S, 47°41'50.1"O), Planaltina, Distrito Federal, Brasil. Maio de 2008, Coletor: Francisco Diogo Rocha Sousa.

Material tipo. Holótipo: Fêmea partenogênica adulta não dissecada, armazenada em tubo com etanol 92%, será depositada no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

Parátipos: Quinze fêmeas partenogênicas adultas não dissecadas da Lagoa Fechada, (22°42'38"S,53°16'33"O), sub-bacia do rio Baia, Mato Grosso do Sul, Brasil (FDRS0817); material coletado em março de 2024 por Matheus Juan Alarcon Sampaio.

Descrição da fêmea adulta partenogenética

Aspecto geral (Figura 6 – A, C e D).

Corpo grande e alongado, com uma relação altura/comprimento variando de 287-516 μm . Cabeça densa em musculatura com região supraocular bem desenvolvida, representando aproximadamente 1/3 do tamanho do corpo (para dados morfométricos, ver Tabela 2). A região dorsal da valva é levemente convexa, sendo mais acentuada em fêmeas portadora de ovos, com uma inflexão presente na região posterior da valva e no centro da margem na região ventral. Câmara de ovos com a presença de 1-2 ovos.

Tabela 2. Dados morfométricos obtidos a partir da análise de *Diaphanosoma* sp. nov. de sua localidade tipo, com variação de tamanho (Range), valor médio, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) número de indivíduos (*n*).

	<i>n</i>	Range (μm)	Média (μm)	SD (μm)	CV (%)
Comprimento (μm)	15	1305 – 820	1112,0	141,5	12,7
Altura do ponto médio (μm)	15	580 – 235	465,0	107,3	23,1
Altura máxima (μm)	15	600 – 305	482,7	99,4	20,6
Comprimento cabeça (μm)	15	415 – 260	340,7	52,9	15,5
Largura cabeça (μm)	15	265 – 145	229,7	36,9	16,1

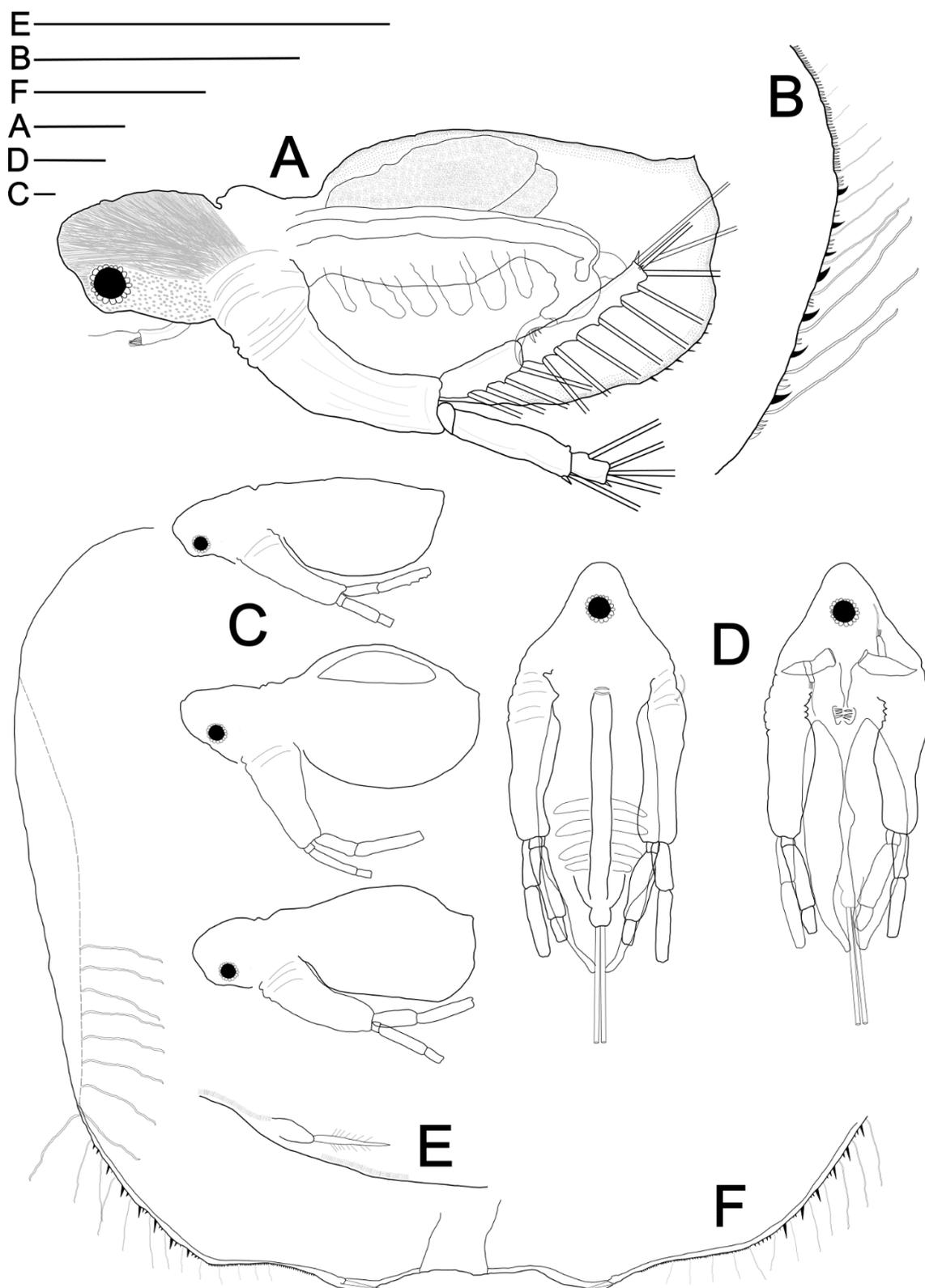


Figura 6. *Diaphanosoma* sp. nov. fêmeas da lagoa Fechada. A) aspecto geral. B) região postero-ventral da valva. C) variações da morfologia corporal. D) vista ventral e dorsal. E) gancho valvar. F) estruturas que compõem a valva em sua região ventral, postero-ventral e posterior. Escalas de 100 μ m (A-F).

Carapaça (figura 6 – B, E e F).

Margem ventral posterior das valvas composta por 5-9 grupos de dentículos (Figura 6-B), formados por um dentículo de base larga, seguido por 1-4 dentículos marcadamente menores, que pode ser aproximadamente do mesmo tamanho que os dentículos de base larga, e uma cerda entre eles; grupo de dentículos diminuindo gradativamente em direção a inflexão na região posterior da valvar. Inflexão na região marginal do centro da valva com 8-11 cerdas longas e plumosas. Presença de um gancho valvar alongado com base robusta e cerdas finas e curtas em sua margem.

Estruturas cefálicas (figura 7 – A-H).

Presença de olho composto com diâmetro de 43-62,4 μm , ocelo ausente. Rostro ausente, labro reduzido e aproximadamente duas vezes mais largo do que comprido, apresentando uma relação largura/comprimento com o basipodito da antena 4,5 vezes menor, margem convexa com a extremidade distal alongada.

Antênula – A1 (figura 7) cerca de 2,8 vezes mais comprida do que larga, com 6 estetascos na extremidade distal e um flagelo cerca de 1,8 vezes maior do que o corpo antenular.

Antena– A2 (figura 7) longa e densa em musculatura, com as cerdas alcançando a margem posterior da valva. Basipodito da antena apresenta região proximal robusta (relação largura/comprimento variando de 350-510 μm), duas cerdas sensoriais presentes; cerda proximal aproximadamente duas vezes maior do que o primeiro segmento do exopodito, cerda distal cerca de duas vezes o tamanho da cerda sensorial proximal e aproximadamente duas vezes menor do que o segundo segmento do exopodito. Extremidade distal interna do primeiro segmento do endopodito com um espinho alongado, cerca de 2/3 do tamanho do espinho da extremidade distal do segundo segmento do endopodito. O espinho da extremidade distal externa do segundo segmento

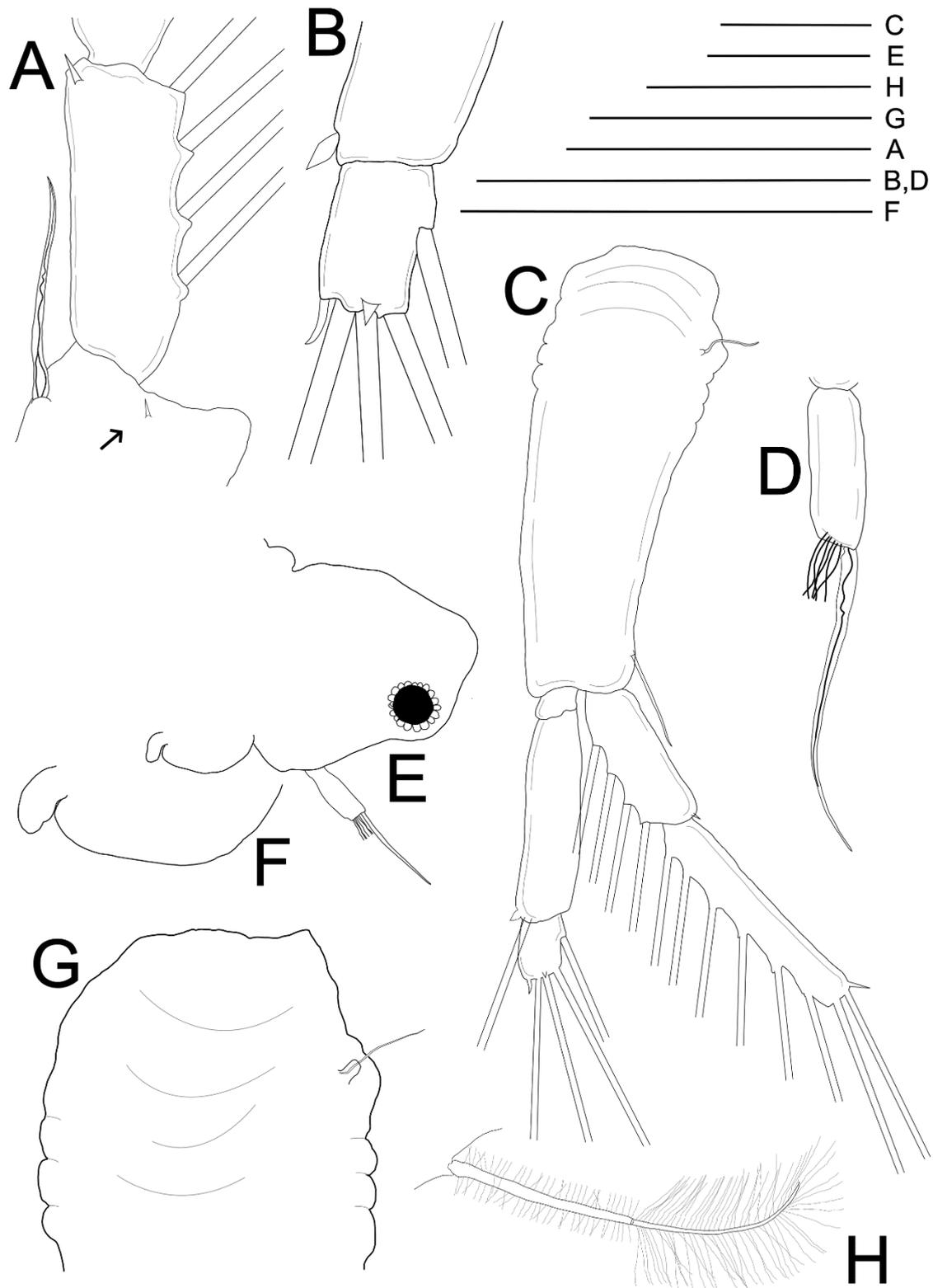


Figura 7. *Diaphanosoma* sp. nov. fêmeas da lagoa Fechada. A) região distal do basipodito da antena, com enfoque no espinho do basipodito, e o primeiro segmento do endopodito. B) penúltimo e último segmento do exopodito da antena. C) forma geral do corpo da antena. D) antênula. E) representação geral das estruturas cefálicas. F) labro. G) região mais proximal do basipodito da antena. H) forma geral das cerdas da antena. Escalas de 100 μ m.

do exopodito possui uma base alongada e é proporcional em tamanho ao espinho da extremidade distal externa do terceiro segmento do exopodito. Segundo espinho do terceiro segmento distal do exopodito apresenta uma base larga equivalente à metade do seu comprimento. Fórmula antenal, cerdas: 4-8/0-1-4 (Figura 7-C)

Apêndices torácicos (figuras 8 A-F e 9 A e B): Seis pares de **apêndices torácicos**.

Primeiro apêndice (figura 8 - A).

Epipodito com formato oval duas vezes mais comprida do que larga, sem a presença de estruturas adicionais. Exopodito alongado sendo aproximadamente três vezes mais comprido do que largo, com 10 setas plumosas que variam em formato e tamanho, sendo a cerda proximal mais espessa e a distal mais fina do que as demais. A face interna do exopodito contém três elementos que diferem em formato e tamanho e dois *hillocks* com espículas rígidas de base espessa, enquanto a face externa contém um elemento e quatro *hillocks* com espículas rígidas e base espessa. Endopodito alongado com duas cerdas não segmentadas na região distal, seguido por 36 cerdas filtradoras bissegmentadas, simétricas na face externa. Gnatobase com uma cerda maior do que as demais, bissegmentada e uma mais espessa sem segmentação de mesmo tamanho das cerdas filtradoras, seguidas por 18 cerdas filtradoras bissegmentadas sem variação de tamanho e formato.

Segundo apêndice (figura 8 – B e C).

Epipodito com formato oval, sem a presença de estruturas adicionais. Exopodito alongado, aproximadamente cinco vezes mais comprido do que largo, com 10 cerdas plumosas que variam de formato e tamanho, sendo a cerda proximal mais espessa e a distal mais afinada e menor do que as demais. Endopodito alongado com duas cerdas não

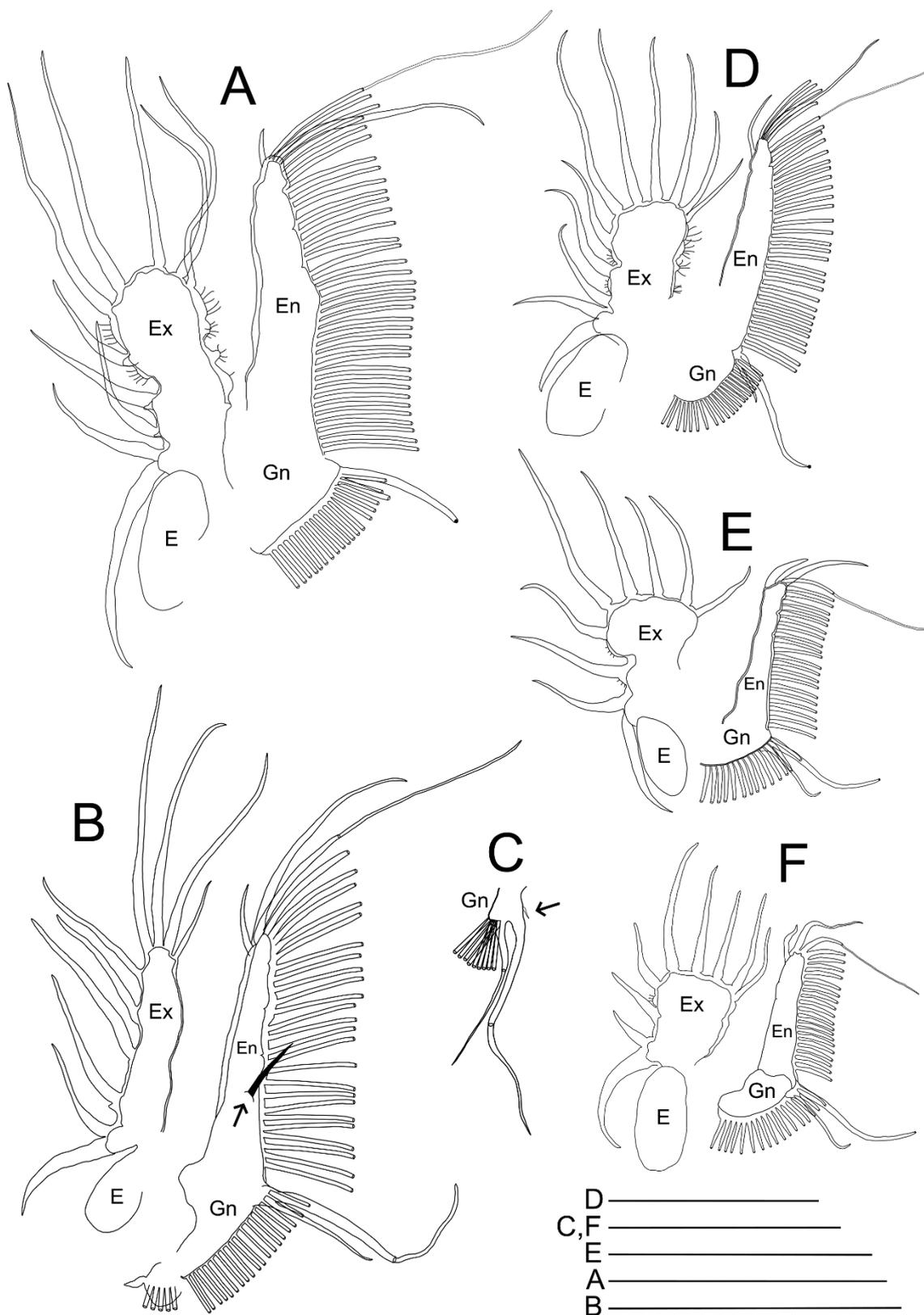


Figura 8. *Diaphanosoma* sp. nov. fêmeas da lagoa Fechada. A) primeiro par de apêndice torácico. B) segundo par de apêndice torácico. C) gnatobase do segundo par de apêndice torácico. D) terceiro par de apêndice torácico. E) quarto par de apêndice torácico. F) quinto par de apêndice torácico. Apenas a primeira cerda do endopodito (En) está representada por completo. A cerda maior da gnatobase (Gn) está representada corretamente na letra B. Escalas de 100 μ m.

segmentadas na região distal, seguido por 25 cerdas filtradoras bissegmentadas, simétricas na face externa. Um espinho com base larga medindo 38 μm de comprimento na região central do endopodito. Gnatobase com uma cerda maior do que as demais, bissegmentada e uma mais espessa sem segmentação de mesmo tamanho das cerdas filtradoras, seguidas por 24 cerdas filtradoras bissegmentadas sem variação de tamanho e formato; um elemento alongado em formato de ponta de lança na região mais proximal.

