



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LENICE SOUZA-SHIBATTA

**FILOGEOGRAFIA DE *Microglanis cottoides* (Boulenger, 1891)
(SILURIFORMES: PSEUDOPIMELODIDAE)**

Londrina
2015

LENICE SOUZA-SHIBATTA

**FILOGEOGRAFIA DE *Microglanis cottoides* (Boulenger, 1891)
(SILURIFORMES: PSEUDOPIMELODIDAE)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina/UEL, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Dra. Silvia Helena Sofia
Co-orientador: Dr. Oscar Akio Shibatta

Londrina
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Souza-Shibatta, Lenice .

Filogeografia de *Microglanis cottoides* (Boulenger, 1891) (Siluriformes: Pseudopimelodide) / Lenice Souza-Shibatta. - Londrina, 2015.
138 f. : il.

Orientador: Silvia Helena Sofia.

Coorientador: Oscar Akio Shibatta.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Biogeografia - Teses. 2. Região neotropical - Teses. 3. Bacias costeiras - Teses. 4. Diversificação Biológica - Teses. I. Sofia, Silvia Helena . II. Shibatta, Oscar Akio. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

LENICE SOUZA-SHIBATTA

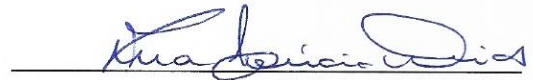
FILOGEOGRAFIA DE *Microglanis cottoides* (Boulenger, 1891) (SILURIFORMES:
PSEUDOPIMELODIDAE)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina/UEL, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora.

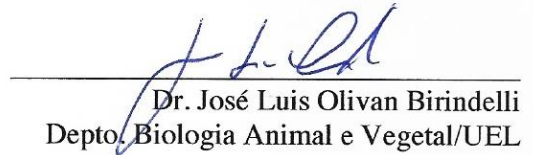
BANCA EXAMINADORA



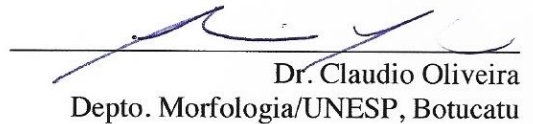
Dr.^a. Silvia Helena Sofia
Depto. Biologia Geral/UEL



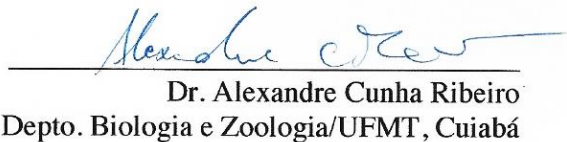
Dr.^a. Ana Lúcia Dias
Depto. Biologia Geral/UEL



Dr. José Luis Olivan Birindelli
Depto. Biologia Animal e Vegetal/UEL



Dr. Claudio Oliveira
Depto. Morfologia/UNESP, Botucatu



Dr. Alexandre Cunha Ribeiro
Depto. Biologia e Zoologia/UFMT, Cuiabá

Londrina, 18 de setembro de 2015

*Ao Oscar, meu amor, amigo e
companheiro de toda a vida,
dedico*

AGRADECIMENTOS

“Se vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”. Com esta frase de Isaac Newton eu gostaria de deixar registrado meu profundo e sincero agradecimento às pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial...

À minha querida orientadora Silvia Helena Sofia, por todo carinho, incentivo, dedicação, amizade, conhecimentos compartilhados, ensinamentos e, principalmente, por toda a confiança em mim depositada. Você é uma das pessoas mais generosas que eu tive o prazer em conhecer. Tenho por ti grande admiração. Muito obrigada por tudo!!!

Ao Oscar Akio Shibatta, por todo amor, carinho, incentivo, dedicação e paciência durante todo esse trabalho e, principalmente, por compartilhar comigo o projeto com os *Microglanis* o qual tive muita alegria e satisfação em desenvolver.

À querida Ana Lúcia Dias, “minha primeira orientadora”, por quem tenho imenso carinho e gratidão, pelo carinho, amizade, ensinamentos, pela gentileza e prontidão em aceitar o convite para avaliar o presente trabalho e, principalmente, por ter acompanhado meus primeiros passos na pesquisa científica.

Ao professor Claudio Oliveira, da Universidade Estadual Paulista-Botucatu, por quem tenho grande carinho e admiração, pela oportunidade de fazer os primeiros testes de *primers* em seu laboratório, pela gentileza e prontidão em aceitar o convite para avaliar o presente trabalho e, principalmente, pela atenção dispensada a mim sempre que precisei de ajuda.

Aos professores José Birindelli e Fernando Jerep, da Universidade Estadual de Londrina, e Marcelo Rocha, do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, pela amizade, disposição em ajudar, compartilhamento de conhecimento e de bibliografias, pelas valiosas conversas sobre Biogeografia e pela gentileza e prontidão em aceitar o convite para avaliar o presente trabalho.

Ao professor Alexandre Cunha Ribeiro, da Universidade Federal do Mato Grosso, pela gentileza e prontidão em aceitar o convite para avaliar o presente trabalho, que com certeza muito contribuiu para a melhoria deste.

Aos queridos amigos e companheiro de luta Dhiego Ferreira (Dhigo), Wilson Frantine (Will), Kátia Rocha (Katita) e Vítor Abrahão, pela amizade, pelo carinho e pelas inúmeras vezes que me ajudaram durante o desenvolvimento dessa tese, em especial ao Dhiego, que muito admiro pelo exemplo de determinação, dedicação e profissionalismo.

Ao professor Guillermo Ortí, que tão gentilmente me recebeu na *George Washington University*, para que eu pudesse desenvolver parte da minha pesquisa em seu laboratório. Foram meses de muito aprendizado e superação. Muito obrigada por esta oportunidade.

Ao meu querido amigo João Tonini, da *George Washington University*, pela ajuda nas análises moleculares, pelas discussões em Filogeografia e Evolução, pelo Poets e, principalmente, pelo carinho e cuidado durante minha estada nos USA. Você, Lari e Lígia foram muito importantes nesse período, tornando suportável a saudade de casa. Muito obrigada meus amores!!!

Aos colaboradores que gentilmente cederam amostras de *Microglanis* para este estudo: Claudio Oliverira (UNESP-Botucatu), Luiz Roberto Malabarba (UFRGS) e Lúcia Giuliano-Caetano (UEL).

À equipe de coleta, Vitor Abrahão, José Birindelli, Lucas Jarduli e, especialmente, ao Oscar Shibatta e Edson Santana que estiveram presentes em todas as coletas e não mediram esforços para o sucesso das expedições. Edsão, muito obrigada pela dedicação e carinho de sempre.

À Fernanda Simões de Almeida, pela amizade, pelos conhecimentos compartilhados, pelos momentos divertidos que passamos no laboratório e por estar sempre pronta à ajudar.

À professora Claudete Ruas pela ajuda no desenvolvimento dos *primers* de microssatélites, que foram essenciais para este trabalho.

Aos professores Lúcia Giuliano-Caetano, Rosângela Moreira, Rogério Fernandes e Laurival Villas-Boas, pela atenção e disposição em ajudar sempre que precisei.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, José Antônio Pimenta e Luiz dos Anjos e a secretária Rosana de Paula, pela atenção e prontidão em ajudar;

Aos amigos que tenho tanto carinho, Cláudia Martinez, Sirlei Bennemann, Marcela Ferraz, Thaís Miranda, Nazária Duarte, Sueli Miranda e Heitor Frossard, pela amizade, carinho e torcida de sempre.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Ecologia Animal (LAGEA), Dhiego, Douglas, Thiago, Camilinha (nosso anjo que sabe onde está tudo no laboratório e está sempre pronta à ajudar!!!), Same, Carol, Juliana, Débora, Tafarel e os que deixaram muitas saudades, Rafael (Caconde), Alessandra e Fer Midori, pelos momentos de alegria e de trabalho duro.

Aos amigos do MZUEL Edson Santana, Cidão, Lucas Jarduli, Fernando Assega, Ana Cecília, Alex Claro, Nick e, especialmente, ao Raul que sempre está pronto à ajudar.

À Sara Godoy e ao João Fernando, pela amizade, atenção e pelas dicas com as análises.

Aos amigos dos USA, em especial João Tonini, Larissa, Lígia, Janine, Davi Santanna, Thiago, Jeremy, Andrew e Lilly, por todo apoio e consideração durante a minha estada naquele país.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e pela oportunidade de participar do Programa Sanduíche de Doutorado no Exterior, que muito contribuiu para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao CNPq e Fundação Araucária, pelo auxílio financeiro à pesquisa.

E, por fim, gostaria de agradecer as minhas duas famílias, Souza e Shibatta, especialmente a minha mãe, Lídia, as minhas irmãs, Leila e Suzana, meu sogro Akira, minha sogra guerreira Chieko e minhas cunhadas Silvia e Claudia, por todo amor, carinho, torcida e confiança. Vocês me fazem acreditar que tudo é possível e que tudo acabará bem... Amo muito todos vocês.

O apanhador de desperdícios

*Uso a palavra para compor meus silêncios
Não gosto das palavras fatigadas de informar
Dou mais respeito às que vivem de barriga no chão tipo água pedra sapo
Entendo bem o sotaque das águas
Dou respeito às coisas desimportantes e aos seres desimportantes.
Prezo insetos mais que aviões.
Prezo a velocidade das tartarugas mais que a dos mísseis.
Tenho em mim um atraso de nascença.
Eu fui aparelhado para gostar de passarinhos.
Tenho abundância de ser feliz por isso.
Meu quintal é maior do que o mundo
Sou um apanhador de desperdícios:
Amo os restos como as boas moscas
Queria que a minha voz tivesse um formato de canto
Porque eu não sou da informática:
eu sou da invencionática
Só uso a palavra para compor meus silêncios*

Manoel de Barros

PREFÁCIO

Este trabalho de tese teve seu início, oficialmente, há quatro anos, entretanto seu projeto foi idealizado desde o ano de 2005, a partir da dissertação de Horácio Mori, que consta de análises morfológicas em *Microglanis cottoides*, em que diferenças sutis foram observadas mas não o suficiente para separá-las em espécies. A partir deste fato e levando em conta a ampla distribuição de *M. cottoides*, de São Paulo ao Rio Grande dos Sul, em bacias que estão isoladas, surgiu a hipótese de que sob a designação de *M. cottoides* poderiam estar outras espécies do gênero *Microglanis*, mas que não era possível afirmar com certeza, só com base nas diferenças morfológicas. Para testar esta hipótese, resolvemos desenvolver este trabalho empregando, além da morfologia, ferramentas moleculares que permitissem identificar potenciais espécies novas, além de compreender quais foram os eventos e processos responsáveis pela atual distribuição de *M. cottoides*.

Os resultados deste trabalho estão apresentados em dois capítulos, além de um artigo científico intitulado: “Development and characterization of microsatellite *loci* of *Microglanis cottoides* (Siluriformes: Pseudopimelodidae) and cross-species amplification”, publicado na revista *Neotropical Ichthyology* 11(3): 581-585, 2013, que descreve 13 marcadores microssatélites desenvolvidos para *Microglanis cottoides* e testa a sua aplicabilidade para outras quatro espécies de Pseudopimelodidae. Este artigo encontra-se como um apêndice desta tese.

O capítulo 1, intitulado “Status taxonômico de *Microglanis cottoides* (Boulenger, 1891) (Siluriformes: Pseudopimelodidae) do sul do Brasil: casos de sinonímia e espécie críptica”, teve como proposta testar as relações filogenéticas entre as diferentes populações de *M. cottoides*, ao longo de sua distribuição geográfica, com o uso da genética molecular e da morfologia. E o capítulo 2, Intitulado “Filogeografia de *Microglanis cottoides* (Boulenger, 1891) (Pseudopimelodidae): eventos e processos relacionados à distribuição da espécie”, teve como objetivos analisar a estrutura genética, demografia histórica e padrões temporais de

divergência em populações naturais de *Microglanis cottoides*, ao longo de sua área de distribuição, além das relações filogenéticas entre seus congêneres.

SOUZA-SHIBATTA, L. **Filogeografia de *Microglanis cottoides* (Boulenger, 1891) (Siluriformes: Pseudopimelodidae)**. 2015. 127f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

Microglanis cottoides é amplamente distribuída em bacias hidrográficas ao longo da costa Atlântica brasileira que estão isoladas entre si, bem como das grandes drenagens do interior, pelas montanhas escarpadas da margem oriental do escudo cristalino brasileiro, conferindo a esta espécie qualidades apropriadas para estudos filogeográficos. Além disso, existe a hipótese de ocorrência de espécies crípticas e sinônimos em *M. cottoides*, tornando o estudo desta espécie de grande importância para a sistemática e o entendimento da evolução deste grupo de peixes. Identificação e descrição de espécies, tradicionalmente, são feitas com base em caracteres morfológicos, mas na atualidade ferramentas moleculares têm sido utilizadas, em conjunto com a morfologia, para o estudo da diversidade biológica. A proposta deste trabalho foi (1) testar as relações filogenéticas entre diferentes populações de *M. cottoides* e (2) analisar a estrutura genética, demografia histórica e padrões temporais de divergência nas populações de *M. cottoides*, ao longo de sua área de distribuição, além da relação filogenética entre seus congêneres. As relações filogenéticas e filogeográficas, a estrutura genética e a demografia histórica foram analisadas utilizando uma combinação de marcadores morfológicos e moleculares (microssatélites e DNAm_t-COI). A alta divergência genética encontrada entre os indivíduos da bacia do rio Uruguai e demais bacias costeiras sugere que a espécie designada como *M. cottoides* para a bacia do rio Uruguai, seja uma espécie nova de *Microglanis* que se enquadra no critério de espécie críptica. Por outro lado, as populações de *M. cibela* apresentaram baixas divergências genéticas entre *M. cottoides* das demais bacias costeiras, o que é compatível para indivíduos de uma mesma espécie. Assim, *M. cottoides*, como atualmente diagnosticado, forma um grupo não monofilético, pois inclui uma espécie morfológica e geneticamente distinta da bacia do rio Uruguai e exclui uma espécie morfológica e geneticamente similar das bacias dos rios Tramandaí e Mampituba (*M. cibela*). Para as análises filogeográficas, a distribuição de *M. cottoides* restringiu-se às drenagens costeiras, considerando as populações das bacias dos rios Tramandaí e Mampituba, previamente identificadas como *M. cibela*, como pertencentes a esta espécie. Os níveis de variação genética observados em *M. cottoides* estão dentro do esperado quando comparados com outras espécies de Siluriformes e os *loci* investigados mostraram um alto nível de polimorfismo. De forma geral, a diversidade genética encontrada nas populações de *M. cottoides* foi alta e semelhante ao que geralmente é encontrada em populações de peixes selvagens. No entanto, observou-se forte estruturação genética principalmente entre as amostras de Paranaguá, Guaratuba e Itapocu e menor estruturação entre Araranguá e Mampituba, e entre Tramandaí e Patos, indicando maior possibilidade de fluxo gênico entre essas populações e, conseqüentemente, maior similaridade entre elas. Contudo, considerando a distância geográfica e principalmente o isolamento das bacias costeiras que, provavelmente, ocorreu entre 6.000 a 10.000 anos antes do presente, a similaridade entre as populações sugere fluxos gênicos históricos, refletindo um período em que as bacias estavam conectadas. Paleocanais fluviais presentes na plataforma continental podem indicar que estas drenagens tinham comunicação com outras drenagens de bacias próximas, permitindo a ampla distribuição de *M. cottoides* em drenagens que hoje estão isoladas. Entretanto, nota-se que as divergências genéticas entre os indivíduos das bacias costeiras aumentam com a distância, e observa-se que entre o sul de Santa Catarina e o norte do Rio Grande do Sul há uma quebra

filogeográfica de cerca de 1,9 Ma, causando a divisão das populações de *M. cottoides* em dois filogrupos. As análises filogeográficas e filogenéticas demonstraram que as espécies litorâneas, *M. parahybae* e *M. cottoides*, são filogeneticamente mais relacionadas e divergiram-se há aproximadamente 5 Ma. Já *M. garavelloii* da bacia do Alto Paraná e *Microglanis* sp. da bacia do rio Uruguai divergiram dessas espécies do litoral há pelo menos 8 Ma, coincidindo com a época de diversificação da maior parte da ictiofauna Neotropical, que ocorreu entre 3 e 10 Ma. Portanto, tudo indica que a história filogeográfica de *M. cottoides* envolveu eventos vicariantes de origem tectônica como a formação das drenagens costeiras a partir de episódios orogenéticos e, mais recentemente, por eventos climáticos pleistocênicos que isolaram várias populações. Porém, em períodos de glaciação, quando as drenagens voltam a se encontrar, as populações de *M. cottoides* possivelmente trocam informações genéticas e por isso mantêm sua unidade específica.

Palavras-chave: Bacias costeiras. Biogeografia. Diversificação biológica. Região Neotropical.

SOUZA-SHIBATTA, L. Phylogeography of *Microglanis cottoides* (Boulenger, 1891) (Siluriformes: Pseudopimelodidae). 2015. 127p. Thesis (PhD in Biological Sciences). Universidade Estadual de Londrina.