Terceiro apêndice (figura 8 - D).

Epipodito com formato oval aproximadamente duas vezes mais comprido do que largo, sem a presença de estruturas adicionais. Exopodito alongado, aproximadamente duas vezes mais comprido do que largo, com 11 cerdas plumosas que variam de formato e tamanho, sendo a cerda proximal mais espessa e a distal mais afinada do que as demais. A face interna do exopodito contém dois *hillocks* com espículas rígidas de base espessa, enquanto a face externa contém quatro *hillocks* com espículas rígidas e base espessa. Endopodito alongado com duas cerdas não segmentadas na região distal, seguido por 33 cerdas filtradoras bissegmentadas, simétricas na face externa. Gnatobase com uma cerda maior do que as demais, bissegmentada e uma cerda mais espessa sem segmentação, seguidas por 19 cerdas filtradoras bissegmentadas sem variação de tamanho e formato.

Quarto apêndice (figura 8 - E).

Epipodito com formato oval, sem a presença de estruturas adicionais. Exopodito pouco alongado, sendo a largura aproximadamente $2/3$ do comprimento, com 9 setas plumosas que variam de formato e tamanho, sendo a seta proximal mais espessa e a distal mais afinada e menor do que as demais. Endopodito alongado com duas cerdas não segmentadas na região distal, seguido por 21 cerdas filtradoras bissegmentadas,

simétricas na face externa. Gnatobase com uma cerda maior do que as demais, bissegmentada e uma cerda mais espessa sem segmentação, seguidas por 14 cerdas filtradoras bissegmentadas, sem variação de tamanho e formato.

Quinto apêndice (figura 8 - F).

Epipodito com formato oval mais alto e menos largo do que o exopodito, sem a presença de estruturas adicionais. Exopodito pouco alongado, sendo 10 μm mais alto que largo, com 9 cerdas plumosas que variam de formato e tamanho, sendo a seta proximal mais espessa e a distal mais afinada do que as demais. A face interna do exopodito contém um *hillock* com espículas rígidas de base espessa. Endopodito alongado com duas cerdas não segmentadas na região distal, seguido por 20 cerdas filtrantes bissegmentadas simétricas na face externa. Gnatobase com uma cerda maior do que as demais, bissegmentada, uma espessa sem segmentação, seguidas por 17 cerdas filtradoras bissegmentadas sem variação de tamanho e formato.

Sexto apêndice (figura 9 – A e B).

Epipodito com oval, sem a presença de estruturas adicionais. Exopodito reduzido em comprimento, com um *hillock* na face interna e 5 cerdas plumosas, sendo as cerdas EX2, EX3 e EX4, em média, duas vezes maiores do que a cerda EX5, e semelhantes em tamanho, com dois elementos variáveis em tamanho e formato, além de uma cerda adicional “BSEX”, próxima ao epipodito. Endopodito alongado com 7 cerdas plumosas, não segmentadas que ficam reduzidas e com base mais espessa na região proximal, com a presença de um elemento. Gnatobase com uma única cerda alongada e não segmentada, com a presença de três elementos alongados com base robusta, sendo o mais proximal coberto por espinhos.

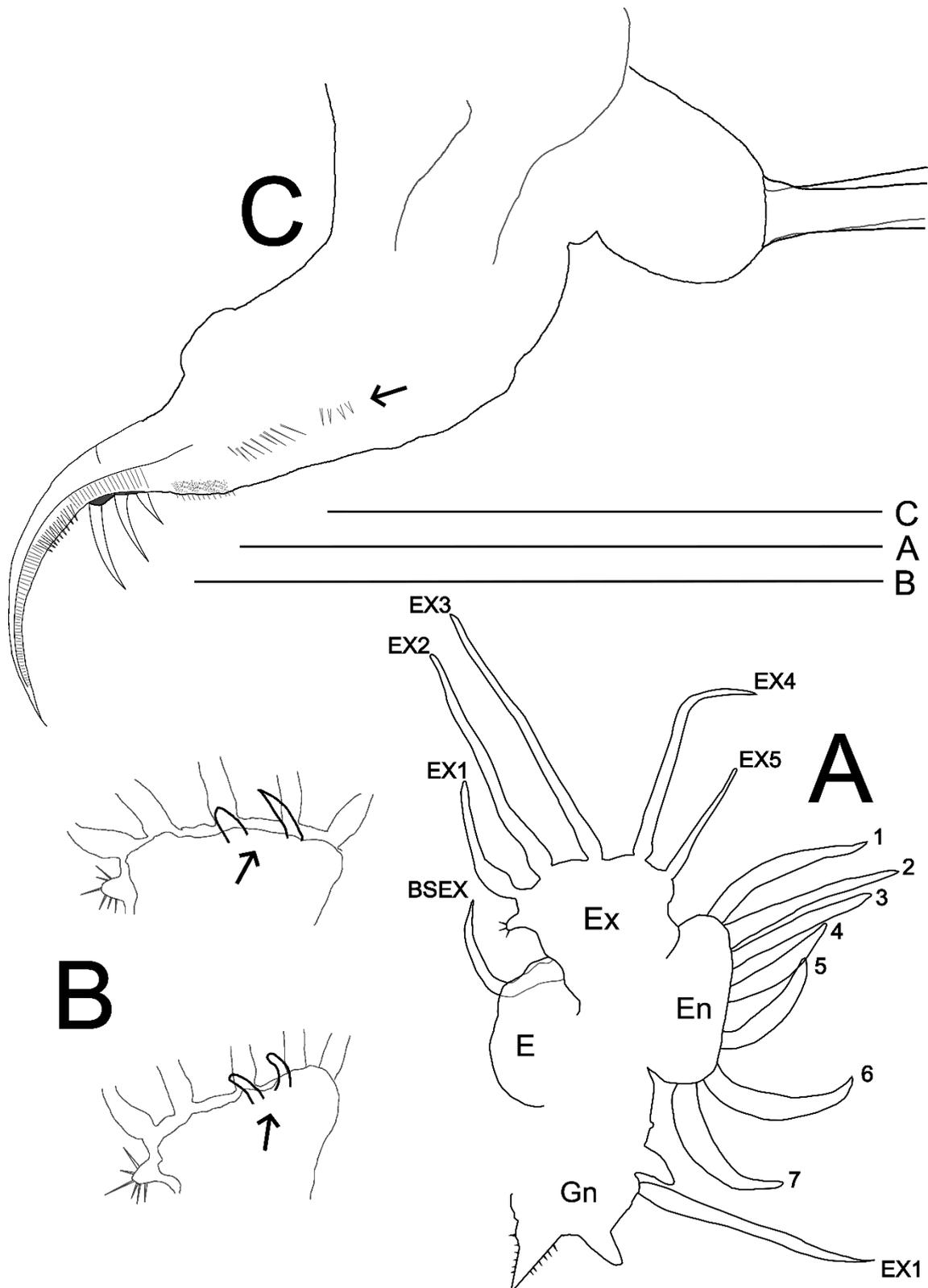


Figura 9. *Diaphanosoma* sp. nov. fêmeas da lagoa Fechada. A) forma geral do sexto par de apêndice torácico. B) elementos variáveis na extremidade distal do exopodito do sexto par de apêndice torácico. C) forma geral e estruturas do pós-abdômen. Escalas de 100 μm.

Estruturas do pós-abdômen (figura 9 - C):

A largura do PA é equivalente a $\frac{3}{4}$ do seu comprimento total, sendo mais largo do que comprido na região proximal e mais alongado na região distal. Garras pós-abdominais em formato de foice e alongadas, sendo aproximadamente metade do comprimento do pós-abdômen e coberta de espinhos nas laterais da garra. A região distal da superfície ventral da garra possui três espinhos grandes e curvados que aumentam gradativamente, seguidos por 5-9 espinhos marcadamente menores com base robusta, sendo a garra coberta lateralmente por espículas. Sequência de 4-6 espinhos com base robusta na lateral do corpo do pós-abdômen com duas cerdas abdominais longas.

Macho. Descrito inicialmente como macho de *Diaphanosoma birgei* em Elmoor-Loureiro (1990).

Diagnose diferencial.

A espécie *Diaphanosoma* sp. nov. foi descrita a partir do conhecido complexo de *D. birgei* (Korovchinsky, 1992; Elías-Gutiérrez et al., 2008; Korovchinsky, 2018). Além de diferenças moleculares, filogeográficas e ecológicas, a presença de um único gancho valvar distingue *Diaphanosoma* sp. nov. de *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981, que possui dois ganchos; *Diaphanosoma edmondisoni* Korovchinsky, 2016 não apresenta gancho valvar, enquanto *Diaphanosoma fluviatile* Hansen, 1899 e *Diaphanosoma lacustris* Korinek, 1981 apresentam um gancho valvar de base larga. A espécie *Diaphanosoma heberti* Korovchinsky, 2002 apresenta uma variação no número de ganchos valvares, sendo muito similar em formato e tamanho com o gancho de *Diaphanosoma* sp. nov.. Os denticulos anais pós-abdominais presentes em *Diaphanosoma* sp. nov. são ausentes em *D. heberti*. Além disso, o número de espinhos

da margem posterior da valva varia de 1-4 para *Diaphanosoma* sp. nov. e 3-8 para *D. heberti*. Outra característica relevante que deve ser considerada quando comparada com *D. heberti* é a região supraocular bem desenvolvida com uma depressão acentuada em *Diaphanosoma* sp. nov..

A espécie européia *Diaphanosoma brachyurum* Liéven, 1848 apresenta os mesmos padrões de espinhos na valva, o mesmo número de ganchos valvares com formato semelhante e em média o mesmo tamanho corporal do que *Diaphanosoma* sp. nov. (para dados morfométricos ver a Tabela 2); no entanto *D. brachyurum*, não apresenta uma depressão na região supraocular e o espinho agudo presente na extremidade distal do basipodito da antena, e sim possui um espinho lanceolado, muito diferente do observado em *Diaphanosoma* sp. nov. (figura 7). Como não há uma descrição adequada dos apêndices torácicos de *D. brachyurum*, não há muitas características morfológicas estáveis para comparação. Certamente este complexo é bastante justificado do ponto de vista morfológico, as modificações mais marcantes estão nos machos, descritos em Elmoor-Loureiro (1990). Para *Diaphanosoma orghidani orghidani* Neagrea, 1982 e *Diaphanosoma orghidani transamurensis* Korovchinsky, 1986, os espinhos da valva são bastante numerosos e não ocorre pequenos grupos de dentículos entre esses espinhos, assim como ocorre em *Diaphanosoma mongolianun* Ueno, 1938, que também apresenta um gancho valvar, mas este possui base robusta e é marcadamente menor do que o presente em *Diaphanosoma* sp. nov..

Distribuição, biologia e ecologia de *Diaphanosoma* sp. nov.

Distribuição predominantemente tropical, com ocorrências conhecida apenas para o território brasileiro, podendo ocorrer em outros países da América Latina. Ecologia comportamental e reprodutiva desconhecidas.

Durante o período de coleta em março de 2024, o valor máximo e mínimo dos parâmetros abióticos da água dos três locais de ocorrência da espécie na planície de inundação do alto rio Paraná, foram: temperatura 26,9-32,7 °C; oxigênio dissolvido 3,7-7,4 mg L⁻¹; condutividade elétrica 34,6-77,3 µS cm⁻¹; Ph 5,97-7,68; N-Total 183-245 µg L⁻¹; nitrato 53,5-81,2 µg L⁻¹; nitrogênio amoniacal 5,6-25,0 µg L⁻¹; fósforo total 4,1-70,8 µg L⁻¹; fosfato 1,2-18,0 µg L⁻¹; clorofila 2,6-7,3 µg L⁻¹; material inorgânico em suspensão 1,02-3,80 mg L⁻¹; material orgânico em suspensão 0,88-1,15 mg L⁻¹. Todos os locais de ocorrência de *Diaphanosoma* sp. nov., espécies de macrófitas estavam presentes nas magens.

Chave de identificação de espécies brasileiras de *Diaphanosoma* Fischer, 1850 (adaptada de Sousa & Elmoor-Loureiro 2021)

- 1^a.** Margem posteroventral das valvas com uma cerda entre os dentículos; região posterior da valva com a presença de um único gancho valvar..... **2**
- 1b.** Margem posteroventral das valvas apenas com dentículos; valva com inflexão larga em forma de aba presente..... **3**
- 2^a.** Margem posteroventral das valvas com grupos formados por dentículos de base larga, com uma cerda entre cada grupo, com um gancho alongado na região posterior da valva....
.....*Diaphanosoma* sp. nov.
- 2b.** Margem posteroventral das valvas com dentículos pequenos e semelhantes, e cerdas esparsas, com um gancho valvar pequeno de base larga na região posterior da valva.....
.....*Diaphanosoma fluviatile* Hansen, 1899
- 3^a.** Margem das valvas armada com dentículos de diferentes tamanhos..... **4**
- 3b.** Margem das valvas armada com dentículos pequenos de tamanho semelhante..... **5**
- 4^a.** Margem posteroventral das valvas com grupos formados por um dentículo espesso e 1–4 dentículos curtos de comprimento semelhante.....
.....*Diaphanosoma spinulosum* Herbst, 1967
- 4b.** Margem posteroventral das valvas com grupos formados por dentículos delgados que aumentam de comprimento em direção à parte posterior da valva.....
.....*Diaphanosoma brevireme* Sars, 1901

5^a. Margem posteroventral das valvas armada com espínulas diminutas; margem posterodorsal do pós-abdome com proeminências arredondadas.....
.....*Diaphanosoma (Neodiaphanosoma) bergamini* Paggi & Rocha, 1999

5^b. Margem posteroventral das valvas armada com uma fileira de espinhos; margem posterodorsal do pós-abdome lisa.....
.....*Diaphanosoma polyspinum* Korovchinsky, 1982

2.6 Discussão

Complexos de espécies em cladóceros são relatados em estudos taxonômicos desde o século passado (Frey 1995). No entanto, com a implementação de métodos de análise molecular, esses relatos foram intensificados visto que foi possível comparar diferentes populações em um curto período de tempo, muitas vezes em detrimento da compreensão de variações morfológicas (Elías-Gutiérrez et al. 2008, Bekker et al. 2016, Elías-Gutiérrez et al. 2018).

Utilizando DNA barcode, Elías-Gutiérrez et al. (2008) sugeriram que *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981 corresponde a um complexo de pelo menos cinco espécies. Os resultados corroboraram esse estudo e revelaram que este complexo é formado por espécies cujas distribuições estão restritas a regiões de menor amplitude geográfica. Isto modifica o padrão difundido na literatura que indicava a distribuição de *D. birgei* desde o norte do Canadá, até a Argentina (Korinek 1981, Korovchinsky 1992, Korovchinsky 2018). Por meio de dados moleculares, foi possível construir uma rede de haplótipos que evidenciou a elevada distância genética das populações que eram consideradas como mesma espécie.

A variação da amplitude de nicho de cada espécie era esperada, principalmente por se tratar de regiões climáticas muito distintas. Como demonstrado por Korovchinsky (2002), mesmo algumas espécies de *Diaphanosoma* demonstrando uma maior frequência

de ocorrência em determinadas áreas, muitos desses locais compartilham coocorrência com outras espécies que compõem o gênero. Os lagos da região Neártica possuem uma distância aproximada de 150 e 300km entre eles, enquanto os exemplares brasileiros encontrados na Lagoa Fechada e no reservatório de Furnas, possuem uma distância aproximada de 1.200km por vias hidrológicas. No entanto, os haplótipos da região Neártica, apesar de relativamente próximos geograficamente, não possuem conexão por vias hidrológicas, são distantes geneticamente e, provavelmente, compõem espécies distintas (Elías-Gutierrez et al., 2008), enquanto os exemplares brasileiros, mesmo com quatro vezes a distância geográfica, formam um único haplótipo na planície de inundação do alto Rio Paraná.

Como as bases de dados ainda consideram esses complexos de espécies como um único táxon, com uma ampla distribuição, alguns estudos, como os ecológicos, podem repassar informações incorretas. Uma ferramenta atual e amplamente difundida na macroecologia, é a modelagem de nicho ecológico, sendo essencial para compreender melhor os padrões de distribuição das espécies e como as mudanças nos padrões climáticos podem afetar diferentes populações em uma determinada área (Peterson and Soberón 2012). No entanto, esse tipo de análise pode ser bastante arriscada com os indivíduos zooplanctônicos, uma vez que já são conhecidos grandes complexos de indivíduos em regiões climáticas muito distintas (Elías-Gutierrez et al. 2008, Bekker et al. 2016). Fazer a extração dessas coordenadas de ocorrência em bases de dados sem um filtro taxonômico adequado, pode levar a um modelo não real com diferentes espécies que são geograficamente isoladas. E assim, prever, por exemplo, cenários futuros de distribuição das espécies em uma determinada área, frente as mudanças climáticas, pode ser equivocado.

Os resultados apontaram que o clado sul-americano forma um grupo irmão com *Diaphanosoma heberti* e não com *D. birgei*. Esses resultados são um grande alerta para estudos futuros envolvendo revisões taxonômicas de Ctenopoda nas regiões Neártica e Neotropical, evidenciando a lacuna que existe no real conhecimento da diversidade de cladóceros (Forro et al. 2008). Ao interpretar as relações filogenéticas dentro de *Diaphanosoma*, Dumont et al. (2021) sugeriram a separação em duas linhagens com *status* de gênero: *Diaphanosoma* s.s. e *Neodiaphanosoma*. Conforme esperado pela morfologia, *Diaphanosoma* sp. nov. pertence à linhagem de *Diaphanosoma* s.s., embora o *status* de *Neodiaphanosoma* seja questionável uma vez que não existe base nomenclatural para tal interpretação.

A história taxonômica relacionada a descrição de *Diaphanosoma* sp. nov. é antiga e envolve o reconhecimento da espécie *Diaphanosoma leuchtenbergianum* Fischer, 1850 como sinônimo da européia *D. brachyurum*. Posteriormente, Korinek (1981) invalidou as ocorrências de *D. brachyurum* e descreveu a espécie americana *Diaphanosoma birgei*. Boa parte deste de histórico se deve ao fato de as descrições serem baseadas em caracteres subjetivos e variáveis, utilizando apenas o formato e tamanho da cabeça ou padrões que se alteram entre as populações (Korovchinsky 2002). No entanto, mais recentemente, algumas espécies morfologicamente semelhantes a *D. birgei* foram descritas na América do Norte, como *D. heberti* Korovchinsky, 2002 e *D. edmondsoni* Korovchinsky, 2016, mostrando que as espécies anteriormente identificadas como *D. brachyurum*, representavam linhagens distintas. Estudos de revisão taxonômica são fundamentais para o avanço da Ciência e ajudam a reduzir lacunas Lineanas e Wallaceanas. Contudo, a falta de cuidado com a taxonomia e com as literaturas descritivas, eventualmente, pode gerar algumas confusões de identificação, como no recente trabalho de Yang et al. (2025), que

identificaram parasitas em *D. leuchtenbergianum*, uma espécie inválida, sendo um erro bastante grave que evidencia a negligência taxonômica.

Com grande interesse taxonômico, os apêndices torácicos dos cladóceros são estruturas ricas em detalhes e que apresentam elevada importância para sistemática do grupo, especialmente para Anomopoda (Smirnov 1966; Kotov & Štifter 2006, Kotov 2013). Para Ctenopoda, estas estruturas têm sido negligenciadas sob a perspectiva de elevada semelhança dentro de cada gênero ou família (Elmoor-Loureiro 2005, Korovchinsky 2018). Contudo, contrariando esta ideia, os apêndices torácicos descritos para *Diaphanosoma* sp. nov. demonstraram uma série de elementos que podem apresentar impacto na maneira como são realizadas as descrições de espécies de *Diaphanosoma*. Elementos descritos no primeiro e quarto par de apêndices torácicos de *D. edmondsoni* diferem dos padrões encontrados em *Diaphanosoma* sp. nov. (figura 8), mas a estrutura do exopodito do sexto par apresenta a mesma forma geral e os mesmos elementos. Essas variações e similaridades merecem mais atenção em estudos taxonômicos de Ctenopoda, assim como são detalhadamente descritos em outros grupos de cladóceros (Goulden 1968, Sousa et al. 2016, Kotov & Taylor 2022). Entretanto, existem poucos estudos que descrevem estas estruturas em posições anatômicas adequadas ou que representam morfologia adequada (Paggi and Rocha 1999, Korovchinsky 2016), dificultando muito as comparações.

As espécies que compõem o conhecido complexo de *Diaphanosoma birgei* apresentam pequenas variações nos espinhos da margem posterior da valva, como aquelas observadas em *D. brachyurum*, *D. heberti* e *D. edmondsoni* (Korovchinsky 1992; Korovchinsky, 2002; Korovchinsky, 2016; Korovchinsky, 2018), variando apenas o número dos denticulos ou o formato e tamanho de forma sutil. O pós-abdômen de *Diaphanosoma* sp. nov., devido a presença de denticulos anais, diferencia de *D. heberti*,

enquanto que as antenas, especificamente o formato do espinho na região mais distal do basipodito da antena diferencia *Diaphanosoma* sp. nov. de *D. brachyurum*. O pós-abdômen e o espinho do basipodito da antena são estruturas que não apresentaram variações populacionais. Em *Diaphanosoma* sp. nov. as variações interpopulacionais foram observadas para os indivíduos analisados no Pantanal, Mato Grosso, em que apresentaram uma variação de 1-5 dentículos em cada grupo na valva, sendo diferente da lagoa Fechada, Mato Grosso do Sul, região tipo da espécie, com uma variação de 1-3 dentículos, com raras ocorrências de 1-4. A variação conhecida para *D. birgei* era de 2-3 dentículos na descrição original (Korinek, 1981). Em estudos posteriores a essa descrição, foi encontrada uma variação de 1-3 dentículos em populações da região Neártica (Korovchinsky 1992; Korovchinsky, 2018).

A localidade tipo de *Diaphanosoma* sp. nov., lagoa Fechada, é sazonalmente estudada desde os anos 2000 (Lansac-Tôha et al. 2009, Bonecker et al. 2013, Bonecker et al. 2020, Silva et al. 2024), com relatos frequentes de ocorrência e abundância da espécie, que até o presente estudo era identificada como *D. birgei*. Esta informação sugere a ideia de uma elevada estabilidade temporal pela frequência de ocorrência que as populações do gênero *Diaphanosoma* possuem em lagos e lagoas, como foi demonstrado por Korovchinsky (2016) na descrição de *D. edmondsoni*, que teve sua ocorrência confirmada por 59 anos no Lago Washington. Esse tipo de abordagem demonstra a importância de estudos de longa duração, que permitem uma visão bem mais aprofundada no processo de descrição taxonômica e sobre a biologia das espécies.

2.7 Conclusão

Descreve-se uma nova espécie de *Diaphanosoma* Fischer, 1850 exclusiva para a região Neotropical, evidenciando que o complexo de espécies que compõem o grupo *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981 se estende por todo o continente Americano. Ao contrário do que se pensava, os exemplares sul-americanos de *Diaphanosoma* sp. nov. são geneticamente mais próximos de *Diaphanosoma heberti* Korovchinsky, 2002, do que de *D. birgei*, demonstrando relações filogenéticas e evolutivas que deverão ser investigadas em estudos posteriores. Além dos critérios moleculares e taxonômicos que fundamentam a descrição de uma nova espécie válida, a amplitude climática, apesar da sobreposição, indica uma adaptação fisiológica para suportar regiões climáticas distintas. Esperamos que o este estudo instigue novos trabalhos taxonômicos integrativos relacionados a complexos de espécies conhecidos para Ctenopoda.

APÊNDICE A- Código de acesso genético

Tabela S1 Informações adicionais sobre o código de acesso ao Genbank e os locais de ocorrência das amostras utilizadas nas análises filogenéticas.

Táxon	ID da sequência	País de origem	Número de acesso
<i>Diaphanosoma</i> cf. <i>birgei</i>	APZ80496.1	Brasil	KU315486.1
<i>Diaphanosoma birgei</i>	WOX01358.1	Canadá	OP830074.1
<i>Diaphanosoma birgei</i>	WOX01469.1	Canadá	OP830185.1
<i>Diaphanosoma birgei</i>	ACD86175.1	Canadá	EU702144.1
<i>Diaphanosoma birgei</i>	ACD86174.1	Canadá	EU702143.1
<i>Diaphanosoma birgei</i>	ACD86173.1	Canadá	EU702142.1
<i>Diaphanosoma birgei</i>	ACD86172.1	Canadá	EU702141.1
<i>Diaphanosoma birgei</i>	AAC2537	Canadá	COAPP499-13

<i>Diaphanosoma brachyurum</i>	UQH74205.1	Polônia	ON479233.1
<i>Diaphanosoma brachyurum</i>	UQH74204.1	Polônia	ON479232.1
<i>Diaphanosoma brevireme</i>	ACD86179.1	México	EU702148.1
<i>Diaphanosoma brevireme</i>	AVA17432.1	Brasil	KY659309.1
<i>Diaphanosoma dubium</i>	WLV74903.1	China	OR453138.1
<i>Diaphanosoma dubium</i>	WLV74923.1	China	OR453158.1
<i>Diaphanosoma cf. heberti</i>	AVP51616.1	México	MG449962.1
<i>Diaphanosoma cf. heberti</i>	ACD86194.1	México	EU702163.1
<i>Diaphanosoma spinulosum</i>	AGJ51462.1	México	KC617335.1
<i>Diaphanosoma spinulosum</i>	AGJ51463.1	México	KC617336.1
<i>Latonopsis australis</i>	QNU09055.1	México	MT888352.1

Fonte: Sampaio (2025).

REFERÊNCIAS

Abreu MJ, et al., The use of PCR-RFLP to genetically distinguish the morphologically close species *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 and *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea Cladocera), *Brazilian Journal of Biology* 2010; **70**: 121–124.

Allan JD, Life history patterns in zooplankton, *The American Naturalist* 1976; **110**: 165–180.

Anderson LI, et al., A new univalve crustacean from the Early Devonian Rhynie chert hot-spring complex, *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 2003; **94**: 355–369.

Agostinho AA, Thomaz SM, Gomes LC, Fish assemblages. In: Thomaz SM, Agostinho AA, Hahn NS, (eds), *The Upper Paraná River and its Floodplain*, Leiden: Backhuys Publishers, 2004; 223–246.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A, Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies, *Molecular Biology and Evolution* 1999; **16**: 37–48.

Bekker EI, Kotov AA, Taylor DJ, DNA barcoding reveals high cryptic diversity in the North Eurasian *Moina* species (Crustacea: Cladocera), *PLOS ONE* 2016; **11**: e0161737.

- Bergamin H, Reis BF, Zagatto EAG, A new device for improving sensitivity and stabilization in flow injection analysis, *Analytica Chimica Acta* 1978; **97**: 63–70.
- Bonecker CC, et al., Temporal changes in zooplankton species diversity in response to environmental changes in an alluvial valley, *Limnologia* 2013; **2**: 114-121.
- Bonecker CC, et al., Synergistic effects of natural and anthropogenic impacts on zooplankton diversity in a subtropical floodplain: a long-term study, *Oecologia Australis* 2020; **24**: 524–537.
- Castilho MCA, et al., Life history and DNA barcode of *Oxyurella longicaudis* (Birge, 1910) (Cladocera, Anomopoda, Chydoridae), *Zoological Studies* 2015; **54**: 1–7.
- Dumont HJ, On the diversity of the Cladocera in the tropics, *Studies on the Ecology of Tropical Zooplankton* 1994; **272**: 27–38.
- Dumont HJ, et al., Toward a phylogeny and biogeography of *Diaphanosoma* (Crustacea: Cladocera), *Aquatic Ecology* 2021; **55**: 1–16.
- Elías-Gutiérrez M, et al., DNA barcodes for Cladocera and Copepoda from Mexico and Guatemala, highlights and new discoveries, *Zootaxa* 2008; **1839**: 1–42.
- Elías-Gutiérrez M, Valdez-Moreno M, A new cryptic species of *Leberis* Smirnov, 1989 (Crustacea, Cladocera, Chydoridae) from the Mexican semi-desert region, highlighted by DNA barcoding, *Hidrobiológica* 2008; **18**: 63–74.
- Elías-Gutiérrez M, et al., Improved protocols to accelerate the assembly of DNA barcode reference libraries for freshwater zooplankton, *Ecology and Evolution* 2018; **8**: 3002–3018.
- Elmoor-Loureiro LMA, *Diaphanosoma birgei* e *Diaphanosoma brachyurum*: possível necessidade de revisão das identificações no Brasil, *Acta Limnol. Brasil* 1990; **3**: 757-767.
- Elmoor-Loureiro LMA, As patas dos cladóceros: descrição e importância taxonômica, *Limnotemas* 2005; **5**: 1-22.
- Elmoor-Loureiro LMA, et al., Towards a synthesis of the biodiversity of freshwater Protozoa, Rotifera, Cladocera, and Copepoda in Brazil, *Limnologia* 2023; **100**: 126008.
- Elmoor-Loureiro LMA, Sousa FDR, Taxonomic catalog of the Brazilian Fauna: Superorder Cladocera (Crustacea: Branchiopoda), taxonomic history, diversity and distribution, *Zoologia* 2023; **40**: e23020.
- Espíndola ELG et al., Spatial heterogeneity of the Tucuruí Reservoir (State of Pará, Amazonia, Brazil) and the distribution of zooplanktonic species, *Revista Brasileira de Biologia* 2000; **60**: 179-194.
- Fick SE, Hijmans RJ, WorldClim 2: new 1 km spatial resolution climate surfaces for global land areas, *International Journal of Climatology* 2017; **37**: 4302–4315.

Fischer S, Ergänzungen, Berichtigungen und Fortsetzung zu der Abhandlung über die in der Umgebung von St. Petersburg vorkommenden Crustaceen aus der Ordnung der Branchiopoden und Entomostraceen, *Mémoires des Savants étrangers* 1850; **7**: 1–14.

Forró L, et al., Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater, *Freshwater Animal Diversity Assessment* 2008; **198**: 177–184.

Frey DG, The species of *Pleuroxus* and of three related genera (Anomopoda, Chydoridae) in Southern Australia and New Zealand, *Records of the Australian Museum* 1991; **43**: 291–372.

Frey DG, Changing attitudes toward chydorid anomopods since 1769, *Hydrobiologia* 1995; **307**: 43–55.

Frey DG, Expanded description of *Leberis aenigmatica* Smirnov (Anomopoda: Chydoridae): a further indication of the biological isolation between western and eastern Australia, *Hydrobiologia* 1998; **367**: 31–42.

Garibian PG, et al., *Bosminopsis deitersi* (Crustacea: Cladocera) as an ancient species group: a revision, *PeerJ* 2021; **9**: e11310.

Giné MF, et al., Simultaneous determination of nitrate and nitrite by flow injection analysis, *Analytica Chimica Acta* 1980; **114**: 191–197.

Golterman HL, Clymo RS, Ohnstad MA, *Methods for physical and chemical analysis of freshwaters*, Oxford: Blackwell Scientific, 1978.

Goulden CE, The systematics and evolution of the Moinidae, *Transactions of the American Philosophical Society* 1968; **6**: 1-101.

Hall TA, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series* 1999; **41**: 95–98.

Han B, et al., Why is *Diaphanosoma* (Crustacea: Ctenopoda) so common in the tropics? Influence of temperature and food on the population parameters of *Diaphanosoma dubium*, and a hypothesis on the nature of tropical cladocerans, *Hydrobiologia* 2011; **668**: 109-115.

Hasegawa M, Kishino H, Yano T, Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA, *Journal of Molecular Evolution* 1985; **22**: 160–174.