ABSTRACT

Microglanis cottoides is widely distributed in basins along the Brazilian Atlantic coast that are isolated from each other and from major drainages of the interior, by rugged mountains of the east bank of the Brazilian crystalline shield, giving to this species appropriate qualities for phylogeographic studies. Furthermore, there is a chance of occurrence of cryptic species and synonyms in *M. cottoides*, making this kind of study of great importance for the systematic and for understanding of the evolution of this group of fish. Identification and description of species are traditionally made based on morphological characteristics, but currently molecular tools have been used in conjunction with morphology for the study of biological diversity. The purpose of this study was (1) to test the phylogenetic relationships between different populations of *M. cottoides* and (2) to analyze the genetic structure, historical demography and temporal patterns of divergence among populations of *M. cottoides*, throughout its distribution area in addition to the phylogenetic relationship among congeners. The phylogenetic and phylogeographic relationships, genetic structure and the historical demographics were analyzed using a combination of morphological and molecular markers (microsatellites and mtDNA-COI). The high genetic divergence found among specimens of the Uruguay River basin and other coastal basins suggests that the species identified as *M. cottoides* from the Uruguay River basin, is a new species of *Microglanis* that fits in the criterion of cryptic species. On the other hand, populations of *M. cibela* showed low genetic differences between *M. cottoides* from remaining coastal basins, which is compatible for individuals of the same species. Thus, *M. cottoides*, as currently diagnosed, form a non-monophyletic group because it includes a morphologically and genetically distinct species from the Uruguay river basin and excludes a morphological species and genetically similar species from the Tramandaí and Mampituba rivers basins (*M. cibela*). For phylogeographical analysis, the distribution of *M. cottoides* was restricted to the coastal streams, considering the populations of Tramandaí and Mampituba basins, previously identified as *M. cibela*, as belonging to this species. The levels of genetic variation observed in *M. cottoides* are as expected when compared to other species of Siluriformes and the investigated *loci* showed a high level of polymorphism. Overall, the genetic diversity found in populations of *M. cottoides* was high and similar to what is usually found in wild fish populations. However, there was a strong genetic structure mainly between samples of Paranaguá, Guaratuba and Itapocu and lower structure between Araranguá and Mampituba, and between Tramandaí and Patos, indicating a higher possibility of gene flow between these populations, and consequently, greater similarity between them. However, given the geographical distance and especially the isolation of coastal basins that probably occurred between 6,000 to 10,000 years before present, the similarity between the populations suggests historic gene flows, reflecting a time when the basins were connected. River paleochannels present on the continental platform may indicate that these drainages had communication with other drainages of nearby basins, allowing widespread distribution of *M. cottoides* in drainage that are isolated today. However, it notes that the genetic differences between individuals of coastal watersheds increase with the distance, and it is observed that between the south of Santa Catarina and northern Rio Grande do Sul there is a phylogeographic break of about 1.4 My, causing the division of populations of *M. cottoides* in two phylogroups. The

phylogeographic and phylogenetic analysis showed that the coastal species, *M. parahybae* and *M. cottoides* are phylogenetically more related and diverged at about 3 My. Since *M. garavelloii* from Alto Paraná basin and *Microglanis* sp. from the rio Uruguay basin diverged from these coastal species for at least 5 My, coinciding with the time of diversification of most of the Neotropical fish fauna, which occurred between 3 and 10 My. Therefore, it seems that the phylogeographic history of *M. cottoides* involves vicariant events of tectonic origin like the formation of coastal drainages from orogenic events and, more recently, by Pleistocene climatic events that isolated various populations. However, in glacial periods, when the drainage meet again, populations of *M. cottoides* possibly exchange genetic information and therefore maintain their specific unit.

Keywords: Coastal basins. Biogeography. Biological diversification. Neotropical Region.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.** Exemplar de *Microglanis cottoides*..... 53
- Figura 2.** Mapa com os pontos de coleta de *Microglanis cottoides*, nos estados do sudeste e sul do Brasil. Pontos brancos representam as 28 localidades onde a espécie não foi encontrada. As siglas SP, PR, SC e RS, referem-se aos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, respectivamente 55
- Figura 3.** Representação gráfica das distâncias genéticas entre as populações de *Microglanis cottoides* e entre seus congêneres, estimada com base no modelo Kimura-2-Parâmetros agrupada pelo método Neighbor-Joining com 1000 pseudoréplicas através do software MEGA v6.0. Valores de sustentabilidade dos ramos são apresentados ao lado dos nós em cada bifurcação 65
- Figura 4.** Rede de haplótipos mostrando a ocorrência de dois grupos principais (Bacia do rio Uruguai X Bacias costeiras). O diâmetro dos círculos é proporcional ao número de indivíduos em cada haplótipo e as cores representam as localidades onde estes haplótipos foram encontrados. Traços (-) mostram o número de passos mutacionais entre dois haplótipos adjacentes..... 66
- Figura 5.** Dispersão dos escores individuais das amostras combinadas de *Microglanis*, nos dois primeiros eixos canônicos. *Microglanis garavelloi* (cruzes vermelhas), *M. eurystoma* (quadrados azuis), *M. malabarbai* (quadrados rosas cheios), *M. cibela* (cruzes verdes), *M. cottoides*-PAR (círculos roxos), *M. cottoides*-GUA (diamantes verdes claro), *M. cottoides*-MAD (estrelas azuis escuro), *M. cottoides*-ITA (triângulos azuis claro), *M. cottoides*-ARA (barras verticais verdes oliva), *M. cottoides*-MAM (barras verticais vermelhas escuro), *M. cottoides*-TRA (azul turquesa oval), *M. cottoides*-PAT (triângulos amarelos cheios), *M. cottoides*-RIB (triângulos invertidos cinzas), *M. cottoides*-URU (triângulos invertidos azuis claro) 67
- Figura 6.** Dendrograma de similaridade das distâncias euclidianas entre os centroides das amostras de *Microglanis* das regiões sul e sudeste do Brasil. Números nos nós representam os valores percentuais de *Bootstrap* 68

Capítulo 2

- Figura 1.** Pontos de coleta de *Microglanis cottoides*, nos estados do sudeste e sul do Brasil. Pontos brancos representam as 28 localidades onde a espécie não foi encontrada. As siglas SP, PR, SC e RS, referem-se aos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, repectivamente. Mapa elaborado pelo software QGIS (Geographic Information System) 84
- Figura 2.** Representação gráfica da análise de agrupamentos bayesianos (STRUCTURE). Em A, a partir da análise entre as nove populações ($K = 2$) de *Microglanis cottoides*; em B, entre as populações do grupamento 1 (RIB = Ribeira de Iguape, PAR = Paranaguá, GUA = Guaratuba e ITA = Itapocu); em C, entre as populações do grupamento 2 (MAD = Madre, ARA = Araranguá, MAM = Mampituba, TRA = Tramandaí e PAT = Lagoa dos Patos); e em D, mapa com representação gráfica, evidenciando a quebra filogeográfica ao sul de Santa Catarina 101
- Figura 3.** Árvore de Máxima Verossimilhança (ML), obtida a partir de um segmento de 620 pb do gene mitocondrial *COI*, região barcoding. Os valores de *bootstrap* são mostrados nos nós..... 105
- Figura 4.** Árvore de Inferência Bayesiana para o gene mitocondrial *COI*, reconstruída com o programa BEAST, a partir de 620 pares de bases da região *barcoding*. Calibração do relógio molecular com a taxa de mutação do fóssil *Cephalosilurus* (15,9 a 11,5 Ma), segundo Lundberg *et al.* (2009). Os números entre parênteses indicam os valores das probabilidades posteriores e os demais valores referem-se as idades dos nós. Análise com 100 milhões de gerações 106

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- Tabela 1.** Amostras das populações de *Microglanis cottoides*, utilizadas nas análises moleculares, utilizando o gene COI (região barcoding) e morfométricas, conforme suas bacias hidrográficas de origem e de outras espécies de *Microglanis* utilizadas como material comparativo. Em destaque (número de tombo em negrito e sublinhado) as amostras utilizadas apenas para a morfometria **60**
- Tabela 2.** Tabela 2: Divergência genética dentro de *Microglanis cottoides* em 10 bacias diferentes e entre as espécies congêneres. Valores abaixo da diagonal representam a distância média entre elas; na diagonal representa a média das distâncias dentro de cada bacia. As análises foram realizadas utilizando o modelo K2P (Kimura-2-parâmetros). As análises envolveram 184 amostras. RIB (Ribeira de Iguape), PAR (Paranaguá), GUA (Guaratuba), ITA (Itapocu), MAD (Madre), ARA (Araranguá), MAM (Mampituba), TRA (Tramandaí), PAT (Lagoa dos Patos) e URU (Uruguai) **64**
- Tabela 3.** Peso das variáveis nos dois primeiros eixos canônicos, da análise das amostras combinadas de *Microglanis* das regiões sul e sudeste do Brasil..... **69**

Capítulo 2

- Tabela 1.** Amostras das populações de *Microglanis cottoides*, utilizadas nas análises moleculares, conforme suas bacias hidrográficas de origem e de outras espécies de *Microglanis* e de Pseudopimelodidae utilizadas como material comparativo **86**
- Tabela 2.** Características dos 10 *loci* microssatélites desenvolvidos por Souza-Shibatta et al. (2013), utilizados no presente estudo **88**
- Tabela 3.** Diversidade genética de *Microglanis cottoides* a partir de marcadores microssatélites. N= número de indivíduos analisados, A= total de alelos, \bar{N}_A = média de alelos, N_p = número de alelos privados, H_o = heterozigosidade observada, H_e = heterozigosidade esperada, F_{IS} – coeficiente de endogamia. *valor de $p \leq 0,05$. RIB = Ribeira de Iguape, PAR = Paranaguá, GUA= Guaratuba, ITA = Itapocu, MAD = Madre, ARA = Araranguá, MAM = Mampituba, TRA = Tramandaí, PAT = Lagoa dos Patos..... **97**

Tabela 4.	Identidade genética de Nei (diagonal superior) e número de alelos compartilhados (diagonal inferior) entre as nove populações de <i>Microglanis cottoides</i>	98
Tabela 5.	Análise da Variância Molecular (AMOVA) para as nove populações de <i>Microglanis cottoides</i> (RIB + PAR + GUA + ITA + MAD + ARA + MAM + TRA + PAT) apresentando a porcentagem de variação intra e interpopulacional. #Análise das nove populações divididas em dois grupos: 1 (RIB + PAR + GUA + ITA) e 2 (MAD + ARA + MAM + TRA + PAT). (Φ_{ST}): Índice de fixação interpopulacional. * $p < 0,01$ (teste de significância usando 1000 permutações). RIB = Ribeira de Iguape, PAR = Paranaguá, GUA= Guaratuba, ITA = Itapocu, MAD = Madre, ARA = Araranguá, MAM = Mampituba, TRA = Tramandaí, PAT = Lagoa dos Patos.....	99
Tabela 6.	Diferenciação genética par a par entre populações de <i>Microglanis cottoides</i> , utilizando 10 <i>primers</i> de microssatélites, envolvendo 542 indivíduos. Diagonal inferior, valores de Φ_{ST} (parâmetro baseado nas estatísticas <i>F</i> de Wright), e diagonal superior, D_{est} (parâmetro de Jost). Após a correção sequencial de Bonferroni, os resultados de $p < 0,05$ foram significativos para estruturação genética para as duas análises. RIB = Ribeira de Iguape, PAR = Paranaguá, GUA= Guaratuba, ITA = Itapocu, MAD = Madre, ARA = Araranguá, MAM = Mampituba, TRA = Tramandaí, PAT = Lagoa dos Patos.	100
Tabela 7.	Fluxo gênico entre as amostras de <i>Microglanis cottoides</i> , estimados a partir do programa MIGRATE-n. Estimativa de Máxima Verossimilhança da taxa de migração <i>M</i> ($M = \mu/\lambda$). RIB = Ribeira de Iguape, PAR = Paranaguá, GUA= Guaratuba, ITA = Itapocu, MAD = Madre, ARA = Araranguá, MAM = Mampituba, TRA = Tramandaí, PAT = Lagoa dos Patos.....	102
Tabela 8.	Média da distribuição dos indivíduos não migrantes e migrantes para as nove populações de <i>Microglanis cottoides</i> , com nível de confiança de 95%. RIB = Ribeira de Iguape, PAR = Paranaguá, GUA= Guaratuba, ITA = Itapocu, MAD = Madre, ARA = Araranguá, MAM = Mampituba, TRA = Tramandaí, PAT = Lagoa dos Patos.....	103

Tabela 9. Divergência genética (K2P) entre populações de *Microglanis cottoides*, a partir de sequências do gene mtDNA COI, região barcoding. Envolvendo 167 indivíduos. RIB = Ribeira de Iguape, PAR = Paranaguá, GUA= Guaratuba, ITA = Itapocu, MAD = Madre, ARA = Araranguá, MAM = Mampituba, TRA = Tramandaí, PAT = Lagoa dos Patos. N (número de indivíduos analisados) **104**

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL

Aspectos Históricos da Biogeografia	21
O nascimento da Filogeografia.....	24
Estruturação populacional e Filogeografia.....	26
Filogeografia e a Região Neotropical.....	28
A utilização do Barcoding como uma ferramenta na identificação de espécies	30
Microssatélites empregados em estudos filogeográficos.....	32
<i>Microglanis cottoides</i> , uma espécie adequada para estudos filogeográficos	34
Considerações taxonômicas sobre <i>Microglanis cottoides</i>	37
Referências Bibliográficas.....	38

CAPÍTULO 1

STATUS TAXONÔMICO DE *Microglanis cottoides* (Boulenger, 1891) (SILURIFORMES: PSEUDOPIMELODIDAE) DO SUL DO BRASIL: CASOS DE SINONÍMIA E ESPÉCIE CRÍPTICA.

Resumo	48
Abstract	49
Introdução	50
Material e Métodos	53
Amostras.....	53
Molecular.....	55
Extração, Amplificação e Sequenciamento	55
Qualidade e análise dos dados moleculares.....	55
Morfologia	56
Análises Morfométricas.....	56
Resultados	63
Molecular.....	63
Morfológico	67
Discussão	69
Literatura Citada	73

CAPÍTULO 2

FILOGEOGRAFIA DE *Microglanis cottoides* (Boulenger, 1891) (PSEUDOPIMELODIDAE): EVENTOS E PROCESSOS RELACIONADOS À DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE

Resumo	78
Introdução	79
Material e Métodos	82
Amostragens de exemplares e extração de DNA	82
Microsatélites	87
Amplificação e genotipagem	87
Análise dos dados	88
Diversidade Genética.....	88
Estrutura populacional.....	89
Fluxo gênico	90
Citocromo oxidase I (COI)	91
Amplificação e sequenciamento	91
Análises dos dados	92
Distância genética.....	92
Análises filogenéticas e tempo de divergência.....	93
Resultados	95
Diversidade genética (Microsatélites)	95
Distância genética (COI – região <i>barcoding</i>)	102
Discussão	106
Referências	116
APÊNDICE	127

INTRODUÇÃO GERAL

Aspectos Históricos da Biogeografia

Ao longo da história, diversos naturalistas se interessaram por compreender a distribuição dos organismos vivos, como Georges-Louis Leclerc – Conde de Buffon (1707-1788), que notou que as espécies, assim como o clima, são mutáveis, e que diferentes porções do globo apresentam fauna e flora características do local, concluindo que áreas distintas possuem espécies distintas (Brown & Lomolino, 2006); como outro exemplo, cita-se Alexander Von Humboldt (1769-1859), um dos primeiros autores a utilizar a palavra Biogeografia em referência à “Geografia da vida” (Nelson & Platnick, 1981). Entretanto, os maiores avanços em Biogeografia e Biologia Evolutiva do século XIX foram protagonizados, principalmente, por quatro cientistas britânicos, Charles Darwin, Joseph Dalton Hooker, Philip Lutley Sclater e Alfred Russel Wallace, embora muitos outros tenham produzidos trabalhos importantes neste período (Brown & Lomolino, 2006).

Ao longo do tempo diversas mudanças ocorreram nessa área do conhecimento, novas teorias foram propostas e avanços importantes foram realizados (Rosen, 1978; Wiley, 1988; Nelson & Platnick, 1981; Avise et al., 1987; Ronquist & Sanmartín, 2011), como o afloramento da Panbiogeografia proposta por Croizat em 1964, em resposta ao dispersionismo difundido no século XIX, o qual pregava que as distribuições disjuntas dos organismos poderiam ser explicadas por eventos de dispersão, ou seja, as espécies se originavam em centros de origem, a partir dos quais se dispersavam aleatoriamente, atravessando barreiras preexistentes, colonizando novas áreas e dando origem às espécies atuais (Platnick, 1976). Croizat, no entanto, após comparar a distribuição de diferentes táxons, tanto de plantas quanto de animais, concluiu que organismos de relacionamento distante frequentemente exibiam disjunções similares, e que esses padrões de distribuições eram legados de eventos históricos que influenciaram muitas linhagens diferentes. Ele sugeriu então que, em muitos casos, a população ancestral ocupava a somatória das áreas

habitadas hoje por seus descendentes, tendo sido dividida pelo surgimento de barreiras que provocaram o isolamento entre as subpopulações. Essas barreiras seriam as causas da disjunção observada e afetariam grande parte da biota da área (Brown & Lomolino, 2006). Porém, a teoria da deriva continental, proposta por Alfred Wegener em 1915, que poderia explicar muitas das disjunções observadas por Croizat, foi completamente ignorada em muitos dos seus trabalhos iniciais. Ele acreditava que ao contrário de continentes e oceanos móveis, subidas e descidas dos fundos oceânicos foram responsáveis pela mudança na distribuição das massas de terra no globo ao longo do tempo geológico (Brown & Lomolino, 2006; Briggs, 2007) e que pontes continentais e oceânicas efêmeras explicariam a maior parte das conexões entre áreas disjuntas (Morrone, 2002).