Hijmans RJ, Van-Etten J, raster: Geographic for Data Analysis, R 58arbo. Version 3.6-32, 2014; 2-12.

Junk WJ, Bayley PB, Sparks RE, The flood pulse concept in river-floodplain systems, *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences* 1989; **106**: 110–127.

Karpowicz M, et al., Distribution of *Diaphanosoma* (Diplostraca: Sididae) genus in Central Europe – morphological and molecular approach, *The European Zoological Journal* 2022; **89**: 1115–1128.

- Koroleff KJH, Determination of ammonia. In: Grasshoff K, Ehrhardt M, Kremling K, (eds), *Methods of Seawater Analysis*, New York: Verlag Chemie, 1976; 117–181.
- Korinek V, *Diaphanosoma birgei* n. sp. (Crustacea, Cladocera), a new species from America and its widely distributed subspecies *Diaphanosoma birgei* ssp. *lacustris* n. ssp., *Canadian Journal of Zoology* 1981; **59**: 1115–1121.
- Korovchinsky NM, *Sididae e Holopediidae (Crustacea: Daphniiformes)*, Moscow: Nauka, 1992.
- Korovchinsky NM, Description of two new species of *Diaphanosoma* Fischer, 1850 (Crustacea, Branchiopoda, Sididae) from the United States and Canada and species richness of the genus in North America, *Hydrobiologia* 2002; **489**: 45–54.
- Korovchinsky NM, A new species of *Diaphanosoma* Fischer, 1850 (Crustacea: Branchiopoda: Sididae) inhabits lakes of the western United States, *Journal of Limnology* 2016; **75**: 2016.
- Korovchinsky NM, *Cladocera: Ctenopoda. Families Sididae, Holopediidae & Pseudopenilidae (Branchiopoda: Cladocera)*, Weikersheim: Backhuys Publishers, 2018.
- Kotov AA, Morphology and phylogeny of Anomopoda (Crustacea: Cladocera), Moscow: KMK Scientific Press, 2013.
- Kotov, AA, Taylor DJ, *Daphnia japonica* sp. Nov. (Crustacea: Cladocera) an eastern Palearctic montane species with mitochondrial discordance, *PeerJ* 2022; **10**: e14113.
- Kotov AA, Korovchinsky NM, First record of fossil Mesozoic Ctenopoda (Crustacea, Cladocera), *Zoological Journal of the Linnean Society* 2006; **146**: 269–274.
- Kotov AA, Štifter P, *Cladocera: Family Ilyocryptidae (Branchiopoda, Cladocera, Anomopoda)*, United States: Kenobi Productions, 2006.
- Kuhn M, Building predictive models in R using the caret package, *Journal of Statistical Software* 2008; **28**: 1–26.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Molecular Biology and Evolution* 2016; **33**: 1870–1874.
- Lansac-Tôha FA, et al., Biodiversity of zooplankton communities in the Upper Paraná River floodplain: interannual variation from long-term studies, *Brazilian Journal of Biology* 2009; **69**: 539–549.
- Lievin F, Die Branchiopoden der Danziger Gegend, *Schriften der Naturforschenden Gesellschaft in Danzig* 1848; **4**: 1–52.
- Liu P, Kotov AA, Taylor DJ, Species and hybrids in the genus *Diaphanosoma* Fischer, 1850 (Crustacea: Branchiopoda: Cladocera), *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2018; **118**: 369–378.

Mackereth FJH, Heron J, Talling JF, *Water Analysis: Some Revised Methods for Limnologists*, Ambleside: Freshwater Biological Association, 1978.

Müller J, Seitz A, Differences in genetic structure and ecological diversity between parental forms and hybrids in a *Daphnia* species complex. In: Korovchinsky NM, Fryer G, (eds), *Cladocera as Model Organisms in Biology*, Dordrecht: Springer, 1995; **107**: 25–32.

Müller OF, *Zoologiae Danicae Prodrromus seu Animalium Daniae et Norvegiae Indigenarum characteres, nomina et synonyma imprimis popularium*, Havniae: Mölleri, 1776; 1-282.

Nogueira MG, Zooplankton composition, dominance and abundance as indicators of environmental compartmentalization in Jurumirim Reservoir (Paranapanema River), São Paulo, Brazil, *Hydrobiologia* 1999; **455**: 1-18.

Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, et al., vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6-10. 2018. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

Paggi JC, Da Rocha CEF, *Neodiaphanosoma* a new genus of Sididae (Branchiopoda, Ctenopoda); with description of *N. bergamini* sp. N. and comments on *N. volzi* (Stingelin 1905), *Hydrobiologia* 1999; **397**: 5-19.

Peterson AT, Soberón J, Species distribution modeling and ecological niche modeling: getting the concepts right, *Natureza & Conservação* 2012; **10**: 102–107.

Pearson K, Notes on regression and inheritance in the case of two parents, *Proceedings of the Royal Society of London* 1895; **58**, 240-242.

Prosser SWJ, et al., A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans, *Molecular Ecology Resources* 2013; **13**: 1151–1155.

R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2024. URL: <https://www.r-project.org/>

Rozas J, et al., DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets, *Molecular Biology and Evolution* 2017; **34**: 3299–3302.

Rosenthal A, Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR, *Nucleic Acids Research* 1993; **21**: 173–174.

Silva JVF, et al., 30 year review of the zooplankton in three conservation units on the Upper Paraná River, Brazil, with notes for stressors, flood pulse, and public politics, *Hydrobiologia* 2024; **852**: 23-42.

Sipaúba-Tavares LH, Bachion MA, Population growth and development of two species of Cladocera, *Moina micrura* and *Diaphanosoma birgei*, in laboratory, *Brazilian Journal of Biology* 2002; **62**: 701–711.

Sipaúba-Tavares LH, Pereira AML, Large scale laboratory cultures of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) and *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981 (Cladocera), *Brazilian Journal of Biology* 2008; **68**: 875–883.

Sipaúba-Tavares LH, Truzzi BS, Berchielli-Morais FA, Growth and development time of subtropical Cladocera *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981 fed with different microalgal diets, *Brazilian Journal of Biology* 2014; **74**: 464–471.

Smirnov NN, The taxonomic significance of the trunk limbs of the chydoridae (Cladocera), *Hydrobiologia* 1966; **27**: 337–343.

Sousa FDR, Elmoor-Loureiro LMA, Santos S, Position of the *dentifera*-group in the *Coronatella*-branch and its relocation to a new genus: *Magnospina* gen. n.(Crustacea, Chydoridae, Aloninae), *ZooKeys* 2016; **586**: 95-119.

Sousa FDR, Elmoor-Loureiro LMA, Identification key of Ctenopoda (Cladocera, Holopedidae, Sididae) taxa from Brazil with remarks on taxonomy and geographic distribution, *Zootaxa* 2021; **5047**: 53-67.

Souza-Filho EE, Evaluation of the Upper Paraná River discharge controlled by reservoirs, *Brazilian Journal of Biology* 2009; **69**: 707–716.

Straus E, Mémoire sur les Daphnia de la classe des Crustacés, *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris* 1820; **6**: 149–162.

Teixeira C, Kutner MB, Plankton studies in a mangrove. LI: The standing-stock and some ecological factors, *Boletim do Instituto Oceanográfico* 1965; **24**: 23–41.

Thomaz SM, Agostinho AA, Hahn NS, (eds), *The Upper Paraná River and its Floodplain*, Leiden: Backhuys Publishers, 2004; 391.

Thomaz SM, Bini LM, Bozelli RL, Floods increase similarity among aquatic habitats in river-floodplain systems, *Hydrobiologia* 2007; **579**: 1–13.

Trifinopoulos J, et al., W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis, *Nucleic Acids Research* 2016; **44**: 232–235.

Van Damme K, Not “*Alona*” *monacantha* Sars, 1901, but *Coronatella hardingi* (Brehm, 1957) (Crustacea: Branchiopoda: Cladocera) in the Afrotropics, *Zootaxa* 2016; **4139**: 221–232.

Van Damme K, Kotov AA, The fossil record of the Cladocera (Crustacea: Branchiopoda): Evidence and hypotheses, *Earth-Science Reviews* 2016; **163**: 162–189.

Vences M, et al., Hapsolutely: a user-friendly tool integrating haplotype phasing, network construction, and haploweb calculation, *Bioinformatics Advances* 2024; **4**: vbae083.

Wickham H, *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, New York: Springer, 2016; 1-260.

Yang C, et al., Morphological and molecular characterization of a new microsporidium, *Neoflabelliforma leuchtenbergianum* n. sp. From the adipose tissue of *Diaphanosoma leuchtenbergianum* (Crustacea: Sididae) in China, *Journal of invertebrate Pathology* 2025; **210**: 108294.

Xu S, et al., The noncosmopolitanism paradigm of freshwater zooplankton: insights from the global phylogeography of the predatory cladoceran *Polyphemus pediculus* (Linnaeus, 1761) (Crustacea, Onychopoda), *Molecular Ecology* 2009; **18**: 5161–5179.

3 Uma nova perspectiva sobre a posição filogenética e a biogeografia de *Moina minuta* Hansen, 1899 (Crustacea:Moinidae)

RESUMO

O gênero *Moina* é considerado um dos mais especiosos entre os cladóceros, sendo comparado com *Daphnia*, mas a sua história evolutiva ainda é pouco explorada, principalmente para a região Neotropical. O presente estudo explorou a morfologia de fêmeas partenogenéticas e obteve a primeira sequência da região COI de *Moina minuta* na região Neotropical, e assim pode contribuir para compreender melhor as relações evolutivas do grupo, quando comparado com espécies do velho mundo. Os resultados apontaram *M. minuta* como uma espécie menos derivada quando comparada com espécies da Europa e Ásia, dando suporte à teoria que os grupos se diferenciaram há mais tempo do que o esperado, e passaram por um processo de evolução independente. Com o uso dos dados morfológicos integrados aos moleculares, foi possível fundamentar hipóteses propostas anteriormente sobre o processo de reversão dentro do gênero, principalmente envolvendo o complexo de espécies *M. salina*-*M. mongolica*. Esperamos que este estudo estimule novas pesquisas de taxonomia integrativa de moinídeos para a região Neotropical, permitindo a fundamentação de hipóteses biogeográficas.

Palavras-chave: Biodiversidade; Filogeografia; Genética; Novo Mundo.

A new perspective on the phylogenetic position and biogeography of *Moina minuta* Hansen, 1899 (Crustacea: Moinidae)

ABSTRACT

The genus *Moina* is considered one of the most speciose among cladocerans, comparable to *Daphnia*, yet its evolutionary history remains poorly explored, especially in the Neotropical region. This study examined the morphology of parthenogenetic females and obtained the first COI sequence of *Moina minuta* from the Neotropical region, contributing to a better understanding of the group's evolutionary relationships when compared to Old World species. The results indicated that *M. minuta* is a less derived species compared to those from Europe and Asia, supporting the theory that these groups diverged earlier than previously expected and underwent an independent evolutionary process. By integrating morphological and molecular data, the study was able to support previously proposed hypotheses about the reversal process within the genus, particularly involving the *M. salina*–*M. mongolica* species complex. We hope this study encourages further research on integrative taxonomy of moinids in the Neotropical region, providing a foundation for biogeographic hypotheses.

Keywords: Biodiversity; Phylogeography; Genetics; New World.

3.1 Introdução

A Superordem Cladocera Latreille, 1829 é composta por mais de 700 espécies válidas divididas em quatro ordens (Smirnov, 2017). A distribuição do grupo é considerada cosmopolita e os organismos participam ativamente do fluxo de energia pelo seu impacto ecológico na intensa pressão de pastagem sobre o fitoplâncton (Allan, 1976). Ademais, as espécies ocupam os diferentes compartimentos aquáticos, vivendo na região pelágica, bentônica e litorânea, e transitam entre eles através dos processos de migração vertical e horizontal (Bledzki & Rybak, 2018). Nesses compartimentos também se alimentam de outros recursos, não sendo exclusivamente herbívoras, o que lhes confere uma ampla amplitude de nicho ecológico. No Brasil, país caracterizado pelo clima tropical e pela abundância de ambientes de água doce (Alvares et al. 2013), os cladóceros são os organismos planctônicos mais estudados, tanto em aspectos ecológicos, quanto taxonômicos, mas com uma grande lacuna na caracterização molecular das espécies (Castilho-Noll et al. 2023).

Com o uso de ferramentas integrativas nos estudos com os grupos planctônicos, o conceito ecológico de que os organismos microscópicos estão distribuídos em todos os locais (Baas-Becking, 1934) está ficando obsoleto (Elías-Gutiérrez et al. 2008; Xu et al. 2009; Elías-Gutiérrez & Valdez-Moreno, 2023). Com a construção de árvores filogenéticas utilizando dados moleculares somado à estudos morfológicos, o processo de identificação de complexos de espécies foi otimizado (Bekker et al. 2016; Liu et al. 2018; Makino et al. 2023), uma vez que esses organismos amplamente distribuídos foram identificados como espécies morfológicamente semelhantes, mas geneticamente isoladas (Elías-Gutiérrez & Valdez-Moreno, 2008). Na região Neotropical, especialmente no Brasil, estudos filogenéticos com dados moleculares de espécies crípticas de cladóceros são extremamente escassos (Abreu et al. 2010; Castilho et al. 2015; Garibian et al. 2021), evidenciando uma grande urgência de estudos para o futuro (Elmoor-Loureiro et al. 2023).

O gênero *Moina* Baird, 1850 é um dos mais especiosos que compõem a ordem Anomopoda (Goulden, 1968; Bekker et al. 2016; Neretina et al. 2024) e surgiu há aproximadamente 217 milhões de anos, no período Triássico, mantendo conservada as suas características morfológicas (Van Damme et al. 2022). Hudec (2010), após um extenso estudo taxonômico, mas regionalmente limitado, definiu o subgênero *Exomoina* com base em critérios morfológicos, o qual foi posteriormente foi elevado a nível de

gênero por Dumont et al. (2013) com o uso de dados moleculares. No entanto, esses passos foram bastante precipitados e criticados pela limitação da área de estudo do gênero e pelo uso de poucos dados moleculares (Kotov, 2013; Bekker et al. 2016; Neretina et al. 2024). Com grande extensão geográfica, estudos moleculares recentes sugerem um grande complexo de espécies em moínídeos da América do Norte e Central (Elías-Gutiérrez et al. 2008), Europa e Eurásia (Bekker et al. 2016) e Ásia (Ni et al. 2019), sendo inexistente uma caracterização molecular de espécies sul-americanas, impedindo uma discussão mais fundamentada sobre o grupo.

A espécie Neotropical *Moina minuta* Hansen, 1899 foi descrita inicialmente seguindo critérios taxonômicos com pouca relevância para os padrões atuais e posteriormente foi redescrita por Goulden (1968), com a primeira descrição de um macho e de uma fêmea efipial de *M. minuta* realizadas por Paggi (1973). Após o extenso trabalho de revisão de Goulden (1968) para a família Moinidae Goulden, 1968, as espécies *Moinodaphnia brasiliensis* Stingelin, 1904 e *Moina minima* Splan, 1926 foram sinonimizadas com *M. minuta*, separando esses organismos da família Daphniidae. Alguns caracteres variáveis, como o tamanho do olho e a sua posição relativa, eram mais semelhantes com os trabalhos de Stingelin (1904) e Splan (1926) do que com os descritos por Goulden (1968) para *M. minuta* (Paggi, 1973). No entanto, características de extrema relevância taxonômica (autapomorfias), como as estruturas do primeiro apêndice torácico e do pós-abdômen, seguiam o descrito por Goulden (1968) e Paggi (1973). Estas variações morfológicas e todo o seu complexo processo de descrição, carecem de dados moleculares e estudos taxonômicos robustos para reforçar estas variações taxonômicas como variações populacionais.

De modo geral, para os metazoários, a abordagem mais comumente empregada em estudos de taxonomia molecular, é a utilização de um fragmento do gene mitocondrial Citocromo c Oxidase subunidade I (*COI*). Essa estratégia tem se mostrado eficaz na distinção de espécies morfológicamente semelhantes (Lynch & Jarrell, 1993; Hebert et al., 2003; Meyer & Pauley, 2005; Bucklin et al., 2010; Dumont et al., 2021). O primeiro estudo a utilizar a taxonomia molecular como ferramenta para a resolução de problemas filogenéticos em Chydoridae, com base nas sequências dos genes mitocondriais *COI* e 16S rDNA, além do gene nuclear 18S rDNA, revelou uma nova

relação filogenética entre os gêneros das subfamílias Eurycercinae, Saycinae, Chydorinae e Aloninae (Sacherová & Hebert, 2003).