Além de Croizat inicialmente não considerar a deriva continental como um fator preponderante para explicar as disjunções na Panbiogeografia, existia uma falha em sua teoria pela falta de um fundamento filogenético, pois se as disjunções não representassem a separação de táxons monofiléticos, não existiria nenhum sentido hipotetizar conexões pretéritas entre elas (Brown & Lomolino, 2006). Entretanto, a junção da sistemática filogenética de Hennig com a Panbiogeografia de Croizat, resolveu este impasse e marcou o nascimento do conceito de Biogeografia de Vicariância (Croizat et al., 1974; Morrone, 2002; Briggs, 2007), que explicaria o processo causal da diversidade, representando uma quebra do paradigma dispersionista (Nihei, 2011) e constituindo a base da Biogeografia moderna (Ebach & Humphries, 2002).

Os padrões de distribuição, na maior parte dos grupos biológicos, são resultantes da dispersão ou da vicariância (Nelson & Platnick, 1981; Santos & Amorim, 2007), entretanto, hipóteses biogeográficas baseadas em dispersão são difíceis de serem testadas porque não há como demonstrar sua universalidade. Por outro lado, quando se busca construir cenários a partir de uma perspectiva calcada na vicariância, a diferença é marcante, já que estes podem

ser testados por meio de análises com outros grupos que ocupam as mesmas áreas e, também, pela comparação com hipóteses geológicas para a região.

A Biogeografia é considerada uma das áreas mais amplas, abrangentes e multidisciplinar das Ciências Biológicas, com o interesse em estudar a distribuição dos seres vivos no espaço e no tempo, tentando reconhecer padrões de distribuição, fornecer hipóteses acerca dos processos que os causaram e propor um sistema de regionalização biótica do planeta (Nelson & Platnick, 1981; Crisci, 2001; Morrone, 2004). Ela surgiu na tentativa de se compreender os padrões de distribuição espacial dos organismos e as causas desses padrões, tanto no que se refere às causas históricas quanto às ecológicas (Nelson & Platnick, 1981). A abordagem histórica tenta explicar a origem da distribuição atual dos táxons através dos processos históricos, como especiação alopátrica e simpátrica, extinção, dispersão (Rosen, 1978) e vicariância (Nelson & Platnick, 1981), já a ecológica trata de examinar a distribuição dos táxons e os mecanismos que mantém ou alteram essa distribuição (Nelson & Rosen, 1981). Trata-se de uma das disciplinas mais complexas e integrativa da Biologia Comparada, pois na tentativa de entender o processo da distribuição geográfica dos organismos, tanto no passado como no presente, e relacioná-lo à biodiversidade que observamos atualmente, tais estudos dependem enormemente de informações sistemáticas e são inter-relacionados a evidências fornecidas por outros campos da Ciência, tais como a Geologia, a Geografia, a Paleontologia, a Biologia Molecular e a Ecologia (Brown & Lomolino, 2006; Posadas et al., 2006; Santos & Amorim, 2007).

Estudos biogeográficos envolvendo níveis taxonômicos acima de espécie, frequentemente, utilizam caracteres morfológicos nas inferências filogenéticas (Lucinda, 2005), por outro lado, em nível intraespecífico os dados moleculares são os mais utilizados (Avice, 2000; Froufe et al., 2005).

O “nascimento” da Filogeografia

O desenvolvimento de marcadores moleculares e de novas tecnologias na década de 70, como a descoberta das enzimas de restrição e de algoritmos capazes de estimar distância genética a partir de mapas de restrição, possibilitou o surgimento da Filogeografia. Esta é uma subárea da Biogeografia que, em sua essência, lida com a distribuição espacial de alelos cuja relação filogenética pode ser inferida. Ela permite compreender os princípios e processos que governam a distribuição geográfica das linhagens genealógicas, principalmente em nível intraespecífico (Avice, 2000, 2009).

Um dos primeiros estudos a apresentar os elementos básicos da Filogeografia, empregada até hoje, foi realizado por Avice e colaboradores em 1979; posteriormente as publicações de vários outros trabalhos com este mesmo enfoque, o termo Filogeografia foi cunhado efetivamente (Avice et al., 1987). De lá para cá, muitos outros estudos com esta temática têm sido apresentados ao redor do mundo, impulsionados principalmente pelo desenvolvimento de técnicas moleculares modernas e programas computacionais, cada vez mais eficientes e de fácil manuseio (Beheregaray, 2008; Avice, 2009; Turchetto-Zolet et al., 2013). Observa-se nesses trabalhos um rápido avanço, a partir dos primeiros estudos utilizando métodos descritivos, para o uso de métodos estatísticos baseados em coalescência (Filogeografia estatística) (Kuhner, 2008), envolvendo testes de modelos *a priori* (Carstens et al., 2005; Avice, 2009). Assim, as análises moleculares com base nas variações de sequência de DNA nos organismos vivos, juntamente com avanços na estatística têm proporcionado um maior entendimento de como eventos geológicos e mudanças climáticas moldaram a história demográfica das populações (Avice, 2009).

O DNA mitocondrial (DNAm_t) foi o marcador molecular inicial escolhido para os estudos filogeográficos por possuir algumas características que o torna mais adequado para o estudo, tais como ser herdado materno, ser haploide, não sofrer recombinação,

evoluir rapidamente (apresenta taxas de mutação mais elevadas que marcadores nucleares), ser de fácil extração, além de ser encontrado em qualquer organismo eucarioto, possibilitando comparações homólogas entre espécies e, em função do tempo de coalescência, serem mais sensíveis a eventos demográficos (Avice et al., 1987). Deste modo, as características deste marcador permitem que as relações filogenéticas entre os haplotipos possam ser facilmente reconstruídas, considerando eventos mutacionais como evidência de relação de ancestralidade e descendência entre haplótipos (Martins & Domingues, 2011).

Entretanto, a Filogeografia não precisa basear-se exclusivamente neste marcador e nem tão somente em dados moleculares, podendo ser utilizadas outras fontes, de origem morfológica, comportamental, entre outras, desde de que as relações filogenéticas entre os táxons estudados estejam associadas a uma distribuição geográfica. Porém, marcadores baseados em fenótipos podem ser facilmente influenciados por fatores não genéticos e apenas um pequeno número de caracteres está disponível para cada organismo, enquanto que os marcadores moleculares são pouco influenciados pelo ambiente e possuem um grande número de caracteres informativos disponíveis em cada organismo. Além disso, o DNA é diretamente herdado e os modos de transmissão podem ser especificados, diferenciando homologias de analogias (Avice, 2000).

A Filogeografia é uma excelente ferramenta para esclarecer padrões históricos e evolutivos entre populações de uma espécie, a partir de estudos genéticos populacionais, como processos demográficos históricos (fluxo gênico, tamanho efetivo populacional, sequências de colonização, gargalos de garrafa) e também para determinar os limites entre espécies e identificar unidades de conservação (Avice et al., 1987; Avice, 2000, 2009; Freeland, 2005; Vázquez-Domínguez, 2007).

A análise e interpretação da distribuição de linhagens requerem a conjugação de uma série de disciplinas, como a Sistemática Filogenética, Genética de populações, Geografia,

Geologia, Demografia, Paleontologia, Ecologia e tantas outras, atribuindo à Filogeografia um caráter multidisciplinar que permite uma ponte entre os processos micro e macroevolutivos (Avise, 2009; Martins & Domingues, 2011). Assim, o estudo da distribuição geográfica de linhagens tem sido amplamente usado para descrever eventos históricos, como fragmentação de habitats ou expansão da área de distribuição de espécies e populações, eventos de migração, vicariância ou extinção de linhagens gênicas, bem como outros processos que afetam a estrutura das populações ou que geram especiação em um contexto espacial e temporal (Avise, 2000; Hardy et al., 2002).

Estrutura populacional e Filogeografia

A capacidade de adaptação de um organismo depende da sua variabilidade genética e, a informação dessa variação, dentro e entre as populações, é importante para compreender a história evolutiva das populações (Hartl & Clark, 2008). A estrutura populacional é observada em praticamente todos os grupos de organismos, e quando estes são comparados, em geral, é esperado algum tipo de diferença genética e morfológica em relação à sua distribuição geográfica. Essa estruturação é resultado de processos evolutivos que atuam sobre a variabilidade genética presente nas populações, que surge através de mutações aleatórias, gerando novos alelos ou recombinações cromossômicas entre populações. Os processos evolutivos podem ser causados por fatores geográficos, ecológicos e comportamentais, além dos aspectos genéticos de cada espécie e sua história biológica (Avise, 2000). Assim, o estudo da estrutura genética da população é essencial para o entendimento da dinâmica das populações, bem como dos fatores responsáveis.

Na atualidade, a abordagem mais utilizada para descrever a estrutura populacional, à luz da distribuição geográfica, é a da Filogeografia, que gera informações importantes sobre os processos evolutivos envolvidos na determinação dos padrões atuais de distribuição e

diversificação entre populações e espécies atuais. Esses padrões, tanto da distribuição quanto da variação genética populacional, são o resultado de eventos históricos, como vicariância e migração, ou recorrentes, como o fluxo gênico atual e variações ambientais recentes. A definição de tais eventos fornece informações para desvendar os processos evolutivos que podem ter levado populações a se diferenciar em espécies ao longo do tempo, gerando uma marca genética e um padrão filogeográfico distinto (Avise, 2000; Templeton, 2001).

A grande diferença da abordagem filogeográfica para a abordagem puramente populacional reside no fato de que a Filogeografia apresenta um enfoque na história da espécie, principalmente no passado biogeográfico (Knowles & Meddison, 2002). Com esse enfoque é possível realizar estudos de processos micro e macroevolutivos, além da descrição das distribuições geográficas das espécies, suas relações filogenéticas e distâncias genéticas entre linhagens evolutivas, possibilitando uma melhor compreensão da Biogeografia regional e áreas de endemismo das espécies (Bermingham & Martin, 1998).

Estudos filogeográficos realizados hoje contam não só com as abordagens filogenéticas e de genética de populações clássicas, mas também com sofisticados métodos de inferência em demografia histórica baseados em abordagens matemáticas e estatísticas da Teoria da Coalescência (Martins & Domingues, 2011), a qual se baseia na identificação do processo genealógico de uma amostra de genes em uma população, capaz de identificar eventos que ocorreram com os genes desde o ancestral comum mais recente, ou em inglês *Most Recent Common Ancestor* (MRCA) (Kingman, 1982); ou seja, é um modelo retrospectivo de genética populacional que emprega uma amostra dos indivíduos de uma população para rastrear todos os alelos de um gene compartilhados por todos os membros da população até uma única cópia ancestral. Essa teoria é um tópico alvo nos estudos de populações, sendo reconhecida como premissa teórica em várias análises estatísticas no

campo da Filogeografia (Fu & Li, 1999) e é o instrumento interpretativo mais usado na análise dos processos populacionais que estão na base da variação de sequências de DNA.

Assim, depois de quase 20 anos dos primeiros trabalhos com o enfoque filogeográfico, a Filogeografia Comparativa está pronta para alcançar o que Avise e seus colaboradores originalmente haviam previsto: resolver profundos enigmas sobre como as interações climáticas, geográficas ecológicas podem determinar e interagir com a composição da comunidade e sua evolução (Hickerson et al., 2010).

Filogeografia e a região Neotropical

A região Neotropical apresenta um dos mais altos níveis de biodiversidade na Terra, principalmente na América do Sul (Reis et al., 2003), e grande parte da diversificação teve início no Cretáceo, entre 120 a 100 milhões de ano (Ma) (Albert & Reis, 2011), quando o continente foi palco de um dos maiores episódios vulcânicos da história geológica da Terra, causado por uma sucessão de grandes eventos geológicos, como a separação dos continentes, que modificaram tanto os continentes quanto as bacias oceânicas. Acredita-se que todos esses eventos mais a estabilidade climática a longo prazo, teriam favorecido o acúmulo gradual da biodiversidade dessa região e a própria evolução das espécies (Lavina & Fauth, 2011). Evidências moleculares apontam que os eventos paleogeográficos do Mioceno tardio é que promoveram essa grande diversificação (Moritz et al., 2000), no entanto outros estudos demonstram que os ciclos climáticos do Pleistoceno tiveram um papel ainda mais significativo (Thoisly et al., 2010).

Apesar da grande biodiversidade na América do Sul, estudos filogeográficos nesta região são bastante incipientes, principalmente quando comparado ao hemisfério Norte (Beheregaray, 2008; Sérsic et al., 2011), pois de todos os trabalhos publicados no mundo sobre Filogeografia, apenas 6,3% são dedicados aos organismos sul-americanos

(Beheregaray, 2008). Entretanto, nos últimos anos, trabalhos com abordagem filogeográfica aumentaram significativamente e vêm contribuindo para a compreensão dos processos evolutivos que culminaram na atual diversidade e distribuição de linhagens modernas nessa região (Turchetto-Zolet et al., 2013).

Boa parte da biodiversidade da região Neotropical é atribuída à ictiofauna de água doce desta região, que é considerada a mais rica do mundo, com aproximadamente 5.000 espécies, das 13.000 estimadas para o planeta (Reis et al., 2003), com a maior parte desta diversidade ocorrendo nas bacias hidrográficas do território brasileiro (Buckup et al., 2007; Graça & Pavanelli, 2007).

Peixes de água doce, em geral, exibem acentuada estrutura filogeográfica ligada às alterações históricas e ecológicas ocorridas nesse ambiente (Bermingham & Avise 1986; Waters et al., 2007). Como esses organismos dependem diretamente de conexões entre rios e bacias para sua distribuição, a história das bacias e sua ictiofauna associada está intimamente ligada à história da paisagem (Avise, 2000, 2009). Assim, a diferenciação das espécies por isolamento geográfico é o reflexo do passado geológico e as mudanças ambientais ocorridas na região. Embora a escala temporal desses eventos ou processos possa ser bastante variável, níveis de divergências podem ser reconstruídos a partir de graus de divergência do DNAm (Bermingham & Martin, 1998; Sivasudar et al., 2001; Montoya-Burgo, 2003).

A despeito da grande diversidade de peixes de água doce na região Neotropical (Reis et al., 2003), principalmente em território brasileiro (Buckup et al., 2007; Graça & Pavanelli, 2007), trabalhos com foco filogeográfico (ex. Sivasundar et al., 2001; Beheregaray et al., 2001; Montoya-Burgos, 2003) são ainda escassos devido ao fato de muitos táxons estarem indefinidos do ponto de vista taxonômico, filogenético e geográfico (Vari & Malabarba, 1998).

A utilização do *barcoding* como uma ferramenta na identificação de espécie

A identificação e descrição de espécies são realizadas, tradicionalmente, com base em caracteres morfológicos. No entanto, geralmente essas abordagens apresentam limitações quando os caracteres utilizados são mascarados pelo efeito da plasticidade fenotípica e/ou pela variabilidade genética (Hebert et al., 2003a). Por essa razão, nas últimas décadas, várias ferramentas moleculares têm sido utilizadas em conjunto com a morfologia visando o estudo da diversidade biológica. Dentre o conjunto de ferramentas moleculares disponíveis, um curto segmento de 648 nucleotídeos da extremidade 5' do gene mitocondrial da Citocromo Oxidase I (COI), proposto por Hebert et al. (2003a), está sendo empregado satisfatoriamente para resolver ambiguidade taxonômica (Hebert et al., 2004), no estudo da biodiversidade de organismos (Grant et al., 2011) e na identificação de espécies de peixes de água doce (Lara et al., 2010; Aquino et al., 2011; Bhattachajee et al., 2012; Ardura et al., 2012) e marinha (Mabraganã et al., 2011; Ribeiro et al., 2013; McCusker et al., 2013).

A utilização do gene COI como “código de barra” genético, sugerido por Hebert et al. (2003a), teve como base um estudo envolvendo espécies de Lepidoptera, o qual mostrou que 98% das espécies morfológicamente válidas apresentavam distâncias genéticas maiores que 3%. Estes autores observaram que os 2% restantes das amostras consistiam em indivíduos do mesmo gênero com clara distinção genética e morfológica, com a distância genética menor que 3% sendo indicativa de uma divergência mais recente. Avise (2000) afirma que valores de divergência próximos e maiores que 2% podem refletir a ocorrência de populações com grande isolamento geográfico, podendo haver casos de reconsideração de *status* taxonômico.