Portanto, neste estudo, (i) sequenciamos a região *COI* de *Moina minuta* Hansen, 1899, contribuindo com o conhecimento da diversidade genética de Cladocera para a região Neotropical, (ii) investigamos a validade do gênero *Exomoina* Hudec, 2010 por meio de dados moleculares, (iii) avaliamos a morfologia de fêmeas partenogênicas de *M. minuta* e (iv) apresentamos *insights* sobre a história evolutiva do gênero *Moina* Baird, 1850.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Área de estudo

A planície de inundação do Alto rio Paraná (PR/MS) (22°40' - 22°50' S; 53°10' - 53°24' W), em território brasileiro, abrange aproximadamente 802,150 km² (Figura 1). Localizada entre os reservatórios de Porto Primavera (SP) e Itaipu (PR), esse ecossistema é formado por uma heterogeneidade de ambientes aquáticos com seus diferentes graus de conectividade, caracterizado como rios, canais, ressacos, lagoas temporárias e permanentes (Agostinho et al. 2004; Souza-Filho, 2009).

3.2.2 Delineamento de amostragem

A amostragem foi realizada na lagoa Fechada, localizada na sub-bacia do rio Baia, no estado de Mato Grosso do Sul (Figura 1), em março de 2024, juntamente com as amostragens do projeto Pesquisa Ecológica de Longa Duração (PELD/CNPq): A planície de inundação do alto rio Paraná (PELD-PIAP).

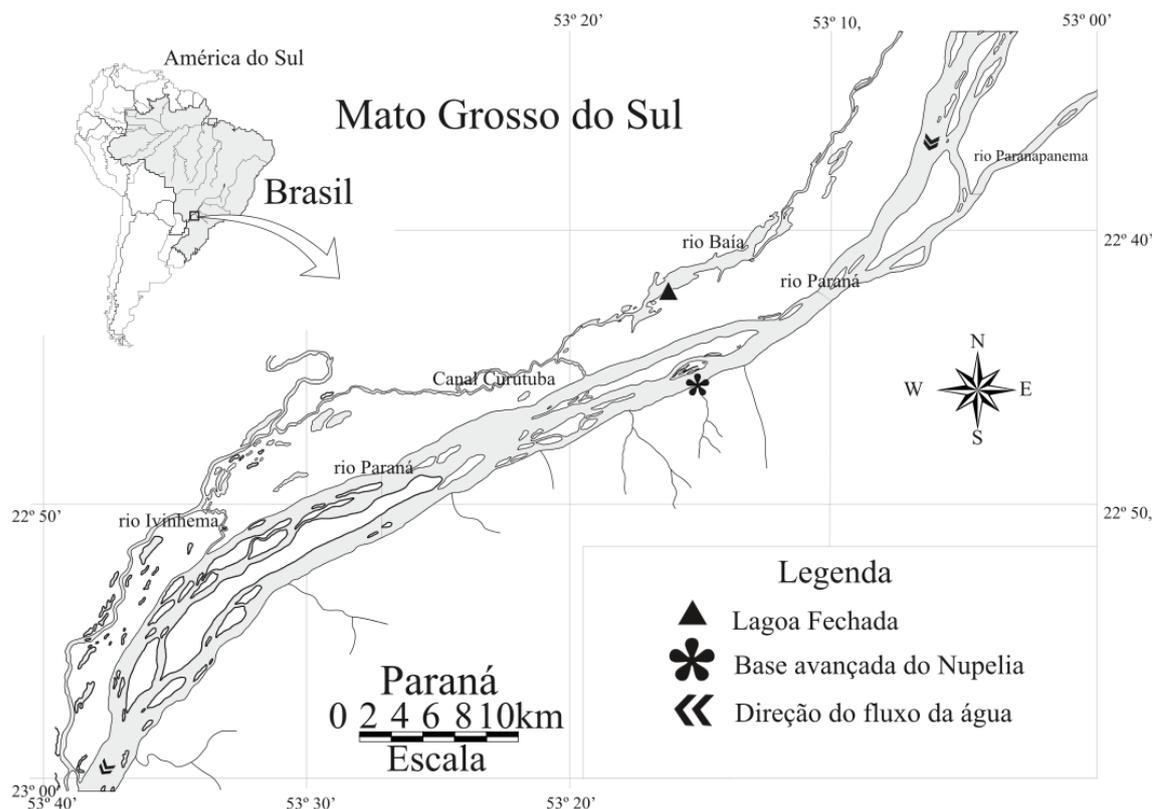


Figura 1. Mapa da área de estudo na planície de inundação do Alto rio Paraná, com a localização do local de amostragem.

3.2.3 Amostragem, identificação e análise taxonômica

Uma amostra foi coletada de forma composta nas regiões pelágicas e litorâneas, próximo a macrófitas aquáticas na lagoa, por arrasto vertical e horizontal, com rede de plâncton (68 μ m). Imediatamente, os organismos foram concentrados com auxílio de uma rede de mesma malhagem e fixados com etanol absoluto (Êxodo Científica[®], COD: AE07145RA) resfriado. A amostra foi acondicionada em freezer por uma semana e mantida à 5°C posteriormente, conforme estabelecido por Prosser et al. (2013) e Elías-Gutiérrez et al. (2018).

Em laboratório, foram triados indivíduos de *Moina minuta* Hansen, 1899, identificados de acordo com Goulden (1968); Paggi (1973) e Elmoor-Loureiro (1997), acondicionado individualmente em eppendorf com 10 ml de água Milli-Q e congelado para posterior sequenciamento. Para a caracterização morfológica, os espécimes foram colocados em gotas de glicerina sobre lâminas de vidro, cobertos com lamínulas e analisados sob microscópio óptico de contraste de fase Olympus BX41, para melhorar a

visualização de estruturas anatômicas (valvas; antenas, antênulas, pós-abdômen e apêndices torácicos) e depois dissecados m auxílio de alfinetes e colocados em lâminas com glicerina. A enumeração das cerdas sobre os apêndices torácicos foram organizadas de acordo com o critério de homologia estabelecido para Anomopoda (Kotov 2000a, 2000b; Kotov et al 2005). Ilustrações foram realizadas com auxílio de câmara-lúcida e transformadas em arquivos digitais usando mesa digitalizadora e um software livre e de código aberto para edição de gráficos vetoriais, Inkscape.

O acesso ao patrimônio genético dos indivíduos analisados foi autorizado pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen nº A07E682.

Abreviações nas figuras e texto: ejh – ganchos ejetores; en – endito; ep – epipodito; ex – exopodito.

3.2.4 Extração, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento

A extração do DNA de organismo inteiro foi realizada utilizando o kit em colunas QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®), conforme o protocolo sugerido pelo fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific®).

Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizado um termociclador ProFlex™ 3 x 32-well PCR System da Applied Biosystems®. A reação para a amplificação do DNA dos cladoceros foi realizada com 1,25 U de Supreme NZYTaq II DNA polymerase (5 U/μL, NZYtech), Reaction buffer 10x (2,5 μL), 2,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 0,25 μM de cada primer específico para a região mitocondrial do citocromo c oxidase subunidade I (COI), DNA molde (10 ng) e água Milli-Q para um volume final de 25 μL. Os *primers* utilizados e as condições de PCR estão apresentados na Tabela 01.

Tabela 01. Marcador molecular e *primer* Zplank com as sequências (5'-3') e as condições para a amplificação do DNA dos espécimes de *Moina minuta* na planície de inundação do Alto rio Paraná.

Marcador	Primers (5'-3')	Condição PCR	Referências
<i>COI</i>	ZplankF1_t1 (TCTASWAATCATAARGATATTGG) ZplankR1_t1 (TTCAGGRTGRCCRAARAATCA)	1 ciclo de 5 min a 95°C, 40 ciclos de 30 s a 94°C (desnaturação), 30 s a 42°C (anelamento) e 30 s a 72°C (extensão), seguido por 1 ciclo de 10 min a 72°C	Prosser et al. (2013) Bekker et al. (2016)

	(extensão), seguido por 1 ciclo de 6 min a 72°C	
--	--	--

Os produtos amplificados foram verificados em gel de agarose 1% e o tamanho dos fragmentos foi estimado com a utilização de um marcador de peso molecular conhecido (DNA *Ladder* 100 pb). Os produtos obtidos da amplificação do DNA foram purificados seguindo protocolo descrito por Rosenthal et al. (1993). O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático ABI 3500 da Applied Biosystems® e utilizando o kit BigDye® Terminator.

3.2.5 Análise dos dados

As sequências obtidas foram ajustadas manualmente pelo software BioEdit v7 (Hall, 1999). O alinhamento foi realizado utilizando o programa MEGA11 (Kumar et al. 2016), a partir do algoritmo de alinhamento múltiplo CLUSTAL W. A ferramenta BLASTn foi usada com o objetivo de comparar as sequências obtidas com aquelas disponíveis no GenBank®. Foram adicionadas nas análises sequências de organismos do gênero *Moina* Baird, 1850, apenas de suas regiões tipo e de trabalhos publicados disponíveis no GenBank® (APÊNDICE B), para comparar com as sequências de *Moina minuta* Hansen, 1899 obtidas da planície de inundação. Como grupo externo foi adicionada uma sequência de *Moinodaphnia macleayi* (KC617721).

Para realizar o cálculo da distância K2P foi utilizado o programa MEGA7. O modelo de substituição nucleotídica selecionado pelo software IQ-TREE (Trifinopoulos et al. 2016) foi o HKY + G4 (Hasegawa et al. 1985). A reconstrução filogenética foi realizada utilizando o MEGA11 pelo método de máxima verossimilhança com 1000 reamostragens de *bootstrap*.

3.3 Resultados

Para *Moina minuta* Hansen, 1899 não há sequências genéticas disponíveis nos bancos de dados para comparação. No entanto, os seis indivíduos sequenciados são geneticamente distantes de todas as outras espécies do gênero disponíveis no BOLD e GenBank® com distâncias K2P variando de 13,9 a 21,1% (APÊNDICE B). Também

pode-se observar na árvore gênica (Figura 2) o posicionamento basal de *M. minuta*, quando comparado a espécies do velho mundo.

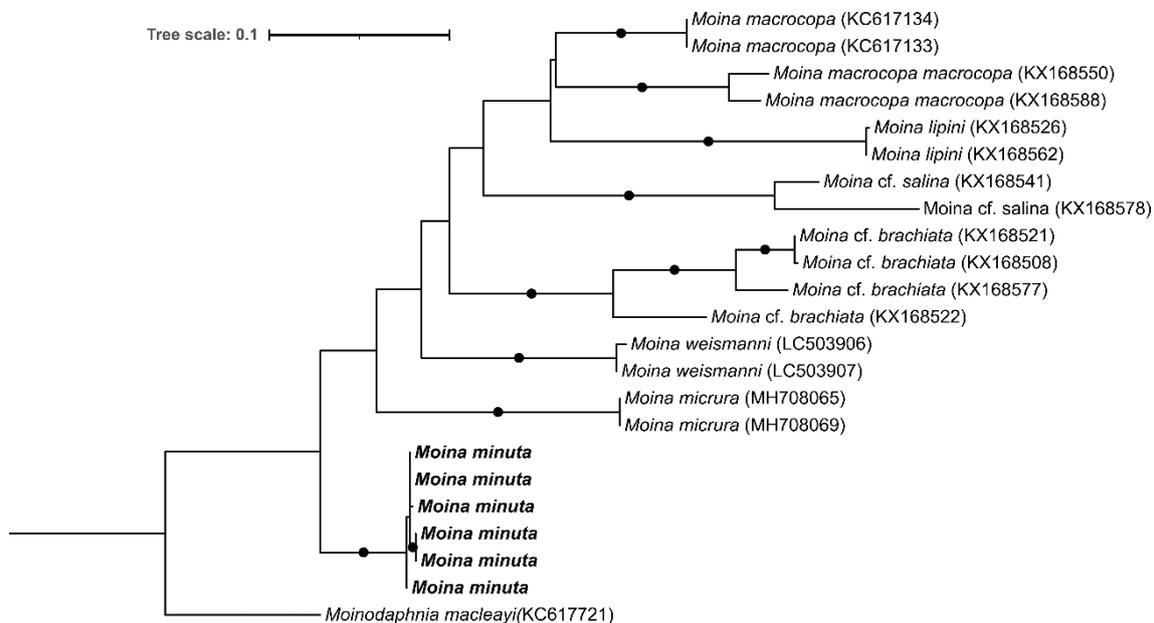


Figura 2. Árvore gênica construída pelo método de máxima verossimilhança com as espécies de *Moina* disponíveis em bases de dados e com as sequências de *Moina minuta* da região Neotropical. Os círculos pretos indicam valores de bootstrap > 0,8.

As espécies *Moina* cf. *brachiata* Jurine, 1820 e *Moina* cf. *salina* Daday, 1888 demonstraram uma posição filogenética esperada no cladograma (Bekker et al., 2016; Ni et al., 2019), não agrupando os indivíduos pelo baixo suporte para a sequências avaliadas, mas evidenciando a sua proximidade com um processo de especiação recente.

Por mais que as espécies que Hudec (2010) atribuiu ao gênero *Exomoina* estejam próximas no cladograma, os valores de distância genética entre elas ainda são bastante elevados (APÊNDICE B). No caso de *Moina minuta*, os exemplares de *Moina* cf. *salina* foram os indivíduos que apresentaram os maiores valores de distância genética. (para dados de distância, ver APÊNDICE B). A posição filogenética e os valores de distância evidenciam que não há suporte algum para a subdivisão do gênero *Moina*.

3.3.1 Sistemática

Classe Branchiopoda Latreille, 1817**Ordem Anomopoda Sars, 1865****Família Moinidae Goulden, 1968****Gênero *Moina* Baird, 1850*****Moina minuta* Hansen, 1899**

(figuras 3, 4 e 5)

Localidade tipo: de acordo com Hansen, (1899); Goulden, (1968), Foz do rio Tocantins, bacia Araguaia-Tocantins, Pará, Brasil.

Material tipo: holótipo considerado inexistente. Goulden (1968) analisou espécimes coletados na Guatemala e os depositou no Museu Britânico de História Natural, contudo, não designou lectótipos e paralectótipos por não utilizar material da série tipo.

Material examinado: Vinte e cinco fêmeas partenogênicas da Lagoa Fechada, (22°51'24"S,53°36'01"O), rio Baía, Mato Grosso do Sul, Brasil. Março de 2024, Coletor: Matheus Juan Alarcon Sampaio.

Descrição da fêmea partenogênica adulta

Aspecto geral (figura 3 – A-C). Corpo alongado comprimento variando entre 700-920 µm, relação altura/comprimento variando entre 1,4-1,9. Fêmeas ovadas apresentam o corpo marcadamente alto (para dados morfométricos, ver tabela 2).

Tabela 2. Dados morfométricos obtidos a partir de *Moina minuta* Hansen, 1899 da Lagoa Fechada com variação de tamanho (Range), valor médio, desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV).

	<i>N</i>	Range (µm)	Média (µm)	SD (µm)	CV (%)
Comprimento (µm)	15	920 – 700	769,2	58,3	7,6
Altura do ponto médio (µm)	15	655 – 355	466,9	83,0	17,8
Altura máxima (µm)	15	695 – 355	490,8	92,0	18,7

Comprimento cabeça (μm)	15	330 – 195	285,8	37,5	13,1
Largura cabeça (μm)	15	305 – 175	233,1	35,7	15,3

Carapaça (figura 3 - D).