A eficiência na discriminação de espécies pelo gene COI, constatada por Hebert et al. (2003a), se deve ao baixo nível de variação nucleotídica, principalmente nas porções catalíticas desse peptídeo, o que permite relacionar indivíduos de uma mesma espécie. Por

outro lado, as regiões com maior nível de variação, que estão relacionadas a parte estrutural deste gene, permitem a diferenciação de espécies proximamente relacionadas, ou que apresente uma radiação recente (Blaxter, 2004; Ward et al., 2009).

Na região Neotropical, em peixes de água doce, esta ferramenta foi usada com grande sucesso em estudo de diversidade, identificação de espécies crípticas e conflitos taxonômicos, com a maioria dos casos tendo 100% das espécies corretamente identificadas, inclusive em espécies estreitamente relacionadas (Carvalho et al., 2011; Pereira et al., 2011ab, 2013; Rosso et al., 2012) e em diferentes estágios do ciclo de vida (Frantine-Silva et al., 2015), comprovando a efetividade dessa ferramenta. Entretanto, Albert & Reis (2011) afirmam que a identificação taxonômica da ictiofauna Neotropical ainda é um grande desafio, mesmo quando se utiliza abordagem molecular, pois a diversificação da maior parte dessa ictiofauna ocorreu recentemente, entre 3 e 10 Ma.

Entretanto, há algumas críticas em relação a utilização desse único fragmento do DNAmT para a identificação e descrição de novas espécies, bem como para análises filogenéticas (Lipscomb et al., 2003; Moritz & Cícero, 2004; Queiroz, 2005). Segundo Will & Rubinoff (2004), esse marcador pode não ser informativo o suficiente para descrever a grande diversidade biológica, pois conforme Waugh (2007), em alguns grupos, como de determinados cnidários bentônicos, dois grupos de anfíbios e algumas espécies de gastrópode, o uso dessa ferramenta não foi suficiente para distinção em nível de espécie. Porém, acredita-se que esse fato seja devido a esses grupos serem formados por espécies com tempo de divergência bastante recente. Contudo, observa-se que a metodologia DNA *barcoding* tem grande potencial para solucionar problemas com relação ao *status* taxonômico dos organismos, tornando-se uma ferramenta valiosa para a taxonomia e a sistemática (Hebert, 2003a, 2003b; Waugh, 2007; Ward et al., 2009).

Microssatélites empregados em estudos filogeográficos

Segundo Turchetto-Zolet et al. (2013), até 2011, quase 80% dos estudos com abordagens filogeográficas na América do Sul utilizaram o DNAmT como marcador, destes, 20% foram em conjunto com outros marcadores como o polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP, do inglês *Amplified Fragment Length Polymorphism*), polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA (RFLP, do inglês *Restriction Length Fragment Polymorphism*) e Microssatélites ou sequências simples repetidas (SSRs, do inglês *Simple Sequence Repeat*, ou STRs, *Single Tandem Repeat*).

A utilização de microssatélites em estudos de populações pode ser empregado na determinação do grau de relação entre indivíduos e/ou grupos de uma mesma espécie, na análise de ascendência, como ferramenta para avaliar os níveis de endogamia de uma população, para analisar sua história demográfica, determinar o tamanho efetivo de uma população e avaliar a magnitude e direcionamento do fluxo de genes entre as populações (Gaggiotti et al., 2002). Estes marcadores também fornecem dados apropriados para estudos filogeográficos que procuram explicar a concordância da história biogeográfica e genética da flora e fauna de regiões em larga escala (Koskinen et al., 2002) e em estudos filogenéticos em escala fina com espécies proximamente relacionadas (Richard & Thorpe, 2001).

Os microssatélites são marcadores muito variáveis e abundantemente distribuídos no genoma de eucariotos e procariotos. Em eucariotos, podem ser encontrados nos genomas tanto nucleares como de organelas (Tautz, 1989, Weber & May, 1989). O alto polimorfismo desse tipo de marcador leva à possibilidade de identificar perfis característicos de cada indivíduo de uma mesma espécie, de acordo com a variação no número das repetições (Tautz, 1989). Microssatélites são classificados como perfeitos, imperfeitos ou compostos. Os perfeitos são aqueles onde o *motif* (ou motivo) se repete sem interrupção de um outro *motif*

ou sequência. Já os compostos apresentam mais de um tipo de *motif*. E nos imperfeitos, há outras sequências além daquelas repetidas em *tandem*. A herança dos microssatélites é co-dominante, o que permite a distinção entre homozigotos e heterozigotos (Weber & May, 1989).

Na maioria das vezes, os microssatélites são considerados marcadores neutros, entretanto vários fenômenos biológicos têm sido atribuídos a eles, como por exemplo a participação na organização da cromatina (Epplen et al., 1996), na replicação do DNA, na recombinação (Biet et al., 1999) e na expressão gênica (Liu et al., 2001).

A alta taxa de mutação dos microssatélites, variando de 10^{-2} a 10^{-6} eventos por loco por geração, atualmente é atribuída aos erros de pareamento devido ao deslizamento das fitas no momento da replicação. Esses erros são responsáveis pela adição ou deleção de repetições que conferem o caráter altamente polimórfico desses locos (Schlotterer, 1998). Esses eventos proporcionam grande diversificação no tipo deste marcador, que pode variar de mononucleotídeo a hexanucleotídeos, e no número de repetições encontradas em diferentes espécies, conferindo a este marcador alto polimorfismo (Ellegren, 2000), tornando-os ideais para estudos populacionais em diferentes níveis, contribuindo para responder a questões como o grau de mistura genética entre as populações e diferentes níveis de parentesco e fluxo gênico. Adicionalmente, os microssatélites podem trazer informações sobre padrões filogeográficos (Turchetto-Zolet et al., 2013). Contudo, esses marcadores são indicados para estudos que visam responder a questões recentes dentro de uma mesma espécie ou que envolvem espécies relacionadas (Turchetto-Zolet et al., 2013), pois à medida que se trabalha com níveis sistemáticos mais altos, problemas como fenômenos de homoplasia tornam-se mais prováveis devido à alta taxa de mutação (Selkoe & Toonen, 2006).

Embora os microssatélites sejam considerados um excelente marcador para estudos populacionais (Selkoe & Toonen, 2006) e filogeográficos (Koskinen et al., 2002), a sua

utilização apresenta certa limitação devido ao baixo índice de transferabilidade dos *primers* (ou iniciadores) entre espécies, especialmente entre famílias e/ou ordens diferentes. Por este motivo eles precisam ser isolados na maioria das espécies que estão sendo analisadas pela primeira vez (Zane et al., 2002).

***Microglanis cottoides*, uma espécie adequada para estudos filogeográficos**

Microglanis Eigemmann, 1912, pertence a um grupo de peixes sul-americano com características apropriadas para estudos biogeográficos, pois as 24 espécies desse gênero, descritas até o momento, têm sua distribuição bastante ampla, ocorrendo nas bacias do Orinoco e Amazônia drenagens costeiras do Equador, drenagens Caribenhas da Venezuela, drenagens da costa Atlântica das Guianas e Sudeste oriental do Brasil, no rio São Francisco até o estado do Rio Grande do Sul, bacia do rio Paraguai e bacia do Uruguai (Jardulli & Shibatta, 2013; Shibatta, 2014). Dentre essas espécies, *Microglanis cottoides* (Boulanger, 1898) se mostra especialmente interessante para estudo filogeográficos e populacionais, pois esta espécie possui ampla distribuição geográfica na Mata Atlântica, de São Paulo ao Rio Grande do Sul, ao longo da costa Leste do Brasil e na bacia do rio Uruguai (Malabarba & Mahler, 1998, Shibatta, 2003, 2007; Mori & Shibatta, 2006; Oyakawa & Menezes, 2011), regiões consideradas áreas de grande significado biogeográfico e alto grau de endemismo em sua ictiofauna (Bizerril, 1994, 1995). Além disso, alguns dos rios onde são encontrados, tais como os rios Jacuí, Itajaí e Ribeira do Iguape, deságuam diretamente no oceano Atlântico e estão isolados entre si, provavelmente, desde o período da transgressão marinha Flandriana, que ocorreu entre 6.000 a 10.000 anos antes do presente (Menezes, 1988).

A costa Atlântica brasileira, onde *Microglanis cottoides* ocorre, foi formada por vários processos geológicos que remontam a era Mesozóica, desde do rompimento da Gondwana (~180 milhões de anos - Ma), incluindo elevação do Mega Domo e eventos de

erosão (Ribeiro, 2006). Interações entre eventos orogênicos do Mioceno/Plioceno e oscilações climáticas do Pleistoceno, moldaram a distribuição da ictiofauna dessa região de uma forma bastante distinta, devido aos rios que formam uma série de bacias hidrográficas ao longo da costa, que drenam diretamente para o Atlântico, e estão isoladas entre si (Weitzman et al., 1988; Lundberg et al., 1998; Ribeiro, 2006), bem como separadas das grandes drenagens do interior, pelas montanhas escarpadas da margem oriental do escudo cristalino brasileiro (Ribeiro, 2006). Este cenário propicia padrões filogeográficos particularmente complexos, como o endemismo de mais de 270 espécies de peixes apontado por Bizerril (1994) para essa região. Entretanto, informações históricas sobre as comunidades de peixes dessa região ainda são escassas e fragmentadas, dificultando o entendimento dos processos históricos que determinaram a composição e distribuição dessa ictiofauna (Bizerril & Lima, 2000).

Possivelmente essas bacias costeiras estejam isoladas devido ao atual nível do mar desde o final do Último Máximo Glacial (UMG) que, segundo Mangerud et al. (2004) durou de 110.000 a 10.000 anos antes do presente (a.a.p.). Flutuações do nível do mar ocorridas durante o Quaternário deixaram evidências, como paleocanais e paleovales na plataforma continental, que comprovam a ocorrência de fases de exposição e submersões sucessivas da costa (Abreu & Calliari, 2005). Estudos atuais na plataforma continental brasileira evidenciam a presença de paleovales escavados por antigos leitos fluviais nos estados do Rio Grande do Sul (Abreu & Calliari, 2005; Weschenfelder et al., 2008; Suguio, 2010) e São Paulo (Conti & Furtado, 2009). A presença e a geometria de paleodrenagens na plataforma continental, e a posição das drenagens atuais podem apresentar uma relação direta, como observado nas paleodrenagens correlacionadas ao rio Ribeira do Iguape e ao rio Juqueriquerê (Conti & Furtado, 2009).

Com base em estudos da plataforma continental do Rio Grande do Sul, Suguio (2010)

sugere que a evolução do nível do mar na costa brasileira teve início durante a última fase transgressiva, entre 17.000 e 6.500 a.a.p., e que o nível relativo do mar chegou a ter cerca de 130 metros abaixo do nível atual, evidenciando uma grande área da plataforma continental, que hoje está submersa, que pode ter chegado a mais de 120 km de extensão, como no caso da região de Chuí, no Rio Grande do Sul. Feições geomorfológicas associadas à presença de canais fluviais em plataformas continentais podem indicar que as drenagens costeiras, que hoje desembocam diretamente nos oceanos, tinham comunicação com outras drenagens de bacias próximas, permitindo o fluxo da ictiofauna.

Aliado a essas características geomorfológicas e climáticas, consideradas importantes para estudos filogeográficos, existe a hipótese de ocorrência de espécies crípticas em populações de *M. cottoides*, por apresentarem diferenças sutis na morfologia externa, tais como proporções corporais e padrão de colorido, mas que não foram suficientes para confirmar novas espécies, sendo denominadas como “grupo *cottoides*” (Mori & Shibatta, 2006). Essas diferenças, segundo os mesmos autores, podem estar relacionadas a processos ecológicos, geomorfológicos e vicariantes. Além disso, a ocorrência de *M. cottoides* em simpatria com seus congêneres, aparentemente endêmicos, como *M. cibela* Malabarba & Mahler, 1998, das bacias do Tramandaí e Mampituba, *M. malabarbai* Bertaco & Cardoso, 2005, da bacia do médio rio Uruguai (Bertaco & Cardoso, 2005) e *M. eurystoma* Malabarba & Mahler, 1998, da bacia do Alto rio Uruguai (Malabarba & Mahler, 1998), torna a Filogeografia dessa espécie ainda mais instigante.

Considerações taxonômicas sobre *Microglanis cottoides*

Microglanis cottoides é um Pseudopimelodidae cujo histórico taxonômico apresenta vários equívocos, que geraram numerosos problemas taxonômicos, alguns dos quais ainda necessitam ser solucionados.

Os equívocos iniciaram em uma época em que os limites entre as famílias e gêneros de bagres neotropicais eram pouco conhecidos. Em 1876, Steindachner descreveu a espécie *Pimelodus (Rhamdia) parahybae*, mas quatro anos depois reconheceu-a como *Pseudopimelodus parahybae*. Possivelmente, baseado nessas decisões de Steindachner, mas não a aceitando completamente, Boulenger (1891) descreveu a espécie do rio Camaquã, RS, como *Pimelodus (Pseudopimelodus) cottoides* considerando-a semelhante a *Pseudopimelodus parahybae* Steindachner, 1880. Posteriormente, Gosline (1941) transferiu *P. (P.) cottoides* para o gênero *Microglanis* e Gomes (1946) concluiu que *Pseudopimelodus cottoides* era sinônimo sênior de *Microglanis parahybae*. Entretanto, Mees (1974), com base no Código de Nomenclatura Zoológica, concluiu que essa sinonímia estava equivocada, sendo *M. parahybae* o sinônimo sênior. Em função dessa sinonimização, as populações de *Microglanis* que se distribuía do sudeste ao sul do Brasil eram identificadas como *M. parahybae*. Essa situação perdurou por muitos anos até que Malabarba & Mahler-Jr. (1998), ao revisarem as espécies da bacia do rio Camaquã e do rio Uruguai, redescobriram *M. cottoides* e a retiraram da sinonímia com *M. parahybae*. Entretanto, análises morfológicas mais recentes, sugeriram que *M. cottoides* formava um complexo de espécies, que distribuía-se pelas drenagens abaixo do rio Paraíba do Sul até o rio Grande do Sul (Mori, 2005), lançando uma das hipóteses que serão testadas nesta tese.

Referências Bibliográficas

- Abreu, J. G. N., Calliari, L. J. (2005). Paleocanais na plataforma continental interna do Rio Grande do Sul: evidências de uma drenagem fluvial pretérita. *Revista Brasileira de Geofísica*, 23(2):123-132.
- Albert, J. S. & Reis, R. E. (2011). *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. Berkeley, CA: University of California Press, 388 pp.
- Aquino, L. M., Tango, J. M., Canoy, R. J., Fontanilla, I. K., Basiao, Z. U., Ong, P. S. & Quilang, J. P. (2011) DNA barcoding of fishes of Laguna de Bay, Philippines. *Mitochondrial DNA* 22: 143–153.
- Ardura, A., Horreo, J. L., Hernandez, E., Jardon, A., Pola, I. G., Martinez, J. L. & García-Vázquez, E. (2012). 'Forensic DNA analysis reveals use of high trophic level marine fish in commercial aquaculture fish meals', *Fisheries Research*, 115-116 (0): 115-20.
- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press; Cambridge, MA. 447p.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lambt, T., Neigel, J. E., Reeb, C.A. & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics And Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489-522.
- Avise, J.C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36: 3-15.
- Beheregaray, L. B., Sunnucks, P. & Briscoe, D. A. (2001). A rapid fish radiation associated with the last sea-level changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proceedings Biological sciences. The Real Society*, 269: 65-73.
- Bermingham, E. & Avise J. C. (1986). Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. *Genetics*, 113: 939-965.
- Bermingham, E. & Martin, A. P. (1998). Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing sharded history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology*, 7: 499-518.
- Bertaco, V. A. & Cardoso, A. R. (2005). A new species of *Microglanis* (Siluriformes: Pseudopimelodidae) from rio Uruguay drainage, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 3(1): 61-67.
- Bhattacharjee, M. J., Laskar, B. A., Dhar, B. & Ghosh, S. K. (2012) Identification and re-evaluation of freshwater catfishes through DNA barcoding *PLoS ONE*, 7(11): p. e49950 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0049950>

- Biet, E., Sun, J. & Dutreix, M. (1999). Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: An effect of ssDNA secondary structure. *Nucleic Acids Research*, 27: 596–600.
- Bizerril, C. R. S. F. (1994). Análise taxonômica e biogeografia da ictiofauna de água doce do leste brasileiro. *Acta Biológica Leopoldensia*, 18: 51-80.
- Bizerril, C. R. S. F. (1995). Análise da distribuição espacial da ictiofauna de uma bacia hidrográfica do leste brasileiro. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*. 38(2): 477-499.
- Bizerril, C. R. S. F. A. & Lima, N. R. M. (2000). Levantamento da ictiofauna da bacia do rio Ribeira de Iguape, Brasil. *Acta Biol. Leopoldensia*, 22:103-110.
- Blaxter, M. L. (2004). The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions B*, 359(1): 669-679.
- Boulenger, G. A. (1891). An account of the siluroid fishes obtained by Dr. H. Von Ihering and Herr Sebastian Wolff in the province Rio Grande do Sul. *Proceedings of the Zoological Society of London*, (2): 231-235.
- Briggs, J. C. (2007). Panbiogeography: its origin, metamorphosis and decline. *Russian Journal of Marine Biology*, 33(5): 273-77.
- Brown, J. H. & Lomolino, M. V. (2006). *Biogeografia*. Trad. Iulo Feliciano Afonso. 2ªed. rev. e ampl. Ribeirão Preto: FUNPEC.
- Buckup, P. A., Menezes, N. A. & Ghazzi, M. S. (2007). *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Rio de Janeiro, Museu Nacional.
- Carstens, B.C., Brunfeld, S. J, Demboski, J. R., Good, J. M. & Sullivan J. (2005). Investigating the evolutionary history of the pacific northwest mesic forest ecosystem: hypothesis testing within a comparative phylogeographic framework. *Evolution*, 59: 1639–1652.
- Carvalho, D. C., Oliveira, D. A. A., Pompeu, P. S., Leal, C. G., Oliveira, C. & Hanner, R. (2011). Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River Basin. *Mitochondrial DNA*, 22(Suppl 1): 1-7
- Conti, L. A. & Furtado, V. V. (2009). Topographic Registers Of Paleo-Valleys on the Southeastern Brazilian Continental Shelf. *Brazilian Journal of Oceanography*, (57): 1.
- Crisci, J.V. (2001). The voice of historical biogeography. *Journal of Biogeography*, 28: 157-168.
- Croizat, L. (1964). *Space, time, form: the biological synthesis*. Publicado pelo autor, Caracas.
- Croizat, L. N., Gareth. J. & Rosen, D. E. (1974). Centers of Origin and Related Concepts. *Systematic Zoology*, 23: 265-87.

- Ebach, M. C. & Humphries, C. J. (2002). Cladistic biogeography and the art of discovery. *Journal of Biogeography*, 29: 427–444.
- Ellegren, H. (2000). Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics*, 16(12): 551–558.
- Epplen, J. T., Kyas, A. & Maueler, W. (1996) Genomic simple repetitive DNAs are targets for differential binding of nuclear proteins. *FEBS Letters*, 389: 92–95.
- Frantine-Silva, W., Sofia, S. H., Orsi, M. L. & Almeida, F. S. (2015). DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. *Molecular Ecology Resources*. doi: 10.1111/1755-0998.12385
- Freeland, J. R. (2005). *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex.
- Froufe, E., Alekseyev, S. I., Knizhin, I. & Weiss, S. (2005). Comparative mtDNA sequence (control region, ATPase 6 and NADH-1) divergence in *Hucho taimen* (Pallas) across four Siberian river basins. *Journal of Fish Biology*, 67: 1040-1053.
- Fu Y. X. & Li, W. H. (1999) Coalescing into the 21st century: D_e , an overview and prospects of coalescent theory. *Theoretical Population Biology*, 56: 1-10
- Gaggiotti, O. E., Lange, O., Rassmann, K. & Gliddon, C. A. (2002). Comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology*, 8: 1513-1520.
- Graça, W. J. & Pavanelli, C. S. (2007). Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. Maringá: Eduem, 241p.
- Grant, R. A., Griffiths, H. J., Steinke, D., Wadley, D. V. & Linse, K. (2011). Antarctic DNA barcoding; a drop in the ocean? *Polar Biology*, 34: 775-780.
- Hardy, M. E, Grady, J. M. & Routman, E. J. (2002). Intraspecific phylogeography of the slender madtom: the complex evolutionary history of the Central Highlans of United States. *Molecular Ecology*, 11: 2393–2403.
- Hartl, D. L. & Clark, A. J. (2008). *Princípios de Genética de Populações*. 3ed. ArtMed, Porto Alegre.
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(1): 14812-14817.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & Dewaard, J. R (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Real Society Biology*, 270(1): 313-321,

- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & Dewaard, J. R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society Biology*, 270(1): 96-99.
- Hickerson, M. J., Carstens, B. C., Cavendar-Bares, J., Crandall, K. A., Graham, C. H., Johnson, J. B., Rissler, L., Victoriano, P. F., & Yoder, A. D. (2010.) Phylogeography's past, present and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 291–301.
- Jarduli, L. R. & Shibatta, O. A. (2013). Description of a new species of *Microglanis* (Siluriformes: Pseudopimelodidae) from the Amazon basin, Amazonas State, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 11: 507-512.
- Kingman, J. F. C. (1982). *The Coalescent. Stochastic Processes and their Applications*. North-Holland Publishing Company, 13: 235-248.
- Knowles, L. L. & Maddison, D. R. (2002) Statistical phylogeography. *Molecular Ecology*, 11: 2623–2635.
- Koskinen M. T., Nilsson J., Veselov A. Je., Potutkin A. G., Ranta E. & Primmer C. R. (2002). Microsatellite data resolve phylogeographic patterns in European grayling, *Thymallus thymallus*, Salmonidae. *Heredity*, 88: 391-401.
- Kuhner, M. K. (2008). Coalescent genealogy samplers: windows into population history. *Trends in Ecology and Evolution*, 24 (2): 86-93.
- Lara, A, de León, J. L. P., Rodríguez, R., Casane, D., Côte, G., Bernatchez, L. & Garcia-Macahdo, E. (2010). DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Molecular Ecology Research*, 10: 421–430.
- Lavina, E. L. & Fauth, G. (2011). Evolução geológica da América do Sul nos últimos 250 milhões de anos, p. 3-13. In: *Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos*. Claudio J. B. de Carvalho & Eduardo A. B. de Almeida (Orgs.), ROCA (Eds.) 306p.
- Lipscomb, D., Platnick, N. & Wheeler, Q. (2003). The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(1): 65-66.
- Liu, J., Nyholt, D. R., Magnussen, P., Parano, E., Pavone, P., Geschwind, D., Lord, C, Iversen, P., Hoh, J. Ott, J. & Gilliam, T. C. (2001). The Autism Genetic Resource Exchange Consortium. A genomewide screen for autism susceptibility *loci*. *The American Journal of Human Genetics*, 69: 327–340.
- Lucinda, P. H. F. (2005). Systematics of the genus *Cnesterodon* Garman, 1895 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae). *Neotropical Ichthyology*, 3(2): 259–270.
- Lundberg, J. G., Linares, O., Antonio, M. & Nass, P. (1988). *Phractocephalus hemiliopterus* (Pimelodidae, Siluriformes) from the upper Miocene Urumaco formation, Venezuela: a further case of evolutionary stasis and local extinction among south American fishes. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 8: 131-138.

- Mabraganã, E., Díaz, A. J. M., Hanner, R., Zhang, J. & González, C. M. (2011). DNA Barcoding Identifies Argentine Fishes from Marine and Brackish Waters. *PLoS ONE* 6(12): e28655. doi:10.1371/journal.pone.0028655
- Malabarba, L. R. & Mahler-Jr, J. K. F. (1998). Review of the genus *Microglanis* in the rio Uruguay and coastal drainages of southern Brazil (Ostariophysi: Pimelodidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 9(3): 243-254.
- Mangerud, J., Jakobsson, J., Alexanderson, H., Astakhov, V., Clarke, G. K. C., Henriksen, M., Hjort, C., Krinner, G., Lunkka, J. P., Möller, P., Murray, A., Nikolskaya, O., Saarnisto, M. & Svendsen J. I. (2004). Ice-dammed lakes and rerouting of the drainage of northern Eurasia during the last glaciation. *Quaternary Science Reviews*, 23: 1313–1332.
- Martins, F. M. & Domingues M. V. (2011). Filogeografia. pp. 137-150. In: Carvalho, C. J. B. & Almeida, E. A. B. (Orgs). *Biogeografia da América do Sul: Padrões & Processos*. Roca, São Paulo, 306p.
- McCusker, M. R., Denti, D., Van Guelpen, L., Kenchington, E. & Bentzen, P. (2013). Barcoding Atlantic Canada's commonly encountered marine fishes. *Molecular Ecology Resources* 13: 177–188.
- Mees, G. F. (1974). The Auchenipteridae and Pimelodidae of Suriname (Pisces, Nematognathi). *Zoologische Verhandelingen*, 132: 1-246.
- Menezes, N.A. (1988). Implications of the distribution patterns of the species of *Oligasarcus* (Teleostei, Characidae) from central and southern South America. pp. 295-304. In: Heyer, W. R. & Vanzolini P. E. (Eds). *Proceedings of workshop on Neotropical distribution patterns*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- Montoya-Burgo, J. I. (2003). Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, 12: 1855-1867.
- Mori, H. & Shibatta, O. A. (2006). A new species of *Microglanis* Eigenmann, 1912 (Siluriformes: Pseudopimelodidae) from Rio São Francisco basin, Brazil. *Zootaxa*, 1302: 31-42.
- Moritz, C. & Cicero, C. (2004). DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biol.* 2(10):1529-1531.
- Moritz, C., Patton, J., Schneider, C. J. & Smith, T. B. (2000). Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31: 533-563.
- Morrone, J. J. (2002). El espectro del dispersalismo: de los centros de origen a las áreas ancestrales. *Revista da Sociedad Entomológica Argentina*, 61: 1-14.
- Morrone, J. J. (2004). Homología biogeográfica: las coordenadas espaciales de la vida.

Cuadernos del Instituto de Biología 37, Instituto de Biología, UNAM, México D.F.

- Nelson, G. J. & Platnick, N. I. (1981). Systematics and biogeography: cladistics and vicariance. New York: Columbia University Press.
- Nihei, S. S. (2011). Biogeografia cladística. In: Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos. Claudio J. B. de Carvalho & Eduardo A. B. de Almeida (Orgs.), ROCA (Eds.) 306p.
- Oyakawa, O. T., & Menezes, N. A. (2011). Checklist dos peixes de água doce do Estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica*, 11(1).
- Pereira, L. H. G., Hanner, R., Foresti, F. & Oliveira C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics* 14:20 <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/14/20>
- Pereira, L. H. G., Pazian, M. F., Hanner, R., Foresti, F. & Oliveira C. (2011a). DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22 (Suppl 1): 71–79.
- Pereira, L. H. G., Pazian, M. F., Hanner, R., Foresti, F. & Oliveira C. (2011b). DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paraná Basin of Brazil. *Mitochondrial DNA*. 22(Suppl 1): 87–96.
- Platnick, N. I. (1976). Drifting Spiders or Continents? Vicariance Biogeography of the Spider Subfamily Laroniinae (Araneae: Gnaphosidae). *Systematic Zoology*, 25(2): 101-109.
- Posadas, P., Crisci, J.V. & Katinas, L. (2006). Historical biogeography: a review of its basic concepts and critical issues. *Journal of Arid Environments*, 66: 389-403.
- Queiroz, K. (2005). Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(1): 6600-6607.
- Reis, R. E., Kullander, S. O. & Ferraris-Jr., C. J. (2003). Check list of the freshwater fishes of South and Central. Porto Alegre: EDIPUCRS. 742p.
- Ribeiro, A. C. (2006). Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical ichthyology*, 4(2): 225-246.
- Ribeiro, A. C., Jacob, R. M., Silva, R. R. R. S., Lima, F. C. T., Ferreira, D. C., Ferreira, K. M., Mariguela, T. C., Perreira, L. H. G. & Oliveira, C. (2013). Distributions and phylogeographic data of rheophilic freshwater fishes provide evidences on the geographic extension of a central-brazilian amazonian palaeoplateau in the area of the present day pantanal wetland. *Neotropical Ichthyology*, 11: 319-326.
- Ronquist, F. & Sanmartín, I. (2011). Phylogenetic methods in biogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 42: 441-64.

- Rosen, D. E (1978). Vicariant patterns and historical explanation in biogeography. *Systematic zoology*, 27: 159-88.
- Rosso, J.J., Mabrugaña, E., Castro, M G. & Díaz de Astarloa, M. (2012). DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. *Molecular Ecology Resources*, 12: 999–1011.
- Santos, C. M. D. & Amorim, D. S. (2007). Why biogeographical hypotheses need a well supported phylogenetic framework: a conceptual evaluation. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 47(4): 63-73.
- Schlotterer, C., Ritter, R., Harr, B. & Brem, G. (1998). High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. *Molecular Biology Evolution*, 15(10): 1269–1274.
- Selkoe, K. A. & Toonen R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9: 615-629.
- Sérsic, A. N., Cosacov, A., Cocucci, A. A., Johnson, L. A., Pozner, R., Avila L. J., Sites Jr., J. W. & Morando, M. (2011). Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103: 475-494.
- Shibatta, O. A. (2003). Family Pseudopimelodidae (Bumblebee catfishes, dwarf marbled catfishes). pp. 401-405. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr. (Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Edipucrs.
- Shibatta, O. A. (2007). Família Pseudopimelodidae. pp. 103-104. In: Buckup, P. A., N. A. Menezes & M. S. Ghazzi (Eds.). *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Rio de Janeiro, Museu Nacional, 195p.
- Shibatta, O. A. (2014). A new species of *Microglanis* (Siluriformes: Pseudopimelodidae) from the upper rio Tocantins basin, Goiás State, Central Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 12(1): 81-87.
- Sivasundar, A., Bermingham, E. & Ortí, G. (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10: 407–417.
- Suguio, K. (2010). *Geologia do Quaternário e Mudanças Ambientais*. São Paulo: Oficina de Textos. 408 p.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17(1): 6463-6471.
- Templeton A. R. (2001) Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology*, 10: 779- 791.
- Thoisy B., Silva, A. G., Ruiz-García, M., Tapia, A., Ramirez, O., Arana, M., Quse, V., Paz-

- y-Miño, C., Tobler, M., Pedraza, C. & Lavergne, A. (2010). Population history, phylogeography, and conservation genetics of the last Neotropical mega-herbivore, the lowland tapir (*Tapirus terrestris*). *BMC Evolutionary Biology*, 10: 278.
- Turchetto-Zolet, A. C., Pinheiro, F., Salgueiro, F. & Palma-Silva, C. (2013) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, 22:1193–1213.
- Vari, R. P. & Malabarba, L. R. (1998). Neotropical ichthyology: An overview. pp. 1-11. In: Malabarba, L. R; Reis, R. E; Vari, R. P; Lucena, Z. M. S. & Lucena, C. A. S.(Eds). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, EDIPUCRS.
- Vázquez-Domínguez, E. (2007). Filogeografía y vertebrados. In: *La Ecología molecular de plantas y animales: 441–466* (L. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre, Eds.). INE, Mexico.
- Ward, R. D., Hanner, R., & Hebert, P. D. N. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74(2): 329-56.
- Waters, J. M., Rowe, D. L., Apte, S., King, T. M, Wallis, G. P., Anderson, L., Norris, R. J., Craw, D. & BurrIDGE, C. P. (2007). Geological dates and molecular rates: rapid divergence of rivers and their biotas. *Systematic Biology*, 56: 271-282.
- Waugh, J. (2007). DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays*, 29: 188-197.
- Weber, J. L. & May, P. E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44: 388-396.
- Weitzman, S. H., Menezes, N. A., Weitzman, M. J. (1988).
- Phylogenetic biogeography of the *Glandulocaudini* (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. In: *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns* (Heyer, W.R. and Vanzolini P.E., eds.).
- Weschenfelder, J., Corrêa, I.C.S., Toldo Jr., E.E. & Baitelli, R. (2008). Paleocanais como indicativo de eventos regressivos quaternários do nível do mar no Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Geofísica*, 26 (3): 367-375.
- Wiley, E. O. (1988). Vicariance Biogeography. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 19: 513-542.
- Will, K. W. & Rubinoff, D. (2004). Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics*, 20: 47-55.
- Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16.

CAPÍTULO 1

**STATUS TAXONÔMICO DE *Microglanis cottoides* (Boulenger, 1891)
(SILURIFORMES, PSEUDOPIMELODIDAE) DO SUL DO BRASIL: CASOS DE
SINONÍMIA E ESPÉCIE CRÍPTICA**

Este manuscrito será submetido à *Journal of Fish Biology* na forma de artigo regular

**STATUS TAXONÔMICO DE *Microglanis cottoides* (Boulenger, 1891)
(SILURIFORMES, PSEUDOPIMELODIDAE) DO SUL DO BRASIL: CASOS DE
SINONÍMIA E ESPÉCIE CRÍPTICA**

Microglanis é um Pseudopimelodidae, cuja história taxonômica apresenta vários equívocos, como descrições incompletas, sinonimizacões incorretas, não designação da espécie tipo que geraram numerosos problemas taxonômicos que estão sendo solucionados à medida que se intensificam os estudos sobre a família. *Microglanis cottoides* foi originalmente descrito como *Pimelodus*, depois alocado em *Pseudopimelodus* e ainda considerado sinônimo júnior de *M. parahybae*, antes de ser reconhecida como espécie válida. Entretanto, existe a hipótese de ocorrência de espécies crípticas e sinônimos em populações de *M. cottoides*, tornando o estudo desta espécie de grande importância para a sistemática e o entendimento da evolução deste grupo de peixes. Identificação e descrição de espécies, tradicionalmente, são feitas com base em caracteres morfológicos, entretanto ferramentas moleculares na atualidade, têm sido utilizadas, em conjunto com a morfologia, para o estudo da diversidade biológica. A proposta deste trabalho foi testar as relações filogenéticas entre as diferentes populações de *M. cottoides*, ao longo de sua distribuição geográfica, com o uso da genética molecular e da morfologia. Foram realizadas análises filogenéticas (IB), delimitação de espécies (GMYC) e, em termos da morfometria, foram analisadas 20 medidas externas por meio de Variância Canônica (CV). Nossos dados sugerem que a espécie designada como *M. cottoides* para a bacia do rio Uruguai, seja uma espécie nova de *Microglanis* que se enquadra no critério de espécie críptica. Por outro lado, as populações de *M. cibela* apresentaram grande similaridade com *M. cottoides* das demais bacias costeiras, compatível para indivíduos de uma mesma espécie. Assim, podemos sugerir que *M. cottoides*, como atualmente diagnosticado, forma um grupo não monofilético, pois inclui uma espécie morfológica e geneticamente distinta, que ocorre na bacia do rio Uruguai, e exclui uma espécie morfológica e geneticamente similar, denominada *M. cibela*, que ocorre nas bacias do rio Tramandaí e Mampituba.