Margem ventral com porção mediana sutilmente côncava, apresentando cerdas e dentículos; as cerdas são rígidas com aspecto de espinho, até 14 cerdas presentes; os dentículos estão organizados em até 8 grupos dos quais o mais proximal não apresenta diferenciação morfológica entre os dentículos; um espaço livre de cerdas ou espinhos separando o primeiro grupo de dentículos (indicado na Figura 3-D); os outros grupos apresentam um dentículo mais robusto seguindo por dentículos que diminuem em tamanho em sentido proximal; um espaço livre de cerdas e dentículos separa a margem posterior da valva. Margem

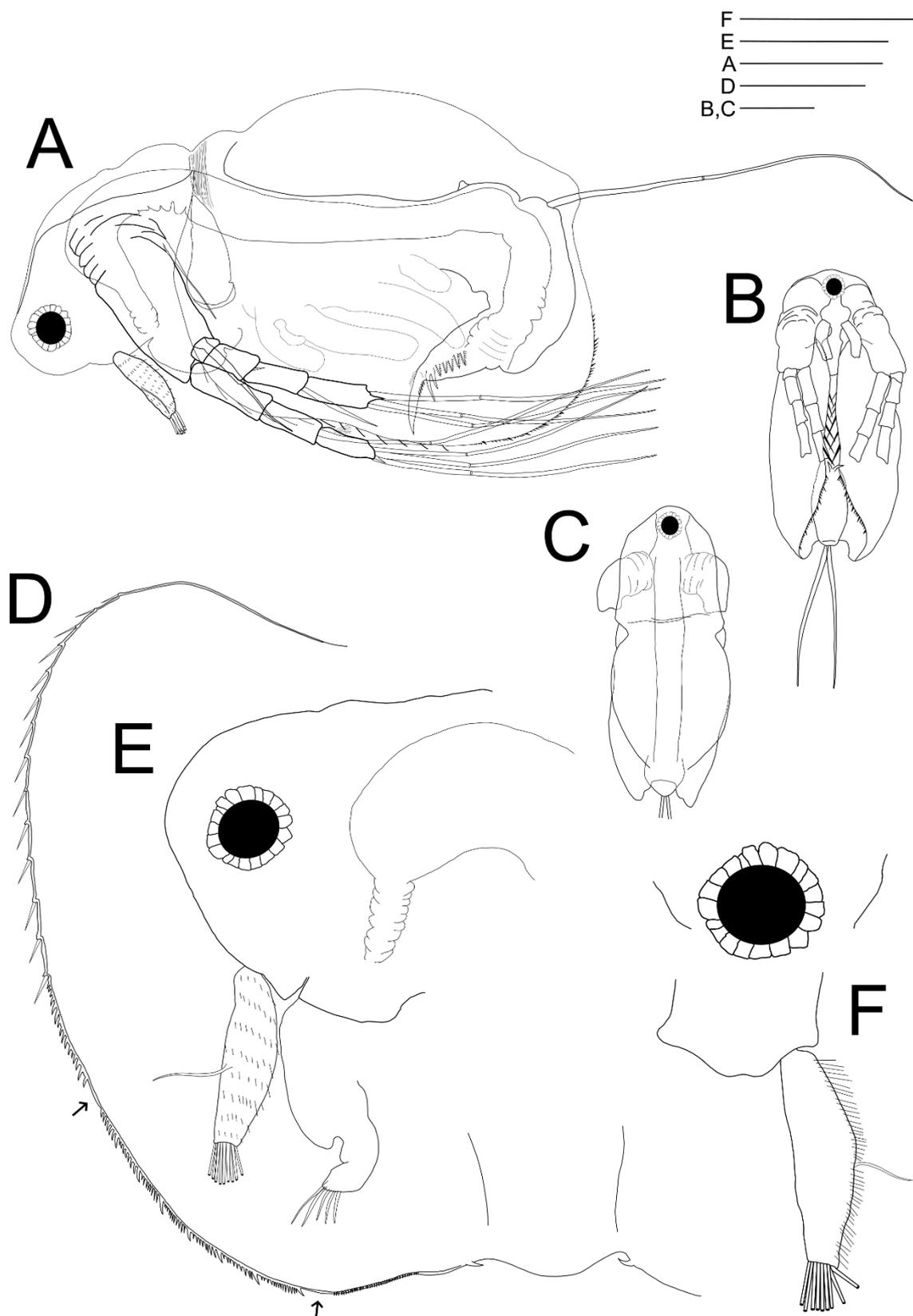


Figura 3. *Moina minuta* fêmeas da lagoa Fechada. A) aspecto geral. B) visão ventral. C) visão dorsal. D) estruturas que compõem a valva em sua região ventral, postero-ventral e posterior. E) forma geral da região cefálica, com enfoque na antênula e labro. F) olho composto e antênula. Escalas A, B e C de 100 μm e D, E e F de 50 μm .

posterior apresentando um grupo de espículas. Margem dorsal marcadamente arqueada. Ângulo posterior dorsal projetado, largo e com ápice arredondado. *Cabeça* (figura 3) arredondada representando aproximadamente 1/3 do tamanho corporal, depressão supraocular pode ser sutil ou bem marcada.

Estruturas cefálicas (figuras 3 E-F e 4 A).

Olho composto com diâmetro variando de 41-50 µm, ocelo ausente. *Rostro* (figura 3). Não proeminente. *Labro* (figura 3) reduzido, cerca de três vezes mais comprido do que largo, duas vezes menor do que basipodito da antena II, região proximal robusta, região distal com uma reentrância e cerdas espessas em sua margem. *Antênula* – A1 (figura 3). Alongada, cerca de 3,3 vezes mais comprida do que larga; corpo antenular recoberto por finas e curtas cerdas. Cerdas sensorial similar em comprimento ao corpo antenular. Nove cerdas olfativas na extremidade distal. *Antena* – A2 (figura 4). Basipodito robusto; cerdas da coxa de tamanhos diferentes, a mais distal cerca de 0.7 do comprimento da cerda mais proximal; porção distal apresentando duas cerdas sensoriais sendo uma delas curta e delgada; cerda sensorial distal similar em comprimento com a cerda proximal da coxa. Ramo de comprimentos distintos. Exopodito menor do que o endopodito, com quatro segmentos; segundo segmento com um espinho cerca de 3.9 vezes menor do que o comprimento do próprio segmento; terceiro segmento com uma cerda apical, plumosa, cerca de duas vezes menor que as cerdas apicais do quarto segmento; quarto segmento com um espinho de relativamente mais longo do que o espinho do segundo segmento, três cerdas plumosas de comprimentos similares presentes. Endopodito com três segmentos; primeiro segmento cerca de 1.3 vezes maior do que o segundo segmento, com uma cerda curta e plumosa com comprimento de 0.2 da cerda apical do segundo segmento; segundo segmento apresentado uma longa cerda plumosa; terceiro segmento apresentando um agrupamento de finas e curtas cerdas laterais, três cerdas apicais plumosas. Fórmula antennal (exo/endo): spines 0101/001, setae 0033/113.

Apêndices torácicos (figuras 4 B-E e 5 A-E): Seis pares de apêndices torácicos.

Primeiro apêndice (figura 4 B-C). Epipodito não estudado. IDL (en4) com três cerdas, duas cerdas apicais longas e plumosas (a-b) e uma cerda lateral marcadamente curta (1). Endito 3 com uma cerda longa e plumosa. Endito 2 com duas cerdas plumosas de comprimentos similares (c-d). Endito 1

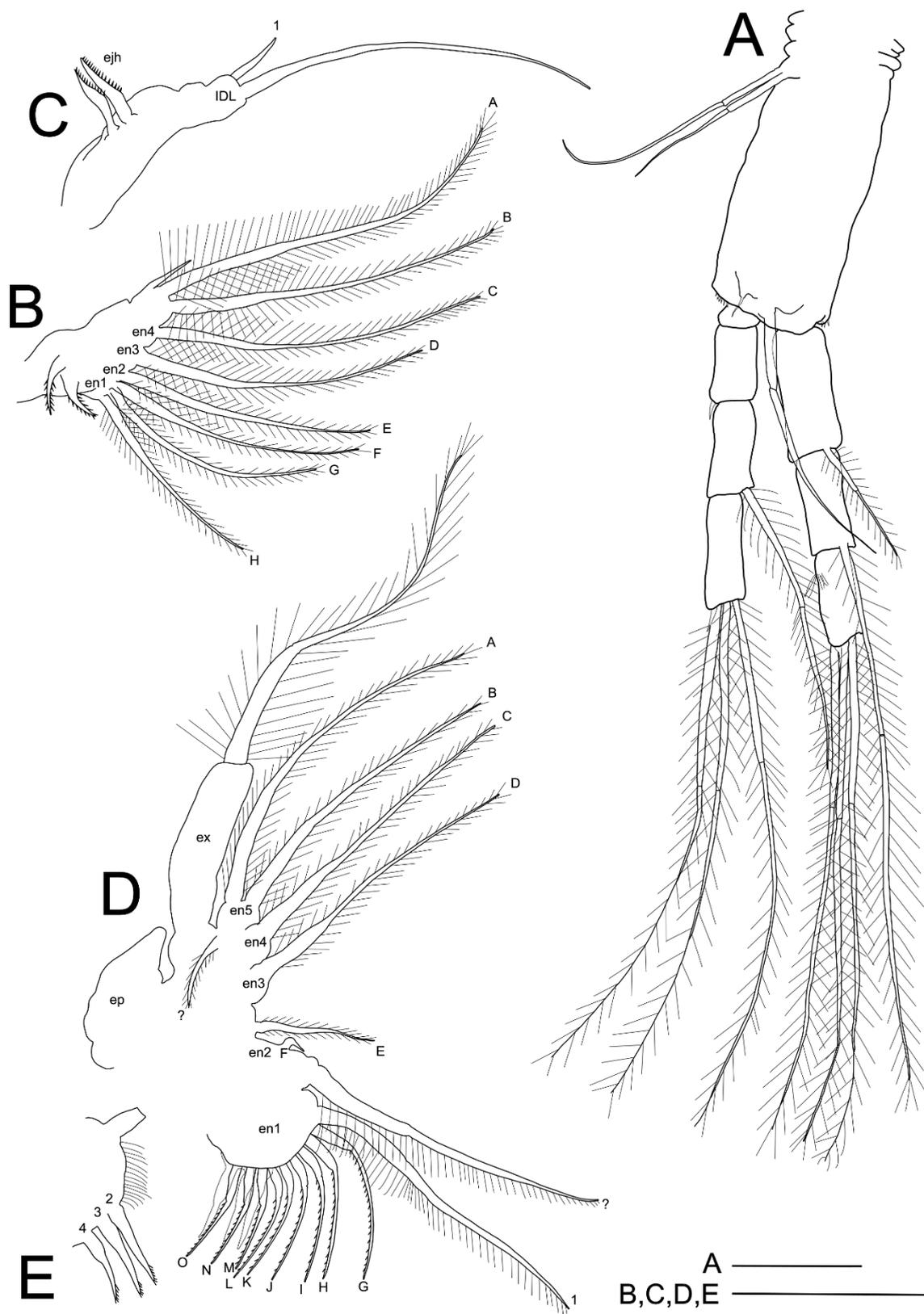


Figura 4. *Moina minuta* fêmeas da lagoa Fechada. A) forma geral da antena. B) primeiro par de apêndice torácico. C) enfoque no IDL do primeiro par de apêndice torácico. D) segundo par de apêndice torácico. E) en1 do segundo par de apêndice torácico. Escalas A, B, C, D e E de 50 μ m.

com três cerdas plumosas de comprimentos similares (f-h). Ganchos ejetores de comprimentos similares, ornamentados com espinhos a partir da metade distal.

Segundo apêndice (figura 4 D-E).

Epipodito apresentando um pequena projeção distal. Exopodito alongado apresentando uma longa cerda plumosa apical e uma cerda de homologia desconhecida (?). Endito 5 com duas longas cerdas plumosas de comprimento similares (a-b). Endito 4 com uma única cerda longa e plumosa (c). Endito 3 com uma única cerda longa e plumosa (d). Endito 2 apresentado três cerdas, cerda (e) plumosa, cerda (f) marcadamente curta e geniculada, uma cerda sem homologia definida (?). Endito 1 (gnatobase) com dois grupos de cerdas; grupo anterior com quatro cerdas (1-4), cerdas (2-4) apresentando comprimento e morfologia similares e a cerda 1 com comprimento maior que as demais; grupo posterior com nove cerdas (g-o).

Terceiro apêndice (figura 5 A-B).

Epipodito oval. Exopodito subquadrangular apresentando quatro cerdas distais (1-4) e duas laterais (5-6), todas plumosas. Cerdas 1,3-4 de comprimentos similares. Cerda 2 cerda de 0.8 do comprimento da cerda 1. Cerda 5 marcadamente curta, cerca de 9 vezes menor do que a cerda 6. Cerda 6 marcadamente mais longa do que as outras cerdas. Porção Interna distal apresentando dois enditos; endito distal com uma anterior cerda (1) e uma cerda posterior (a); próximo endito com uma cerda anterior (2) e duas cerdas posteriores (c-d). Os outros enditos estão fundidos formando uma placa filtradora que apresenta inúmeras cerdas.

Quarto apêndice (figura 5 C-D).

Epipodito subquadrangular. Exopodito subquadrangular apresentando quatro cerdas distais (1-4) e duas laterais (5-6), todas plumosas. Cerdas 2-4 e 6 com comprimento similares. Cerdas 1 e 5 marcadamente menores do que as outras cerdas; cerda 1 cerca de 2,2 vezes maior do que a cerda 5. Porção Interna distal apresentando três enditos; endito 5 com uma cerda posterior menor (1) e uma cerda anterior maior (a); endito 4 com uma cerda anterior (2) e duas cerdas posteriores (b-c); endito 3 com uma cerda anterior (3) e

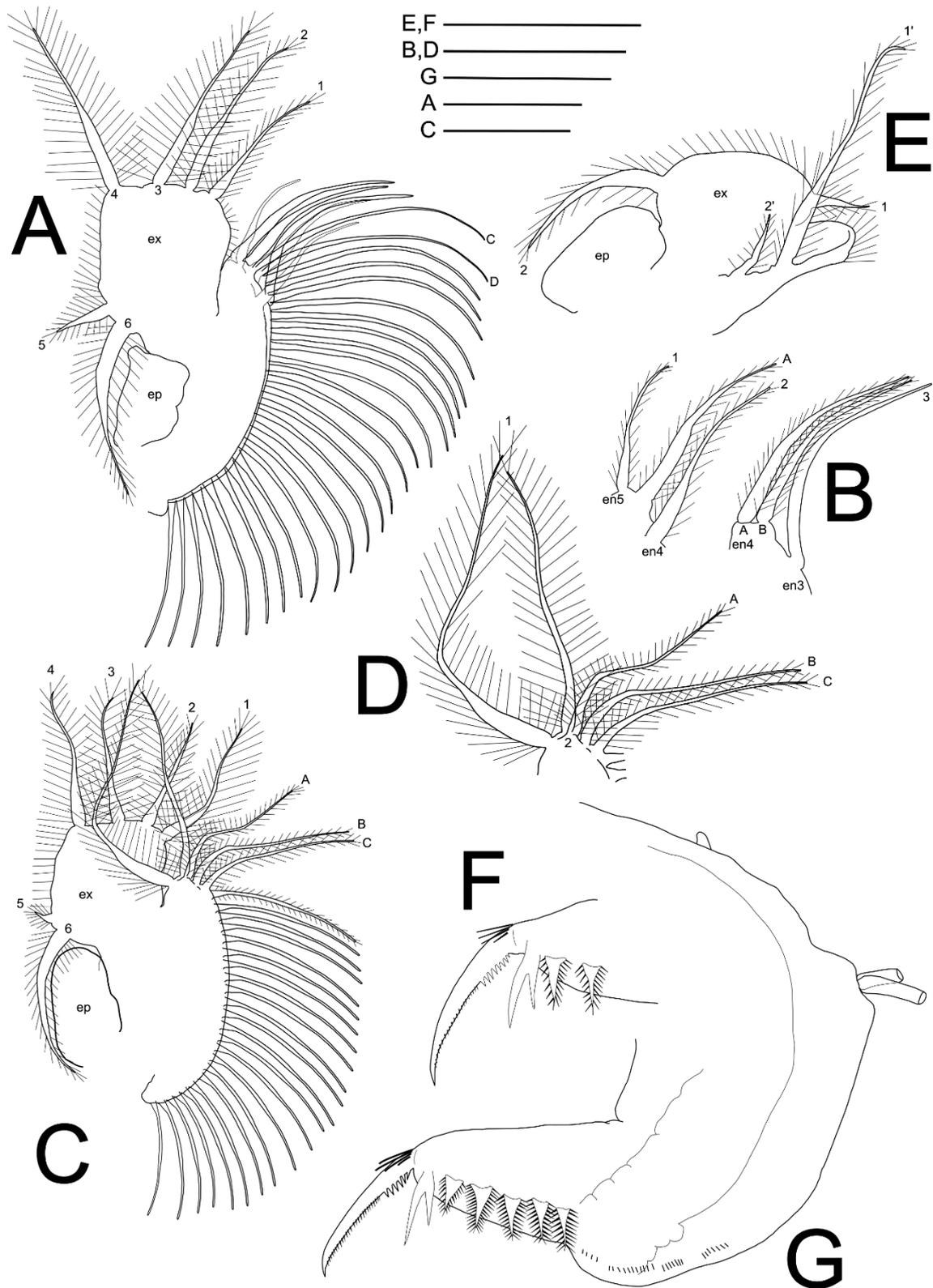


Figura 5. *Moina minuta* fêmeas da lagoa Fechada. A) terceiro par de apêndice torácico. B) cerdas da região posterior do endito do terceiro par de apêndice torácico. C) quarto par de apêndice torácico. D) cerdas da região posterior do endito do quarto par de apêndice torácico. E) quinto par de apêndice torácico. G e F) estruturas abdominais e pós-abdominais. Escalas A, B, C, D, E, F e G de 50 μ m.

quatro cerdas posteriores (d-g). Os outros enditos estão fundidos formando uma placa filtradora que apresenta inúmeras cerdas.

Quinto apêndice (figura 5-E).