Palavras chave: Bagre; Evolução; Sistemática; Região Neotropical.

TAXONOMIC STATUS OF *Microglanis cottoides* (Boulenger, 1891) (SILURIFORMES, PSEUDOPIMELODIDAE) FROM SOUTHERN BRAZIL: CASE OF SYNONYM AND CRYPTIC SPECIES

Microglanis is a Pseudopimelodidae, whose taxonomic history have several misconceptions, as incomplete descriptions, incorrect synonyms, no designation of type species, among others, and such confusion generated numerous taxonomic problems being solved as studies on the family are intensified. *Microglanis cottoides* was originally described as *Pimelodus*, then allocated in *Pseudopimelodus* and still considered a junior synonym of *M. parahybae* before being recognized as a valid species. However, there is a hypothesis of occurrence of cryptic species and synonyms in populations of *M. cottoides*, making the study of this species of great importance for the systematic and understanding of evolution of this group of fish. Identification and description of species traditionally are made based on morphological characters. However, currently molecular tools have been used in conjunction with morphology for the study of biological diversity. The purpose of this study was to test the phylogenetic relationships among different populations of *M. cottoides* over their geographical distribution, through the use of molecular genetics and morphology. We performed Bayesian inference analysis (BI), species delimitation (GMYC) and about the morphometric data, were analyzed 20 external measures, which been analyzed by Canonical Variance (CV). Our data suggested that the species identified as *M. cottoides* from the Uruguay River basin, is a new species of *Microglanis* that fits in the criterion of cryptic species. On the other hand, populations of *M. cibelae* showed very similarity between *M. cottoides* from remaining coastal basins, which is compatible for individuals of the same species. Thus, our results suggest that *M. cottoides*, as currently diagnosed, form a non-monophyletic group because it includes a morphologically and genetically distinct species, which occurs in the Uruguay River basin, and excludes a morphological species and genetically similar, called *M. cibelae*, occurring in Tramandaí and Mampituba Rivers basins.

Key words: Catfish; Evolution; Systematic; Neotropical region.

INTRODUÇÃO

Microglanis Eigenmann, 1912 pertence à família Pseudopimelodidae, cujo histórico apresenta vários equívocos como a definição do gênero, descrições incompletas, sinonimizadas incorretas, não designação da espécie tipo, entre outros, e tais confusões geraram numerosos problemas taxonômicos que estão sendo solucionados à medida que se intensificam os estudos sobre a família (Gomes, 1946; Malabarba & Mahler, 1998; Shibatta, 2007).

Schultz (1944) questionava a validade do gênero *Microglanis* devido às variações que encontrou no seu principal caráter, a forma da placa dentígera do pré-maxilar, e Myers, em correspondência à Gomes (1946), sugeriu a possibilidade dos espécimes referidos como *Microglanis* serem apenas indivíduos jovens de *Pseudopimelodus*. Entretanto, a descoberta de ovos desenvolvidos em ovários de um espécime de *Microglanis iheringi* Gomes, 1946, com apenas 52 mm de comprimento padrão, confirmou a validade do gênero (Gomes, 1946).

Devido ao fato das primeiras espécies do gênero *Microglanis* não terem sido bem diagnosticadas, ocorreram confusões que persistiram durante um longo período. Por exemplo, Steindachner descreveu duas espécies de bagres da bacia do rio Paraíba do Sul, às quais atribuiu o epíteto específico *parahybae*. Em 1876, descreveu *Pimelodus (Rhamdia) parahybae* e quatro anos mais tarde, em 1880, descreveu *Pseudopimelodus parahybae*. Destas espécies, a segunda era a que apresentava as características do gênero *Microglanis*, sendo posteriormente alocada neste gênero.

Em 1891, Boulenger descreveu *Pimelodus (Pseudopimelodus) cottoides* do rio Camaquã, drenagem da Lagoa dos Patos, estado do Rio Grande do Sul (RS), considerando-a semelhante a *Pseudopimelodus parahybae* Steindachner, 1880. Entretanto, como considerou que esta espécie pertencia ao gênero *Pimelodus*, e para evitar a sinonimização com *Pimelodus parahybae*, fez um novo arranjo designando a nova espécie como *Pimelodus*

(*Pseudopimelodus*) *cottoides*. Posteriormente, Gosline (1941) determinou que *P. (P.) cottoides* pertencia ao gênero *Microglanis* e Gomes (1946) concluiu que *Pseudopimelodus parahybae* era sinônimo júnior de *Microglanis cottoides*. Mais tarde, Mess (1974) também deliberou *P. parahybae* para *Microglanis* e, levando em consideração a regra de prioridade, qualificou esta última espécie como sinônimo sênior de *M. cottoides*. Em função dessa sinonimização, as populações de *Microglanis* que se distribuía pela região costeira do sudeste ao sul do Brasil eram identificadas como *M. parahybae* (Steindachner 1880). Essa situação perdurou por muitos anos até que Malabarba e Mahler-Jr. (1998), ao revisarem as espécies do litoral Sul e do rio Uruguai, redescreveram e revalidaram *M. cottoides*. Na ocasião, estes mesmos autores descreveram *M. cibela* para as bacias dos rios Tramandaí e Mampituba e *M. eurystoma* Malabarba & Mahler 1998, para a bacia do alto rio Uruguai. Liotta (2006) também confirmou *M. cottoides* para a bacia do rio Uruguai e, mais recentemente, Oyakawa & Menezes (2011) citam esta espécie para a bacia do Ribeira de Iguape.

Cabe ressaltar que as bacias supracitadas, tanto as costeiras quanto a do rio Uruguai, conforme Ribeiro (2006), não possuem comunicação entre si, devido suas características geográficas e geológicas atuais. E grande parte da ictiofauna, tanto das drenagens da costa oriental brasileira (Bizerril, 1994), quanto da bacia do rio Uruguai, principalmente nas porções média e alta do seu curso, é considerada endêmica (Lucena & Kullander, 1992; Malabarba & Mahler, 1998; Miquelarena & López, 2004; Quevedo & Reis, 2002).

Aliado a isto, existe a hipótese de ocorrência de espécies crípticas em populações de *Microglanis cottoides*, por apresentarem diferenças sutis na morfologia externa, tais como proporções corporais e padrão de colorido, mas que não foram suficientes para confirmar novas espécies, sendo denominadas como “grupo *cottoides*” (Mori & Shibatta, 2006). Além disso, a ocorrência de *M. cottoides* em simpatria com seus congêneres, aparentemente endêmicos, como *M. cibela* Malabarba & Mahler, 1998, das bacias do Tramandaí e Mampituba, *M. malabarbai*

Bertaco & Cardoso, 2005, da bacia do médio rio Uruguai e *M. eurystoma* Malabarba & Mahler, 1998, da bacia do Alto rio Uruguai, torna o seu estudo ainda mais instigante.

Identificação e descrição de espécies, tradicionalmente, são feitas com base em caracteres morfológicos (Hebert *et al.*, 2003). No entanto, a utilização de fontes únicas de dados não-independentes para delimitar espécies pode produzir resultados tendenciosos (Knowles & Cartens, 2007), como por exemplo os dados morfológicos, que podem ser fortemente influenciados pelo ambiente e são frequentemente homoplásicos e os dados moleculares, que podem representar a história de um gene e não necessariamente a história das espécies (Schlick-Stener *et al.*, 2010; Fujita *et al.*, 2012). Por este motivo, nos últimos tempos, para aumentar a acurácia e a confiabilidade na delimitação de espécies, tem-se utilizado a taxonomia integrativa que utiliza fontes independentes de dados, como marcadores moleculares, ecológicos, dentre outros, juntamente com caracteres morfológicos (Dayrat, 2005; Padial *et al.*, 2010).

O DNA *barcoding*, tem se mostrado bastante efetivo na identificação e delimitação de uma grande variedade de taxa, como anfíbios (Crawford *et al.*, 2012); aves (Johnsen *et al.*, 2010), morcegos (Clare *et al.*, 2011), répteis (Nguyen *et al.*, 2014; Ayala-Varela *et al.*, 2014), peixes (Ward *et al.*, 2005; Ardura *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2013; Paz *et al.*, 2012) e outros. Entretanto, delimitação de espécies/linhagens baseado apenas em distâncias genéticas entre grupos definidos a priori, não levando em consideração as diferenças do tempo de divergência entre elas, geraram questionamentos quanto a utilidade do DNA *barcoding* na delimitação e identificação das espécies (Vogler *et al.*, 2006).

Com isso, vários métodos para delimitar as espécies, com dados de DNA *barcoding*, foram propostos, como o General Mixed Yulecoalescent Method (GYMC) (Pons *et al.*, 2006; Monaghan *et al.*, 2009) que é baseado em um modelo evolutivo a partir da topologia de uma árvore, o que permite diferenciar entre os processos interespecífico ("diversificação") e intraespecífico ("coalescentes") dos processos de ramificação das linhagens (Pons *et al.*, 2006;.

Monaghan et al., 2009; Zhang et al. 2013). Este método requer, previamente, uma árvore ultramétrica para a demilitação objetiva das linhagens (Zhang et al. 2013). Posteriormente, tendo como base os resultados de delimitação de espécies primários, é possível incorporar dados adicionais como: morfologia e distribuição geográfica das espécies/linhagens para descrever possíveis espécies novas (Puillandre et al., 2012).

Neste contexto, tendo em vista a ampla distribuição de *M. cottoides* em bacias geograficamente isoladas, inclusive em áreas consideradas endêmicas, e também pelas espécies e populações semelhantes a *Microglanis cottoides* não estarem bem definidas, o objetivo deste trabalho foi testar e definir limites de espécies/linhagens.

MATERIAL E MÉTODOS

Conceito de espécie adotado

No presente trabalho foi utilizado o Conceito Geral de Linhagens proposto por De Queiroz (2007), que permite detectar a diversidade da linhagem de uma maneira mais clara, especialmente quando linhagens altamente divergentes são agrupadas dentro de complexos pouco divergentes (De Queiroz & Gauthier, 1990; Kizirian & Donnelly, 2004). Pois, quando interpreta-se que os eventos evolutivos não ocorrem simultaneamente e nem possuem uma ordem distinta para acontecer, a utilização de conceitos de espécie como o biológico e o filogenético torna-se tendencioso, limitando algumas situações (Hudson & Coyne, 2002; Knowles & Cartens, 2007).

Amostras

Microglanis cottoides (Fig. 1) foram coletados a partir de relatos de ocorrência baseados em Malabarba & Mahler (1998); Shibatta (2003, 2007) e Oyakawa & Menezes (2011).



Figura 1: Exemplar de *Microglanis cottoides* MZUEL 07946 (42,4 mm CP, coletado no rio Sambaqui, Morretes, PR - 25° 31' 38"S 48° 44' 56,8"W) Foto Birindelli, JLO

Um total de 542 indivíduos foram coletados e 89 obtidos através de empréstimos e doações, totalizando 631 indivíduos, em 49 pontos ao longo de 10 bacias hidrográficas (Ribeira de Iguape, Paranaguá, Guaratuba, Itapocu, Madre, Araranguá, Mampituba, Tramandaí, Lagoa dos Patos e Uruguai) de São Paulo ao Rio Grande do Sul (Fig. 2). Para as análises moleculares, adicionamos sequências de quatro espécies de *Microglanis* (*M. parahybae*, *M. cibela*, *M. garavello* e *M. leptostriatus*) e cinco da família Pseudopimelodidae (*Batrochoglanis raninus*, *B. villosus*, *Pseudopimelodus* aff. *pulcher*, *Lophiosilurus alexandri* e *Cephalosilurus apurensis*) como material comparativo, totalizando 194 indivíduos analisados. Nas análises morfológicas foram adicionadas quatro espécies de *Microglanis* (*M. malabarbai*, *M. eurystoma*, *M. cibela*, e *M. garavello*). Todas as espécies utilizadas, bem como as informações relativas a elas estão sumarizadas na Tabela 1.

Os peixes para o presente estudo foram coletados de acordo com as leis brasileiras sob a licença científica ICMBio número 12120. Após a coleta, os animais foram anestesiados por imersão em eugenol 1%, preservados em álcool 95%, para estudos moleculares, e fixados em formaldeído 10%, para estudos morfológicos. Todos os indivíduos coletados foram depositados na coleção do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), do Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Londrina, Paraná / Brasil. Outras amostras foram

provenientes das seguintes coleções: Laboratório de Biologia de Peixes, UNESP, Botucatu (LBP), Museu de Ciências Naturais, Fundação Zoobotânica, Porto Alegre (MCN), Museu de Ciências da Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre (MCP), Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba (MHNCI), e Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (UFGRS).

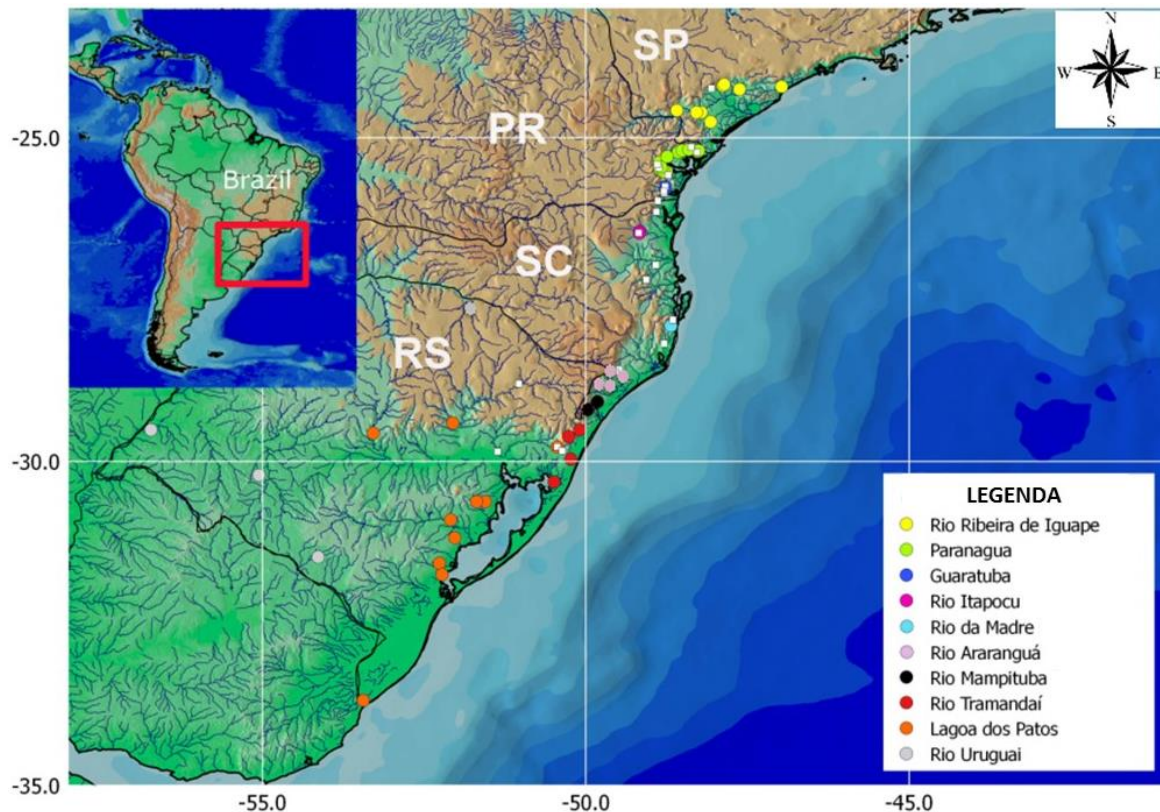


Figura 2. Mapa com os pontos de coleta nos estados do sudeste e sul do Brasil. Pontos brancos representam as 28 localidades onde não foi encontrado nenhum *Microglanis*. As siglas SP, PR, SC e RS, referem-se aos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, respectivamente.

Molecular

Extração de DNA

O DNA genômico foi isolado a partir do tecido muscular de cinco a oito indivíduos de cada localidade, quando possível, usando o protocolo de Sambrook & Russel (2001), que utiliza lavagens com fenol/clorofórmio.

Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Um segmento de aproximadamente 624 pb da extremidade 5' do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase subunidade I (COI) foi amplificado, por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os *primers* FishF1-5'TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC-3' e FishR1-5'AGA CTT CTG GGT GGC CAA AGA ATC A-3' (Ward *et al.* 2005). A PCR foi realizada em volumes de 15 µl, com 7,5µl GoTaq Green Master Mix (Promega), 0,15 µl de cada iniciador (20 mM), 2,0 µl de molde de DNA (5 ng) e 5,2 µl de água ultrapura. A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de 95 °C durante 2', seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30" e 54 °C durante 30" e 72 °C durante 1', e uma extensão final a 72 °C durante 10'.

Purificação e reação de sequenciamento

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados com ExoSAP IT® (Prodinol Biotecnologia SA) e sequenciados. As reações de sequenciamento foram feitas independentemente para ambas as fitas utilizando o kit Big Dye Terminator v 3.1 (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante, com a leitura subsequente em um sequenciador automático ABI Prism 3500 XL (Applied Biosystems).

Análises filogenéticas

As sequências obtidas de ambas as fitas, *forward* e *reverse*, com tamanho superior a 600pb foram combinadas para formação de um consenso pelo aplicativo online Electropherogram Quality Analysis (Togawa & Brigido, 2003). Estas foram editadas através do programa Bioedit (Hall, 1999), alinhadas, utilizando o aplicativo ClustalW (Thompson, 1994) e analisadas no programa MEGA v6.06 (Tamura *et al.*, 2013).

As análises de inferência Bayesiana (IB) foram realizadas com o auxílio do programa BEAST v.2.1.3 (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees) (Drummond & Rambaut, 2015),

empregando o método de coalescência (Heled & Drummond 2010), utilizando como calibrante do relógio molecular a datação de um fóssil da família Pseudopimelodidae (*Cephalosilurus* Haseman 1911), que é estimada entre 15,9 a 11,5 milhões de anos (Ma) (Lundberg et al. 2010). Nesta análise utilizou-se o relógio relaxado Lognormal não correlacionado, opção que acomoda a possibilidade de taxas independentes de evolução molecular em diferentes ramos (Drummond et al. 2007); e o prior Birth Death Model, uma extensão do modelo Yule, que assume que em qualquer ponto no tempo cada linhagem pode sofrer especiação ou extinção. Os dados foram analisados como uma única partição e o modelo evolutivo utilizado foi GTR + I + G, especificado previamente pelo programa Mrmodeltest 2.3 (Nylander 2004). As análises foram executadas por 100 milhões de gerações amostrando-se uma árvore a cada 10000 gerações. O pacote BEAST inclui um conjunto de programas que permitem especificar o projeto de análise, processar arquivos de saída e sumarizar e visualizar os resultados. O programa TRACER v. 1.5 foi usado para assegurar que a amostragem da distribuição posterior tenha alcançado o tamanho efetivo mínimo suficiente ($ESS > 200$) e para garantir a estimativa significativa dos parâmetros e as médias de idades dos nós foram calculadas através de um *burn-in* de 25 milhões de gerações. As árvores foram sumarizadas, com 25% das árvores iniciais descartadas, e visualizadas usando os programas TREEANNOTATOR 1.5.3 e FIGTREE 1.3.1, respectivamente (Drummond & Rambaut 2007).

Distância genética

Para inferir sobre a taxa de divergência entre os grupos resgatados nas análises filogenéticas, o programa MEGA 6.0 (Tamura et al., 2011) foi utilizado para calcular a estimativa da divergência evolucionária sobre pares de sequências entre grupos, conduzido pelo método p-distance. As distâncias genéticas intraespecífica e interespecífica foram determinadas pelo modelo Kimura-2-Parâmetros (K2P) (Kimura, 1980). A definição de espécie foi inicialmente

realizada utilizando 2% de divergência como um valor de corte, como empregado em trabalhos utilizando a ferramenta de *barcoding* (Ward *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2011b; Mabragaña *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2011; Pereira, *et al.*, 2013). As sequências do gene COI de *Microglanis cottoides* (dois a cinco indivíduos de cada população) e de *M. pararahybae* (cinco indivíduos) foram submetidas ao banco de dados GenBank, com um total de 52 sequencias, com os seguintes números de acesso KP063059 a KP063110 e KP063106 a KP063110, respectivamente. As sequências de *M. garavelloii* (GU701443, GU701626, GU701627, GU701629, JN989032) e *M. leptostriatus* (HM405152, HM405154-HM405157), disponíveis no GenBank, foram usadas para comparação.

Delimitação de espécie

A partir dos resultados da análise filogenética, foi realizado o teste de delimitação de espécies utilizando o modelo Generalized Mixed Yule- coalescent (GMYC) (Pons *et al.*, 2006), mais adequado para dados com um gene. Utilizou-se o pacote “Species Limits by Threshold Statistics” (Splits) (Fujisawa & Barraclough, 2013; Pons *et al.*, 2006), implementado no programa R v3.0.1 (R Core Team 2013) a partir da árvore ultramétrica previamente gerada no BEAST. Por meio desse pacote é possível calcular o número de clusters, classificando as taxas de bifurcação de um filograma como resultantes de processos de ramificações interespecíficas ou intra-específicas das linhagens (Pons *et al.*, 2006).

Rede de haplótipos

Para analisar graficamente a distribuição dos haplótipos foi utilizado o algoritmo median-joining (MJ) conforme implementado no programa Network v. 4.5.1.6 (Fluxus Technology Ltda, 2009).

Morfologia

Análises Morfométricas

Um total de 621 indivíduos de *Microglanis* foram utilizados nas análises morfométricas, sendo que destes, 510 eram *M. cottoides* (496 das drenagens costeiras e 14 do rio Uruguai), 55 *M. cibela* (sete da bacia Mampituba e 48 da Tramandaí), 35 *M. garavello*, 17 *M. eurystoma* e dois *M. malabarbai* (Tabela 1). As medidas foram feitas seguindo o protocolo de Shibatta (2003), com paquímetro digital com precisão de 0,01mm, com o auxílio de um microscópio estereoscópico e tomadas ponto a ponto, do lado esquerdo do peixe. As 20 medidas tomadas foram as seguintes: Comprimento Padrão (CP): distância da extremidade do focinho, na região da sínfise pré-maxilar, ao final da placa hipural; Comprimento da Cabeça (CC): da extremidade do focinho até a margem superior do osso opercular; Distância Interorbital (DIO): distância entre as margens superiores dos olhos; Diâmetro do Olho (DO): distância horizontal entre a margem orbital anterior e a posterior; comprimento do focinho (CF): da extremidade do focinho até a margem orbital anterior; Largura da Boca (LB): distância entre os ângulos esquerdo e direito da boca; Comprimento do Barbilhão Maxilar (CBM): da base até a extremidade do barbilhão maxilar retesado; Comprimento da Nadadeira Ventral (CNV): da base até a extremidade máxima da nadadeira ventral; Comprimento do Espinho Dorsal (CED): da base até a extremidade óssea do acúleo da nadadeira dorsal; Comprimento do Espinho Peitoral (CEP): da base, na articulação, à extremidade do espinho pungente da nadadeira peitoral; Comprimento do Processo Umeral (CPU): da base da nadadeira peitoral até a extremidade posterior do processo umeral; Distância Pré-Dorsal (DPD): da extremidade do focinho até a base anterior do espinho da nadadeira dorsal; Distância Pré-Ventral (DPV): da extremidade do focinho até a base da nadadeira ventral; Distância Pré-Anal (DPA): da extremidade do focinho até a base da nadadeira anal; altura do pedúnculo caudal (APC): menor altura do pedúnculo caudal; Distância do Pedúnculo Caudal (DPC): da base posterior da nadadeira anal até o final

da placa hipural; Largura do Corpo (LCo): distância entre as bases das nadadeiras peitorais; Comprimento a Base da Dorsal (CBD): distância entre a base anterior do espinho da nadadeira dorsal até a base do último raio da mesma nadadeira; Comprimento da Base da Adiposa (CBAd): do vértice anterior da nadadeira adiposa até o ângulo posterior formado com o pedúnculo caudal; e Comprimento da Base da Anal (CBAn): distância entre a base do primeiro e do último raio da nadadeira anal. Para as análises morfométricas foram utilizadas as análises das variáveis canônicas (MANOVA/CVA), com o emprego do programa PAST (Hammer *et al.*, 2001). As análises dos cluster, gerados pelo método de UPGMA, foi realizado a partir das distâncias euclidianas dos centroides sobre os eixos CV1 e CV2. Todas as análises foram feitas usando o pacote estatístico PAST (Hammer *et al.*, 2001).

Tabela 1. Amostras das populações de *Microglanis cottoides*, utilizadas nas análises moleculares e morfométricas, conforme suas bacias hidrográficas de origem e outras espécies de *Microglanis* e de Pseudopimelodidae utilizadas como material comparativo.

ESPÉCIES	BACIAS	DRENAGENS	NÚMERO DE TOMBO	REGISTRO NO GENBANK	AMOSTRAS	
					COI	morfometria
<i>Microglanis cottoides</i>	Ribeira de Iguape - RIB	Rio Juquiá Rio Ipiranga Rio Fau Rio Preto I Rio Preto II Afluente Rio Jaguarí I Afluente Rio Jaguarí II Rio Iporanga Rio Pindaúba	MZUEL 8014 MZUEL 8015 MZUEL 8016 MZUEL 8017 MZUEL 8018 MZUEL 8019 MZUEL 8020 MZUEL 8021 LBP 7426	KP 063067 a 063071	39	210
	Paranaguá - PAR	Rio Tagaçaba Rio Utinga Rio Passa Sete Rio Mergulhão Rio Sambaqui Rio Bananal Rio Ipiranga Rio São João/Capivari Rio das Antas Rio Nhundiaquara Rio Iporanga	MZUEL 7941 MZUEL 7942 MZUEL 7943; LBP 762 MZUEL 7945 MZUEL 7946 MZUEL 7947 MZUEL 7949 MZUEL 7950 MZUEL 7953 LBP 2081 LBP 3616	PK 063072 a 063075	27	93
	Guaratuba - GUA	Rio Rasgado Rio Canaveira	MZUEL 7944, 7952 MZUEL 7951	KP063073-063079	12	22
	Itapocu - ITA	Rio Itapocu Ribeirão do Cavalo	MZUEL 7441 MZUEL 7452 e 7944	KP 063080 a 063083)	08	49
	Madre – MAD	Rio da Madre	MZUEL 10184	KP 063084 a 063088	05	10
	Araranguá - ARA	Rio Manin Rio Serrinha Rio Amola Faca Rio Serra Velha	MZUEL 7442 MZUEL 7444 MZUEL 7446 MZUEL 7447	KP063089-063093	11	26
			Rio Forquetinha Arroio Contagem Arroio Teixeira	MZUEL 6033 MZUEL 7448 MZUEL 7450		

	Lagoa dos Patos - PAT	Rio Camaquã Chuí – Riacho sem nome Arroio Velhaco Arroio Santa Isabel Arroio Carmelita Agudo – Riacho sem nome Caraá – Riacho sem nome	MZUEL 7453 LBP 14517 UFRGS 13819 UFRGS 12499 UFRGS 13605 LBP 14547 LBP 14459	KP063101 a 063105	35	86
	Uruguai - URU	Rio Negro Margem BR 290, Km 10 Arroio Putiá Rio Inhandava	UFRGS 14654 UFRGS 11931 LBP 13151 LBP 13088	KP 063066 KP 063063 a 063065 KP 063059 a 063062	09	14
<i>Microglanis cibela</i>	Mampituba – MAM	Rio Sanga da Paca Praia Grande	MZUEL 7443 UFRGS 12720	KP 063094 e 063095	02	07
	Tramandaí – TRA	Rio Quebrada dos Sinos Riacho Três Forquilhas Rio Maquiné Conexão entre duas lagoas	MZUEL 7445 MZUEL 7449 MZUEL 7452 MZUEL 8964)	KP063096 a 063100	21	48
<i>Microglanis. parahybae</i>	Paraíba do Sul	Rio Macabu	LBP 10741	KP 0603106 a 063110	05	-
<i>Microglanis garavello</i>	Alto Rio Paraná	Alto Rio Paraná	LBP 10562, 10561, 1193, 22539 e 22540	JN 989032 e GU 701443, 701629, 701627 e 701626	05	35
<i>Microglanis eurystoma</i>	Uruguai	Rio Uruguai Rio Ubirapuitá Arroio Passo do Alto	<u>MCP 13405</u> <u>MCP 11353</u> <u>MCP 12698</u>		-	17
<i>Microglanis malabarbai</i>	Uruguai	Arroio Alexandrina Arroio Pedras	<u>MCP 37252</u> <u>MCP 37187</u>		-	02
<i>Microglanis leptostriatus</i>	São Francisco	Rio São Francisco	DCC 00611 a 00615	HM 405152, 405154 a 405157	05	-
<i>Microglanis poecilus</i>	Rio Tapajós	Igarapé montanha Igarapé Urubutu	LBP 14085 LBP14226	-	02	-
<i>Pseudopimelodus aff. pulcher</i>	Alto Rio Paraná	-	LBP 37226	GU 701444	01	-
<i>Pseudopimelodus aff. pulcher</i>	Rio Araguaia	-	LBP 1567	EU 179812	01	-
<i>Pseudopimelodus charus</i>	-	-	DCC 13715	HM 405014	01	-
<i>Batrochoglanis villosus</i>	-	-	UFAM_CTGA 14497	KP 772594	01	-
<i>Batrochoglanis raninus</i>	-	-	LBP 1777	EU 179809	01	-
<i>Cephalosilurus apurensis</i>	-	-	LBP 3034	EU 179818	01	-
<i>Lophiosilurus alexandri</i>	-	-	DCC 00373	HM 405152	01	-
TOTAL					193	621

RESULTADOS

Molecular

Análises filogenéticas

Um total de 193 sequências com 624 pares de bases (pb) do gene COI foram obtidas. Nestas sequências não foram encontradas inserções, deleções ou stop-codons, suportando que todas as regiões amplificadas correspondem a sequências funcionais do gene COI.

A topologia da árvore gerada para o COI, por meio das análises de Inferência Bayesiana (IB), demonstrou que o principal clado que agrupa a maioria dos espécimes de *Microglanis cottoides*, com suporte de probabilidade posterior (pp) de 1, contém dois grandes subclados (Fig. 3), indicando a presença de dois filogrupos e possíveis estruturas geográficas. Entretanto, observa-se associação de *M. cibela* ao subclado 1, diferentemente de *M. cottoides* da bacia do rio Uruguai, que demonstrou uma clara divergência entre os *M. cottoides* das demais bacias costeiras, ficando mais próximos de *M. garavello*, uma espécie que também não pertence às drenagens costeiras. Nesta análise, observa-se que *M. parahybae* é grupo-irmão de *M. cottoides*.

Matriz de distância

As análises de distância genética, considerando apenas as espécies de *Microglanis*, revelou que dentro dos indivíduos considerados *M. cottoides*, a distância K2P, variou de 0% a 0,4% e entre as bacias a variação foi de 0% a 7% (Tab. 2). A população da bacia do rio Uruguai foi que apresentou a maior distância genética, quando comparada com as bacias costeiras, variando de 5,7% a 7%. Inclusive, estas distâncias são maiores do que as encontradas entre *M. parahybae*, espécie de ocorrência na bacia do rio Paraíba do Sul, e os indivíduos das demais bacias costeiras. Por outro lado, as distâncias genéticas entre as populações de *M. cibela*, das bacias dos rios Mampituba e Tramandaí, e *M. cottoides* variaram de 0,5% a 1,8% (Tab. 2).