Epipodito alongado, oval. Exopodito com formato ovalado e recoberto de sétulas, duas cerdas presentes (1-2); cerda (1) cerca de três vezes menor do que a cerda 2. Lobo interno aproximadamente três vezes mais comprido que largo, com sétulas preenchendo a sua superfície mais distal, com a presença de duas cerdas, cerda (1') cerca de três vezes maior que a cerda (2').

Estruturas Abdominais e pós-abdominais (figura 5 F-G).

Processo abdominal relativamente curto. *Pós-abdômen* (figura 5). Alongado, porção pós-anal em forma de cone. Porção pós-anal relativamente longa e marcadamente arredondada, apresentando espículas laterais. Margem ventral relativamente reta. Porção pós-anal com 4-5 dentes cônicos de base espessa, recobertos de sétulas laterais, um único dente bífido assimétrico, aproximadamente duas vezes maior que os dentes cônicos. Garra é pouco menor que a porção pós-anal do pós-abdômen, apresentado de pequenas espículas na face ventral de sua base (Figura 5 F-G); pécten está organizado em dois grupos sendo o grupo proximal com 6-9 espinhos robustos de base larga, segundo grupo formado por seguidos espículas finas e curtas.

Macho e fêmea efipial: descritos em Paggi (1973).

Diagnose diferencial (figuras 3, 4 e 5).

A espécie *Moina minuta* apresenta uma característica muito marcante, que é a ausência de uma cerda rígida no endito 3 do primeiro par de apêndice torácico, característica esta, que só foi descrito no complexo *M. mongolica-M. salina* (Goulden, 1968; Smirnov, 1976; Alonso et al., 2019), sendo, sem dúvida, uma das características mais importantes para o diagnóstico da espécie. Além disso, considerando espécies que são registradas para a região Neotropical (Elmoor-Loureiro, 1997), o dente bífido do pós-abdômen é essencial para a diagnose da espécie. Dente bífido assimétrico e a ausência de

uma seta rígida anterior no endito 3, já separa *M. minuta* de todas as outras espécies que ocorrem no Brasil, sendo *Moina rostrata* McNair, 1980, *Moina reticulata* Daday, 1905, *Moina dumonti* Kotov, Elías-Gutiérrez & Granados-Ramírez, 2005 e *Moina micrura* Kurz, 1874. Além disso, é importante ressaltar que *M. micrura* representa um extenso complexo de espécies distribuído pelo planeta (Elías-Gutiérrez et al., 2019) que precisa ser investigado para a região Neotropical. Como a única espécie descrita até o momento com essa característica para o novo mundo é a *M. minuta*, esta não deve ser confundida com o complexo *M. mongolica*-*M. salina*, principalmente pela distribuição do grupo, mas algumas características marcantes no pós-abdômen, como descrito por Goulden (1968), distinguem estas espécies, principalmente a forma geral e o primeiro *pecten* de espinhos robustos presente em *M. minuta*, semelhante ao visto em *Moina brachiata* Jurine, 1820. Após o trabalho de Elías-Gutiérrez et al. (2019), certamente os exemplares de identificados como *Moina macrocopa* Straus, 1820 precisam ser revisados para a região Neotropical, podendo representar um grande complexo de espécie que se estende para a América do Sul. Ainda na região Neotropical existe a ocorrência de *Moina eugeniae* Oliver, 1954. *Moina minuta* difere de *M. macrocopa* na morfologia da seta do IDL; difere de *M. eugeniae* pela presença de um dentículo bifurcado no pós-abdômen (Goulden 1968). Existe a possibilidade da ocorrência de mais uma espécie do gênero, contudo, *Moina platensis* Birabén, 1917 deve ser considerada como uma espécie *inquirenda* (Neretina et al 2020).

Distribuição e biologia.

A região tipo da espécie é localizada na foz do rio Tocantins, bacia Araguaia-Tocantins, Pará, Brasil. No entanto, é uma espécie que é amplamente relatada na região Neotropical (Goulden, 1968; Paggi, 1973; Elmoor-Loureiro, 1997).

Ainda são poucos os estudos que se dedicaram a compreender a biologia de *Moina minuta*. O que se sabe, até o momento, é que a espécie apresenta uma menor susceptibilidade a sofrer danos fisiológicos com resíduos de mineração de bauxita em comparação a *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981 (Bozzeli, 1998), mas revela um impacto significativo de danos sofridos por agroquímicos, como a atrazina (Moreira et al., 2013). Além disso, a sua biologia reprodutiva e crescimento demonstram um impacto significativo em relação à sazonalidade, com alterações na quantidade de ovos produzidos

e no tamanho máximo e mínimo dos indivíduos (Keppeler & Hardy, 2002), com taxas de crescimento muito aceleradas com a adição de nutrientes (Vieira et al., 2011).

3.4 Discussão

O presente estudo trouxe o primeiro sequenciamento do marcador COI de *Moina minuta* Hansen, 1899, resultando em uma nova perspectiva sobre aspectos filogenéticos do gênero *Moina* Baird, 1850. Conforme a descrição do subgênero *Exomoina* por Hudec (2010) e a sua elevação à nível de gênero por Dumont et al. (2013), o extenso trabalho descritivo de Alonso et al. (2019) classificou, com base em caracteres taxonômicos, *Moina lipini* Smirnov, 1976 como *Exomoina*, *Moina micrura* Uéno, 1939 como *Moina* s.s. e *Moina weissmani* Ishikawa, 1896 como *Moina* s.s., excluindo destes grupos as espécies *M. minuta*, *Moina brachiata* Jurine, 1820 e *Moina salina* Daday, 1888 por apresentarem características marcantes, como as estruturas presentes no primeiro par de apêndice torácicos. No entanto, a ideia de subdividir o gênero *Moina* foi amplamente criticada e vista como um passo precipitado sem a base de estudos amplos sobre a morfologia, genética e história evolutiva do grupo (Kotov, 2013; Bekker et al., 2016; Neretina et al., 2020; Neretina et al., 2024).

Mais de 100 anos após o trabalho “*The Natural History of the British Entomostraca*” (Baird, 1850), que propôs o gênero *Moina* Baird, 1850, Goulden (1968) descreveu a família Moinidae, agrupando os gêneros *Moina* e *Moinodaphnia* Herrick, 1887, separando esses gêneros da família Daphniidae O.F. Müller, 1785 por uma série de características taxonômicas, como as estruturas dos apêndices torácicos, antênulas e do pós-abdômen. Mas foi só com o trabalho do Paggi (1973), que detalhou a morfologia de *M. minuta*, com a descrição da fêmea efipial e do macho, que foi possível obter um melhor detalhamento morfológico da espécie, mas ainda com uma grande lacuna na descrição dos apêndices torácicos e do labro. Quando Hudec (2010) propôs o subgênero *Exomoina*, foi baseado em critérios morfológicos, tais como: o segmento basal do labro deve ser ciliado na superfície, semelhante ao visto em *Ilyocryptus* Sars, 1862; garra pós-abdominal com a presença de três fileiras de cerdas em sua superfície dorsal; fêmeas efipiais com dois ovos e machos com o exopodito do P1 desenvolvidos. Quando analisadas as características morfológicas presentes em *M. minuta*, ela forma um grupo com todas as

outras espécies que compõem o gênero *Moina*, sendo, inclusive, a espécie mais distante das atribuídas à *Exomoina*, mas ainda dentro de um mesmo clado.

No caso de *M. minuta*, investigada no presente estudo, a espécie apresenta características sinapomórficas bastante claras compartilhadas entre os outros táxons que compõem o gênero (Goulden, 1968, Smirnov, 1976). No entanto, não nos parece certo deixar de incluir esta e outras espécies de comparações com táxons que compõem o gênero *Moina* s.s. por apresentar autapomorfias, como a ausência de uma seta rígida em *M. minuta*, como foi sugerido por Alonso et al., (2019). A redescricao de *Moina wierzejskii* Richard, 1895 (Neretina et al., 2020) evidenciou a problemática por trás da separação do gênero *Moina*, uma vez que ficou bastante claro que este táxon ocupa posições intermediárias entre *Moina* s.s. e *Exomoina*, com labro semelhante ao de *Ilyocryptus*; efípio com dois ovos, mas com ausência de exopodito no macho. Estas características que seriam diagnósticas para *Exomoina*, como a quantidade de ovos no efípio, podem, na verdade, representar uma série de características que se derivaram por homoplasia (Neretina et al., 2020), sem relações claras de parentesco ou ancestralidade. Por mais que as características morfológicas sejam cruciais, não podemos deixar de considerar processos evolutivos independentes, que muitas vezes apresentam uma forte incompatibilidade entre morfologia e filogenética (Van-Damme et al., 2022). Certamente mais estudos taxonômicos integrativos são necessários para uma melhor compreensão do processo evolutivo da família *Moinidae*, mas nos parece completamente equivocada a ideia de que há alguma subdivisão no gênero *Moina* com base nos critérios taxonômicos artificiais estabelecidos por Hudec (2010).

Os agrupamentos formados no cladograma seguiram os mesmos padrões de outros estudos pretéritos que investigaram a família *Moinidae* com o uso de dados moleculares (Bekker et al., 2016; Ni et al., 2019) e morfológicos (Neretina et al., 2024). Conforme o definido por Ni et al. (2019), em um extenso estudo evolutivo, o grupo de *M. cf. brachiata* e *M. cf. micrura* divergiu, em média, há 90,6 milhões de anos, sendo um grupo menos derivado do que *M. lipini* e *M. cf. macrocopa*, que divergiu em cerca de 58,3 milhões de anos. A posição de *M. minuta* pode trazer uma nova perspectiva sobre o processo evolutivo do gênero *Moina*, evidenciando que os táxons sul-americanos podem ter divergido há mais tempo do que se esperava (Neretina et al., 2020). Infelizmente a escassez de dados moleculares, descrições morfológicas detalhadas e estudos fósseis ainda são um grande obstáculo para uma melhor compreensão do processo evolutivo dos

cladóceros (Van Damme & Sinev, 2013), impossibilitando uma discussão mais aprofundada sobre a posição dos táxons sul-americanos.

As autapomorfias presentes no primeiro par de apêndices torácicos, apesar do seu grande interesse para o processo de descrição e diagnose do grupo (Goulden, 1968; Smirnov, 1976), como a presença ou ausência de uma seta rígida no endito 3, parecem ter sofrido reversão em alguns táxons do gênero *Moina* (McNair, 1976). A questão é, este complexo presente no velho mundo, compõem uma gama de táxons que compartilham uma característica autapomórfica bastante marcante nos moinídeos (Alonso et al., 2019), a ausência de uma seta rígida no penúltimo segmento do primeiro apêndice torácico. No entanto, tais táxons representam uma posição intermediária entre os exemplares de *M. macrocopa* e *M. brachiata*, sendo muito distante de *M. minuta*, evidenciando uma possível perda secundária desta seta rígida em espécies que compõem este complexo no velho mundo. A hipótese de McNair (1976) de que *M. minuta* seria um estágio mais derivado dentro do gênero *Moina*, principalmente por características morfológicas das antenas, machos e fêmeas efípias, além de pertencer ao novo mundo, demonstrou não ter sustentação molecular. No entanto, ele estava correto em afirmar que, mesmo compartilhando uma característica tão marcante com *M. mongolica* (ausência de uma seta rígida no endito 3), estas espécies seriam filogeneticamente distantes. Os moinídeos certamente possuem uma extensa e complexa história evolutiva que merece mais atenção em estudos posteriores, principalmente considerando espécies do novo mundo.

3.5 Conclusão

O estudo trouxe uma nova perspectiva sobre o processo evolutivo do gênero *Moina* Baird, 1850 com a primeira sequência da região COI de *Moina minuta*, Hansen 1899 da região Neotropical. Os dados obtidos indicam que não há suporte molecular para a subdivisão do gênero *Moina*, tal ação foi bastante precipitada, principalmente pela falta de conhecimento amplo sobre a história evolutiva do grupo. Por meio dos dados moleculares e da filogeografia, foi sugerido que *M. minuta* representa uma linhagem menos derivada dentro das espécies conhecidas para o velho mundo, deixando mais claro a relação de homoplasia do primeiro par de apêndice torácico presente no grupo.

Certamente novas espécies de moinídeos devem ser investigadas para o novo mundo antes da confirmação de qualquer hipótese biogeográfica.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo ampliam significativamente o conhecimento sobre a diversidade e evolução dos Ctenopoda Neotropicais. A descrição de uma nova espécie de *Diaphanosoma* Fischer, 1850 revela que o complexo *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981 possui distribuição abrangente em todo o continente Americano, mas com linhagens evolutivamente diferenciadas. Surpreendentemente, análises moleculares indicaram que os exemplares sul-americanos não estão mais próximos de *D. birgei*, como previamente assumido, mas sim de *Diaphanosoma heberti* Korovchinsky, 2002, apontando para relações filogenéticas mais complexas e padrões evolutivos ainda pouco compreendidos dentro do grupo. Embora apresentem sobreposição de nicho, suas diferenças em amplitude climática indicam adaptações fisiológicas importantes, reforçando o papel da seleção ambiental na diversificação do clado. Paralelamente, o estudo trouxe uma nova perspectiva para o gênero *Moina* Baird, 1850, ao gerar a primeira sequência *COI* de *Moina minuta* Hansen, 1899 da região Neotropical. Os dados moleculares indicaram que a recente subdivisão do gênero carece de suporte filogenético robusto, revelando que tais mudanças taxonômicas foram precipitadas diante do limitado conhecimento sobre a história evolutiva do grupo. As evidências demonstram que *M. minuta* representa uma linhagem menos derivada em comparação às espécies do Velho Mundo, além de esclarecer que a homoplasia observada no primeiro par de apêndices torácicos deve ser interpretada com uma filogenia mais abrangente. Com o desenvolvimento do conhecimento genético de forma integrada para cladóceros na região Neotropical, investigada pela primeira vez para o Brasil, permitiu uma visão profunda sobre o endemismo continental Sul-Americano, expandindo o conhecimento da biodiversidade.

APÊNDICE B- Código de acesso genético.**Tabela S1** Informações adicionais sobre o código de acesso ao Genbank e os locais de ocorrência das amostras utilizadas nas análises filogenéticas.

Táxon	ID da sequência	País de origem	Número de acesso
<i>Moina cf. brachiata</i>	AOX13408.1	Mongólia	KX168508.1
<i>Moina cf. brachiata</i>	AOX13421.1	Rússia	KX168521.1
<i>Moina cf. brachiata</i>	AOX13422.1	Ucrânia	KX168522.1
<i>Moina cf. brachiata</i>	AOX13477.1	Rússia	KX168577.1
<i>Moina lipini</i>	AOX13426.1	Rússia	KX168526.1
<i>Moina lipini</i>	AOX13462.1	Rússia	KX168562.1
<i>Moina macrocopa</i>	AGL10468.1	México	KC617133.1
<i>Moina macrocopa</i>	AGL10469.1	México	KC617134.1
<i>Moina macrocopa macrocopa</i>	AOX13450.1	Rússia	KX168550.1
<i>Moina macrocopa macrocopa</i>	AOX13488.1	Rússia	KX168588.1
<i>Moina micrura</i>	QBX99013.1	República Tcheca	MH708065.1
<i>Moina micrura</i>	QBX99017.1	República Tcheca	MH708069.1
<i>Moina cf. salina</i>	AOX13441.1	Rússia	KX168541.1
<i>Moina cf. salina</i>	AOX13478.1	Cazaquistão	KX168578.1
<i>Moina weismanni</i>	BBO25515.1	Japão	LC503906.1
<i>Moina weismanni</i>	BBO25516.1	Japão	LC503907.1
<i>Moinodaphnia macleayi</i>	AGL10826.1	México	KC617721.1

Fonte: Sampaio (2025)

REFERÊNCIAS

Abreu, MJ, 2010. The use of PCR-RFLP to genetically distinguish the morphologically close species: *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 and *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea Cladocera). Brazilian Journal of Biology 70:121-124.

- Allan, JD, 1976. Life history patterns in zooplankton. *The American Naturalist* 110: 165-180.
- Alonso, M., AN Neretina, L. Sanoamuang, N. Saengphan, AA Kotov, 2019. A new species of *Moina* Baird, 1850 (Cladocera: Moinidae) from Thailand. *Zootaxa* 4554: 199-218.
- Alvares, CA, 2013. Koppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische zeitschrift* 22:711-728.
- Agostinho, AA, 2004. Fish Assemblages. In: THOMAZ, SM, *et al.* (Eds). *The Upper Paraná River and its Floodplain*. Backhuys Publishers, Netherlands. Pp. 223-246.
- Baird, W., *The Natural History of the British Entomostraca* (London, Ray Society), Ray Society, London. pp. 364.
- Baas-Becking, LGM, 1934. *Geobiologie; of Inleiding tot de milieukunde*. The Hague, Netherlands. Pp. 263.
- Bekker, EI, 2016. DNA barcoding reveals high cryptic diversity in the North Eurasian *Moina* species (Crustacea: Cladocera). *Plos one* 11: e0161737.
- Bledzki, LA, JI, Rybak, 2018. *Freshwater Crustacean Zooplankton of Europe: Cladocera & Copepoda (Calanoida, Cyclopoida) Key to species identification, with notes on ecology, distribution, methods and introduction to data analysis*. Springer, Switzerland. Pp. 918.
- Bucklin, A., BD Ortman, RM Jennings, LM Nigro, CJ Sweetman, NJ Copley, TS Peter, H.Wiber, 2010. A "Rosetta Stone" for metazoan zooplankton: DNA barcode analysis of species diversity of the Sargasso Sea (Northwest Atlantic Ocean). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 57: 2234-2247.
- Bozelli, RL, 1998. Influences of suspended inorganic matter on ⁸⁶carbono ingestion and incorporation rates of two tropical cladocerans, *Diaphanosoma birgei* and *Moina minuta*. *Archiv für Hydrobiologie*, 142: 451-465.
- Castilho, MCA, MJS Wisniewski, CB Abreu, TC Orlando, 2015. Life history and DNA barcode of *Oxyurella longicaudis* (Birgei, 1910) (Cladocera, Anomopoda, Chydoridae). *Zoological Studies* 54: 1-7.
- Castilho-Noll, MSM, G. Perbiche-Neves, NG Santos, LTF Schwind, FM Lansac-Tôha, ACS Silva, BR Meira, CY Joko, CS Morais-Júnior, EEC Silva, EM Eskinazi-Sant'Anna, FR Oliveira, GS Santos, JVF Silva, JL Portinho, K. Araujo-Paina, LJ Chiarelli, LP Diniz, LSM Braghin, LFM Velho, MET Souza, MLC Silva, MA Rocha, M. Progênio, N. Ferreira, PH Cirillo, PHR Morari, RL Arrieira, T. Mantovano, V. Gazulha, VLSA Melo,

- AR Ghidini, MM Júnior, FA Lansac-Tôha, CC Bonecker, NR Simões, 2023. A review of 121 years of studies on the freshwater zooplankton of Brazil. *Limnologica* 100: 126057.
- Dumont, H., AR Arnola, E. Kalapothakis, 2013. *Micromoina arboricola* n. gen., n. spec. (Crustacea: Cladocera), a new moinid living in a forest tree-hole in Minas Gerais, Brazil. *Zootaxa* 3652: 533-546.
- Dumont, HJ, 2021. Toward a phylogeny and biogeography of *Diaphanosoma* (Crustacea: Cladocera). *Aquatic Ecology* 55: 1-16.
- Elías-Gutierrez, M., FM Jerónimo, NV Ivanova, M. Valdez-Moreno, PDN Hebert, 2008. DNA barcodes for Cladocera and Copepoda from Mexico and Guatemala, highlights and new discoveries. *Zootaxa* 1839: 1-42.
- Elías-Gutierrez, M., M. Valdez-Moreno, 2008. A new cryptic species of *Leberis* Smirnov, 1989 (Crustacea, Cladocera, Chydoridae) from the Mexican semi-desert region, highlighted by DNA barcoding. *Hidrobiológica* 18: 63-74.
- Elías-Gutierrez, M., M. Valdez-Moreno, J. Topan, MR Young, JA Cohuo-Colli, 2018. Improved protocols to accelerate the assembly of DNA barcode reference libraries for freshwater zooplankton. *Ecology and evolution* 8: 3002-3018.
- Elías-Gutierrez, M., M. Valdez-Moreno, 2023. Relevance of DNA barcodes for biomonitoring of freshwater animals. *Frontiers in Environmental Science* 11: 1057653.
- Elías-Gutiérrez M., PJ Juračka, L. Montoliu-Elena, MR Miracle, A. Petrusek, V. Kořínek, 2019. Who is *Moina micrura*? Redescription of one of the most confusing cladocerans from terra typica, based on integrative taxonomy. *Limnetica* 38: 226-252.
- Elmoor-Loureiro, LMA, 1997. Manual de identificação de cladóceros límnicos do Brasil. *Universa, Brasil*. Pp. 155.
- Elmoor-Loureiro, LMA, , FDR Sousa, FR Oliveira, CY Joko, G. Perbiche-Neves, ACS da Silva, AJ Silva, AR Ghidini, BR Meira, CEG Aggio, CS Morais-Júnior, EM Eskinazi-Sant'Anna, FM Lansac-Tôha, GS Cabral, JL Portinho, JR Nascimento, JVF Silva, L. Veado, LJ Chiarelli, LO Santana, LP Diniz, LSM Braghin, LTF Schwind, M. Melo Júnior, M. Progênio, MA Rocha, MLC Silva, MSM Castilho-Noll, NJ Silva, NG dos Santos, PHR Morari, PM Maia-Barbosa, PM Oliveira, RL Arrieira, RL Macêdo, S. Deosti, T. Mantovano, V. Gazulha, CC Bonecker, FA Lansac-Tôha, PHC Corgosinho, LFM Velho, NR Simões, 2013. Towards a synthesis of the biodiversity of freshwater Protozoa, Rotifera, Cladocera, and Copepoda in Brazil. *Limnologica* 100: 126008.
- Fryer, G., 1972. Observations on the ephippia of certain macrothricid cladocerans. *Zoological Journal of the Linnean Society* 51: 79-96.

- Garibian, PG, DP Karabanov, AN Neretina, DJ Taylor, AA Kotov, 2021. *Bosminopsis deitersi* (Crustacea: Cladocera) as an ancient species group: a revision. PeerJ 9: e11310.
- Goulden, CE, 1968. The Systematics and Evolution of the Moinidae. Transactions of the American Philosophical Society, Philadelphia. Pp. 101.
- Hall, TA, 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 1: 95-98.
- Hansen, HJ, 1899. "Die Cladoceren und Cirripedien der Plankton-Expedition." Er geb. Atlantic Ocean Plankton-Exped. Humboldt-Stiftung, Germany. Pp. 58.
- Hasegawa, M., H. Kishino, T. Yano, 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. Journal of molecular evolution 22: 160-174.
- Hebert, PDN, A. Cywinska, LB Shelley, JR deWaard, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 270: 313-321.
- Hudec, I., 2010. Anomopoda, Ctenopoda, Haplopoda, Onychopoda (Crustacea: Branchiopoda). Fauna Slovenska III. Veda, Bratislava. pp. 496.
- Junk, WJ, PB Bayley, RE Sparks, 1989. The flood pulse concept in river-floodplain systems. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 106: 110-127.
- Keppeler, EC, ER Hardy, 2002. Estimativa do tamanho das fêmeas com ovos de *Moina minuta* Hansen, 1899 (Cladocera, Crustacea) no lago Amapá, Rio Branco, Estado do Acre Brasil. Acta Scientiarum – Biological and Health Sciences 24: 321-328.
- Kotov, AA, 2000a. Analysis of *Kozhowia* Vasiljeva & Smirnov, 1969 (Chydoridae, Anomopoda, Branchiopoda), with a description of *Parakozhowia* n. gen. Hydrobiologia 437: 17-56.
- Kotov, AA, 2000b. Redescription and assignment of the chydorid *Indialona ganapati* Petkovski, 1966 (Branchiopoda: Anomopoda: Aloninae) to Indialonini, new tribus. Hydrobiologia 439: 161-178.
- Kotov, AA, 2013. Morphology and phylogeny of Anomopoda (Crustacea: Cladocera). KMK, Moscow. Pp. 638.
- Kotov, AA, M. Elías-Gutiérrez, JG Granados-Ramírez, 2005. *Moina dumonti* sp. Nov.(Cladocera, Anomopoda, Moinidae) from southern Mexico and Cuba, with comments on moinid limbs. Crustaceana 78: 41-57.
- Kumar, S., G. Stecher, KT Mega, 2016. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33: 1870:1874.

- Liu, P., L. Xu, SL Xu, A. Martinez, H. Chen, HJ Dumont, BP Han, D. Fontaneto, 2018. Species and hybrids in the genus *Diaphanosoma* Fischer, 1850 (Crustacea: Branchiopoda: Cladocera). *Molecular phylogenetics and evolution* 118: 369-378.
- Lynch, M., PE Jarrell, 1993. A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. *Genetics* 135: 1197-1208.
- Makino, W., H. Suzuki, Y. Otake, S. Ban, J. Urabe, 2023. The first report of the non-indigenous *Chydorus brevilabris* Frey, 1980 (Crustacea: Cladocera) in Asian freshwaters. *Limnology* 24: 151-159.
- McNair, JM, 1976. Sexual forms and phylogenetic positions of *Moina reticulata* Daday and *Moina minuta* Hansen (Cladocera: Moinidae). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 128: 41-48.
- Meyer, CP, G. Paulay, 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PloS biology* 3: e422.
- Moreira, RA, AS Mansano, O. Rocha, 2013. O efeito da toxicidade aguda do herbicida atrazina para o Cladóceros *Moina minuta* Hansen, 1899. *Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista* 9: 79-90.
- Neretina, AN, AG Kirdyasheva, AA Kotov, 2020. Position of *Moina wierzejskii* Richard, 1895 (Crustacea: Cladocera) within the genus *Moina* Baird, 1850 in the light of new morphological data. *Zootaxa* 4820: 4820.3. 5.
- Neretina, AN, M. Alonso, AA Kotov, 2024. Investigation of the distribution patterns in moinids (Crustacea: Cladocera: Moinidae) forming ephippia with two resting eggs. *Zootaxa* 5512: 451-490.
- Ni, Y., X. Ma, W. Hu, D. Blair, M. Yin, 2019. New lineages and old species: lineage diversity and regional distribution of *Moina* (Crustacea: Cladocera) in China. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 134: 87-98.
- Paggi, JC. Acerca de algunas especies de la familia Moinidae (Crustacea, Cladocera) de la republica Argentina. *Physis Sesc* 85: 269-277.
- Prosser, S., A. Martínez-Arce, M. Elías-Gutiérrez, 2013. A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans. *Molecular ecology resources* 13: 1151-1155.
- Rosenthal, A., O. Coutelle, M. Craxton, 1993. Large-Scale Production of DNA Sequencing Templates by Microtitre Format PCR. *Nucleic Acids Research* 21: 74-173.

- Sacherová, V., PDN Hebert, 2003. The evolutionary history of the Chydoridae (Crustacea: Cladocera). *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 629-643.
- Smirnov, NN, 1976. Macrothricidae and Moinidae of the World fauna. *Fauna of the U.S.S.R.: Crustacea (Fauna SSSR: Rakoobraznye)*. Wiener Bindery, Jerusalem. Pp. 649.
- Smirnov, NN, 2017. *Physiology of the Cladocera*. Russian Academy, Moscow. Pp. 402.
- Souza-Filho, EE, 2009. Evaluation of the Upper Paraná River discharge controlled by reservoirs. *Brazilian journal of Biology* 69: 707-716.
- Spandl, H., 1926. *Das Zooplankton des Paranagua-Sees (Brazil)*. Akademie der Wissenschaften, Wien 76: pp. 101-105.
- Stingelin, T., 1904. Entomostraken, gesammelt von Dr. G. Hagmann in Mündungsgebiet des Amazonas. *Zoologisch-Botanische Datenbank, Austria* 20: 575-590.
- Trifinopoulos, J. LT Nguyen, AV Haeseler, BQ Minh, 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic acids research* 44: w232-w235.
- Van Damme, K., L., Cornetti, PD Fields, D., Ebert, 2022. Whole-genome phylogenetic reconstruction as a powerful tool to reveal homoplasy and ancient rapid radiation in waterflea evolution. *Systematic Biology* 71: 777-787.
- Van Damme, K., AY Sinev, 2013. Tropical amphi-pacific disjunctions in the Cladocera (Crustacea: Branchiopoda). *Journal of Limnology* 72: 209-244.
- Vieira, ACB, AMA Medeiros, LL Ribeiro, MC Crispim, 2011. Population dynamics of *Moina minuta* Hansen (1899), *Ceriodaphnia cornuta* Sars (1886), and *Diaphanosoma spinulosum* Herbst (1967)(Crustacea: Branchiopoda) in different nutrients (N and P) concentration ranges. *Acta Limnologica Brasiliensia* 23: 48-59.
- Xu, S., PDN Hebert, AA Kotov, ME Cristescu, 2009. The noncosmopolitanism paradigm of freshwater zooplankton: insights from the global phylogeography of the predatory cladoceran *Polyphemus pediculus* (Linnaeus, 1761) (Crustacea, Onychopoda). *Molecular ecology* 18: 5161-5179.

NOTA INFORMATIVA COMPLEMENTAR – Lista de artigos publicados, submetidos e trabalhos apresentados em eventos durante o Mestrado.

Outras disciplinas eletivas e tópicos especiais:

- Modelagem da Biodiversidade: Teoria de Nicho e Distribuição Potencial de Espécie.
- Biogeografia: teorias e aplicações.
- Direito Ambiental.
- Conceitos básicos para o uso do R.
- Diversidade de Protozooplâncton: Ferramentas Modernas com Vistas a uma Taxonomia integrativa.
- Ecologia e Sistemática de Copépodes de Água Continentais.
- Meta-Análise Aplicada a Ecologia.
- Foundation of Population and Community Ecology.
- Geoprocessamento para Ecologia.
- Marcadores Genético-Moleculares e sua Aplicação em Estudos de Biodiversidade.
- Ecologia e Manejo de Reservatórios.

Participação em congressos, simpósios e demais eventos:

- I Simpósio de Zooplâncton Neotropical.
- I Workshop PGB-UEM.
- III Simpósio do Plâncton de Águas Continentais.
- First International Symposium On The Ecology Of Continental Aquatic Environments.
- 9º Seminário das Instituições de Ensino Superior do Paranapanema.
- 37th SIL International Congress on Limnology.

Trabalhos apresentados em congressos:

- **Apresentação oral realizada no 37th SIL International Congress on Limnology:** SAMPAIO, M. J. A.; MINILLO, A. ; MASCARENHAS, M. S. ; SUAREZ, Y. R. . Cytotoxic evaluation in *Saccharomyces cerevisiae* under the effect of the anti-inflammatory diclofenac.
- **Apresentação de banner realizada no 37th SIL International Congress on Limnology:** SAMPAIO, M. J. A.; SUAREZ, Y. R. ; BONECKER, C. C. ; LIMA, E. O. ; SOUZA-SILVA, A. C. . Impact of urbanization on the structuring of zooplankton metacommunity and beta diversity in tropical streams, Brazil.

Participação em comissões organizadoras de evento:

- Dia Mundial Da Limpeza.
- 33.º Encontro Anual de Iniciação Científica e 13.º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior.
- *Pint of Science* 2024.
- *Pint of Science* 2025.
- XXIX EPGPEA - Encontro de Pós-Graduandos em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Participação em eventos de extensão:

- Mostra Científica "Maringá Verde".
- Prefeitura nos bairros.
- Semana Nacional de Ciência e Tecnologia. Conversa com o cientista sobre a biodiversidade no Bioma da Mata Atlântica.
- Conversa com o cientista e um dia na Universidade. Taxonomia e importância ecológica do zooplâncton.
- UEM na Arena Sustentável Maringá. Ecologia de zooplâncton.
- Expoingá pelo NAPI serviços ecossistêmicos.
- XXXIV Ciclo de Debates em Ecologia de Água Doce. 2023.
- XXXV Ciclo de Debates em Ecologia de Água Doce. 2025.
- Mostra científica "Parque do Ingá".
- *Pint of Science* 2024.

- Pint of Science 2025.
- Limpeza voluntária de resíduos sólidos do Parque do Buracão, Maringá, PR.
- Limpeza voluntária de resíduos sólidos de áreas de fundo de vale em Maringá, PR, no Dia Mundial da Limpeza.

Demais participações e produções:

- **Publicação em revista de extensão:** Divulgação da ciência desde a sala de aula: novos projetos. Revista Bioka, 09 out. 2024.
- **Curso de curta duração ministrado:** SAMPAIO, M. J. A.; SCOARIZE, M. M. R. Visita ao fundo de vale do córrego Nazareth.
- **Participação em minicurso:** Análise multivariada sobre o zooplâncton.
- **Participação em minicurso:** Índices de diversidade do zooplâncton.
- **Participação em campanhas de coleta:** Realizou atividades de campo em três campanhas de coleta do PELD-PIAP, além de analisar as amostras e realizar análises estatísticas para o projeto.
- **Estágio realizado:** Realizou um estágio com duração de duas semanas na Universidade Federal de Jataí sob a supervisão do Prof. Dr. Francisco Diogo Rocha Sousa, com enfoque em taxonomia de cladóceros.
- **Supervisão e monitoria:** realizou a supervisão e auxiliou diversos estagiários que passaram um período para aprofundar o conhecimento sobre zooplâncton no PEA-UEM.