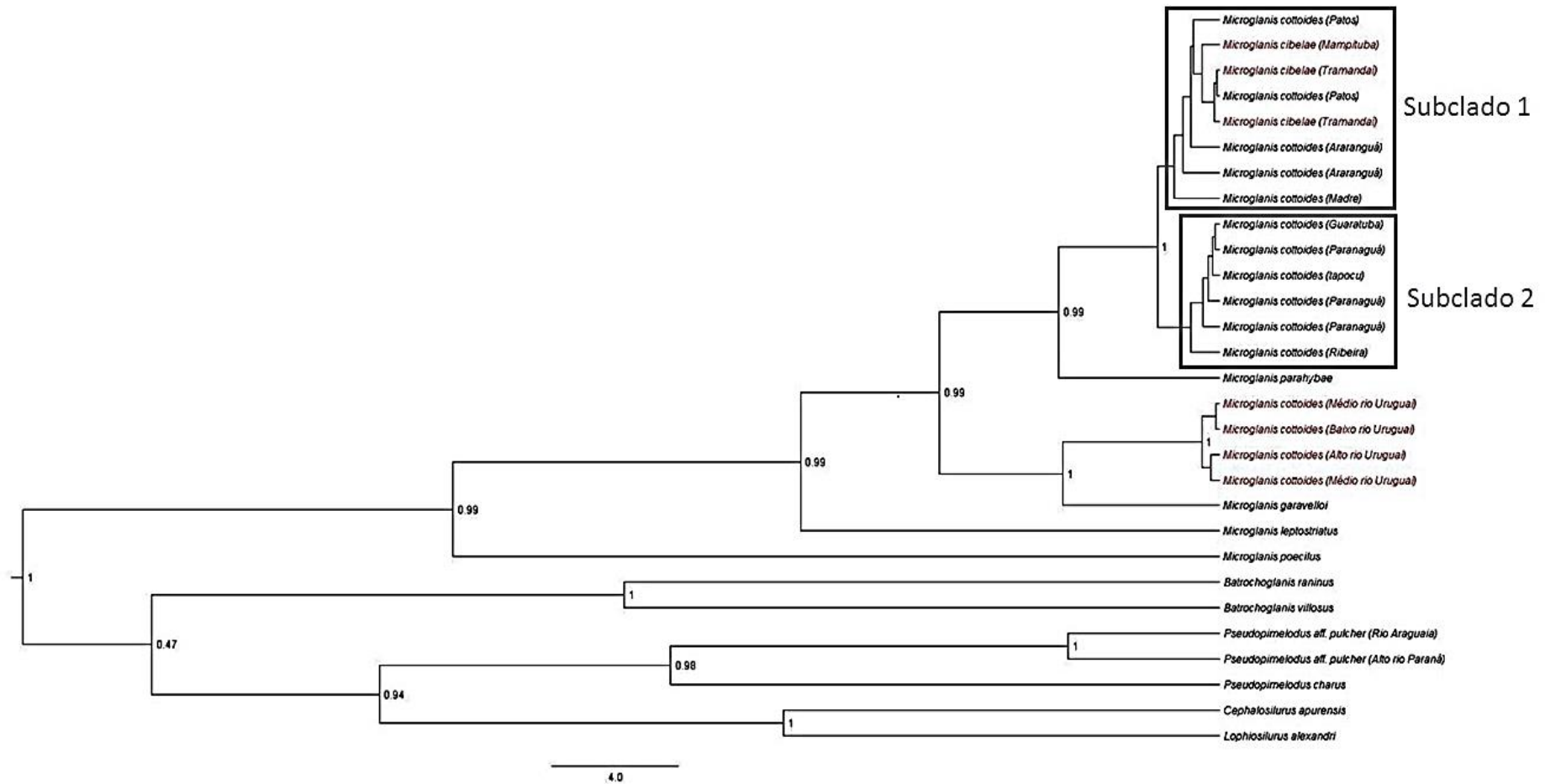


Figura 3. Árvore Bayesiana obtida por meio das análises do gene COI. Em destaque (em vermelho), os clados que apresentaram resultados não esperados. Os valores acima dos ramos são referentes à probabilidade posterior (pp).

Tabela 2. Divergência genética dentro e entre *Microglanis*. Valores abaixo da diagonal representam a distância média entre espécimes de *M. cottoides* e entre *Microglanis*. Acima da diagonal estimativa do erro padrão, obtidos por um procedimento de bootstrap com 1000 repetições. Na diagonal, em negrito e sublinhado, representa a média das distâncias dentro de cada bacia. As análises foram realizadas utilizando o modelo K2P (Kimura-2-parâmetros) e envolveram 184 amostras.

Espécies / Bacias	<i>M. cottoides</i>	<i>M. cottoides</i>	<i>M. cottoides</i>	<i>M. cottoides</i>	<i>M. cottoides</i>	<i>M. cottoides</i>	<i>M. cibellae</i>	<i>M. cibellae</i>	<i>M. cottoides</i>	<i>M. cottoides</i>	<i>M. garavelloii</i>	<i>M. leptostriatus</i>	<i>M. paraybae</i>	<i>M. poecilus</i>
	<u>RIB</u>	<u>PAR</u>	<u>GUA</u>	<u>ITA</u>	<u>MAD</u>	<u>ARA</u>	<u>MAM</u>	<u>TRAM</u>	<u>PAT</u>	<u>URU</u>	<u>Alto Paraná</u>	<u>São Francisco</u>	<u>Paraíba do Sul</u>	<u>Rio Tapajós</u>
<i>M. cottoides</i> RIB	<u>0.000</u>	0.003	0.003	0.003	0.004	0.005	0.005	0.005	0.005	0.011	0.012	0.012	0.008	0.015
<i>M. cottoides</i> PAR	0.008	<u>0.001</u>	0.001	0.000	0.003	0.004	0.005	0.005	0.004	0.010	0.011	0.012	0.008	0.015
<i>M. cottoides</i> GUA	0.006	0.001	<u>0.000</u>	0.001	0.003	0.004	0.005	0.005	0.004	0.010	0.011	0.012	0.008	0.015
<i>M. cottoides</i> ITA	0.006	0.001	0.000	<u>0.000</u>	0.003	0.004	0.005	0.005	0.004	0.010	0.011	0.012	0.008	0.015
<i>M. cottoides</i> MAD	0.010	0.007	0.006	0.007	<u>0.000</u>	0.003	0.003	0.003	0.003	0.010	0.011	0.013	0.008	0.016
<i>M. cottoides</i> ARA	0.016	0.014	0.013	0.013	0.008	<u>0.004</u>	0.003	0.004	0.003	0.010	0.010	0.013	0.008	0.016
<i>M. cibellae</i> MAM	0.016	0.014	0.013	0.013	0.006	0.007	<u>0.000</u>	0.003	0.002	0.010	0.011	0.013	0.008	0.016
<i>M. cibellae</i> TRA	0.018	0.015	0.015	0.015	0.008	0.012	0.005	<u>0.000</u>	0.002	0.010	0.011	0.012	0.008	0.016
<i>M. cottoides</i> PAT	0.016	0.012	0.012	0.012	0.005	0.009	0.005	0.005	<u>0.002</u>	0.010	0.011	0.012	0.008	0.016
<i>M. cottoides</i> URU	0.067	0.060	0.060	0.070	0.060	0.057	0.058	0.056	0.061	<u>0.001</u>	0.009	0.012	0.010	0.018
<i>M. garavelloii</i> Alto Paraná	0.074	0.071	0.070	0.060	0.066	0.063	0.064	0.066	0.065	0.042	<u>0.000</u>	0.013	0.011	0.019
<i>M. leptostriatus</i> São Francisco	0.078	0.076	0.076	0.076	0.084	0.086	0.087	0.085	0.082	0.083	0.091	<u>0.001</u>	0.013	0.017
<i>M. paraybae</i> Paraíba do Sul	0.040	0.040	0.040	0.040	0.036	0.038	0.040	0.040	0.036	0.064	0.066	0.093	<u>0.000</u>	0.017
<i>M. poecilus</i> Rio Tapajós	0.130	0.128	0.128	0.128	0.132	0.134	0.132	0.132	0.132	0.145	0.159	0.136	0.144	<u>0.000</u>

A partir das análises de GMYC foram resgatados seis clusters, sendo quatro formados pelos grupos externos. Os dois clusters referentes às amostras de *Microglanis cottoides* foram separados em: cluster A (amostras da bacia do rio Uruguai), cluster B (amostras das bacias costeiras + clado *Microglanis cibela*). Observa-se dois grandes subclados no cluster B (Fig. 4), também demonstrado nas análises filogenéticas (Fig. 3).

A rede de haplótipos construída com auxílio do programa Network, só para as populações consideradas de *M. cottoides*, formaram duas redes conectadas com 12 haplótipos (Fig. 5a), coincidindo com os clados das análises filogenéticas (*M. cottoides* da bacia do rio Uruguai e *M. cottoides* das drenagens costeiras + *M. cibela*), confirmando a presença de dois grupos (Bacia do rio Uruguai X Bacias costeiras), que estão separados por 31 passos mutacionais. A maioria dos haplótipos foram únicos para cada bacia, com exceção do haplótipo H2, presente nas bacias de Paranaguá, Guaratuba e Itapocu, e o haplótipo 9, presente na bacia do Tramandaí (mais comum) e Lagoa dos Patos. A bacia de Paranaguá apresentou o maior número de haplótipos diferentes (H2, H3 e H4), sendo dois exclusivos para esta bacia. Nas bacias do Araranguá e do Uruguai dois únicos haplótipos foram encontrados, para cada bacia (H6 e H7, H11 e H12, respectivamente). A quantidade de passos mutacionais que separam os indivíduos da bacia do rio Uruguai dos indivíduos das bacias costeiras é maior do que o encontrado em *M. parahybae* (21 passos mutacionais), da bacia do Paraíba do Sul e um pouco abaixo do encontrado em *M. leptostriatus* (37 passos mutacionais), da bacia do São Francisco (Fig. 5b).

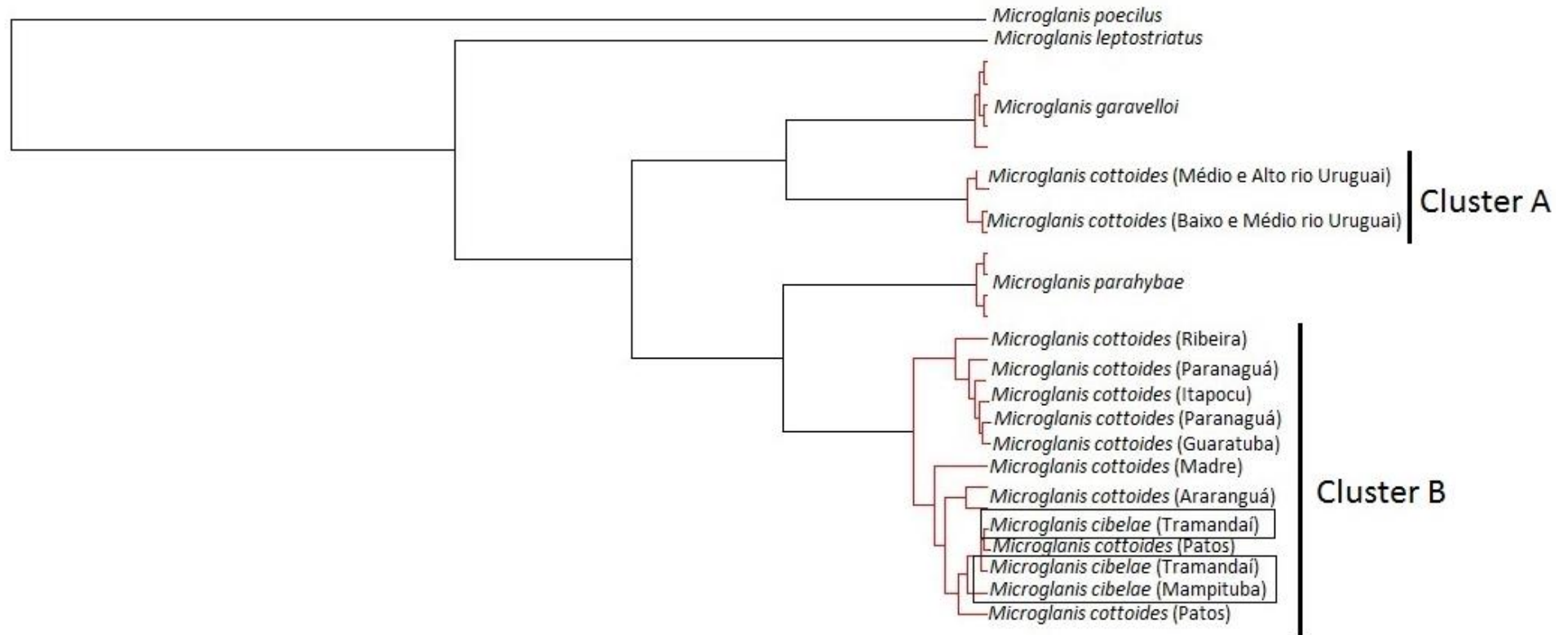


Figura 4. Filograma resultante de processos de ramificações interespecíficas e intra-específicas das linhagens de *Microglanis*, a partir dos resultados das análises filogenéticas, utilizando o modelo GMYC. Em destaque, *M. cibelaе* associado a *M. cottoides* das drenagens costeiras (cluster B).

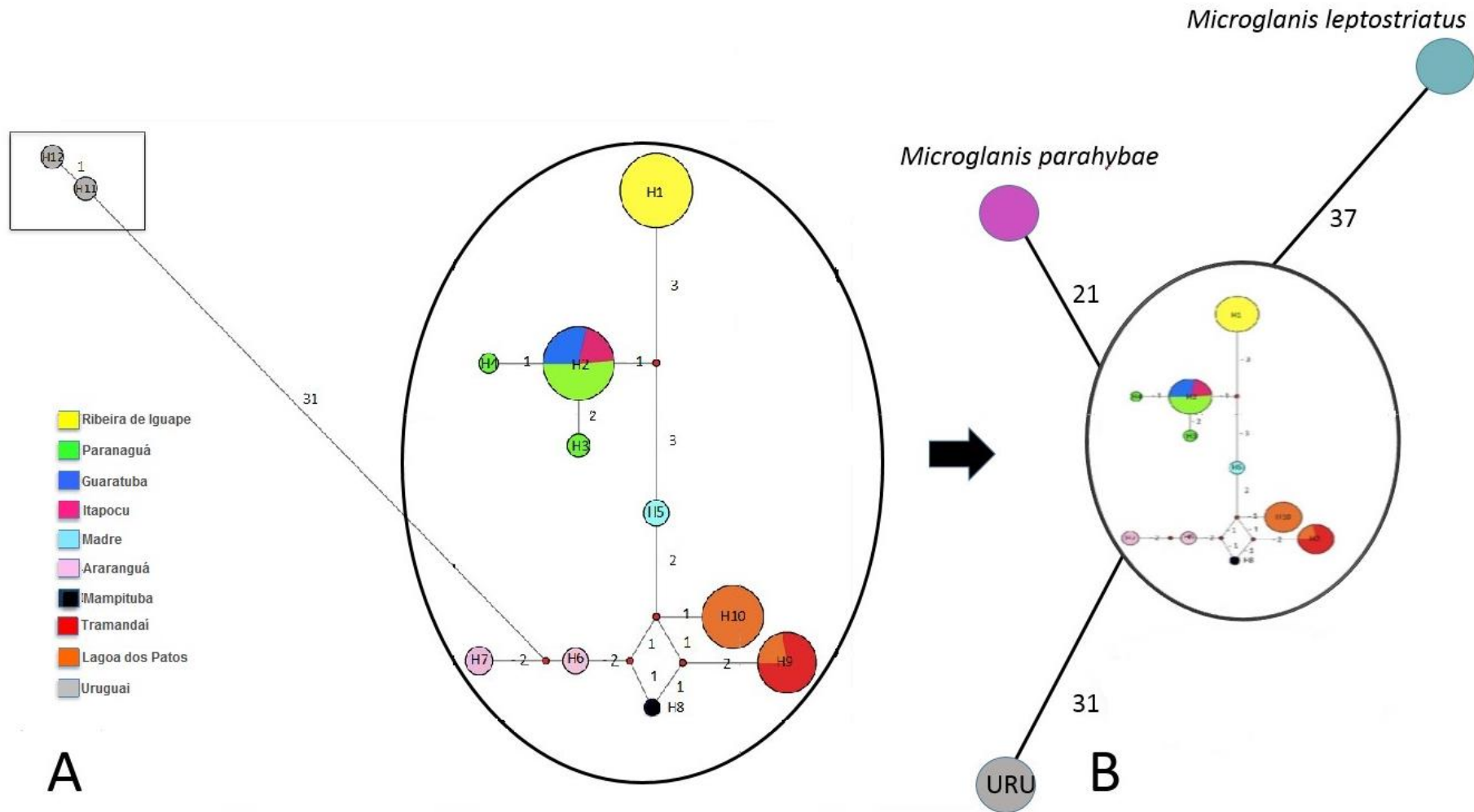


Figura 5. Rede de haplótipos demonstrando em A, a ocorrência de dois grupos principais dentro de *Microglanis cottoides* (Bacia do rio Uruguai X Bacias costeiras + *M. cibela*). O diâmetro dos círculos é proporcional ao número de indivíduos em cada haplótipo e as cores representam as localidades onde estes haplótipos foram encontrados; E em B, um esquema demonstrando os números de passos mutacionais que separam *M. cottoides*, das drenagens costeiras, e outras espécies de *Microglanis*.

Morfologia

Análises Morfométricas

Da análise de variáveis canônicas verifica-se sobreposição dos agrupamentos relativos às populações de *M. cottoides* e de outras espécies. Mesmo assim, nota-se que existe uma tendência à separação das amostras de *M. cottoides* (representadas pelos escores individuais distribuídos no lado esquerdo do primeiro eixo da variável canônica), de outras espécies (representadas no lado direito do primeiro eixo) (Fig. 6). No segundo eixo ainda se verifica a separação de outras amostras. O primeiro eixo canônico reteve 38.2% da variância total, e o segundo eixo, 20%. O Wilk's lambda de 0,01515, com F de 9,329 e $p < 0,001$ indicam que a separação dos grupos foi significativa.

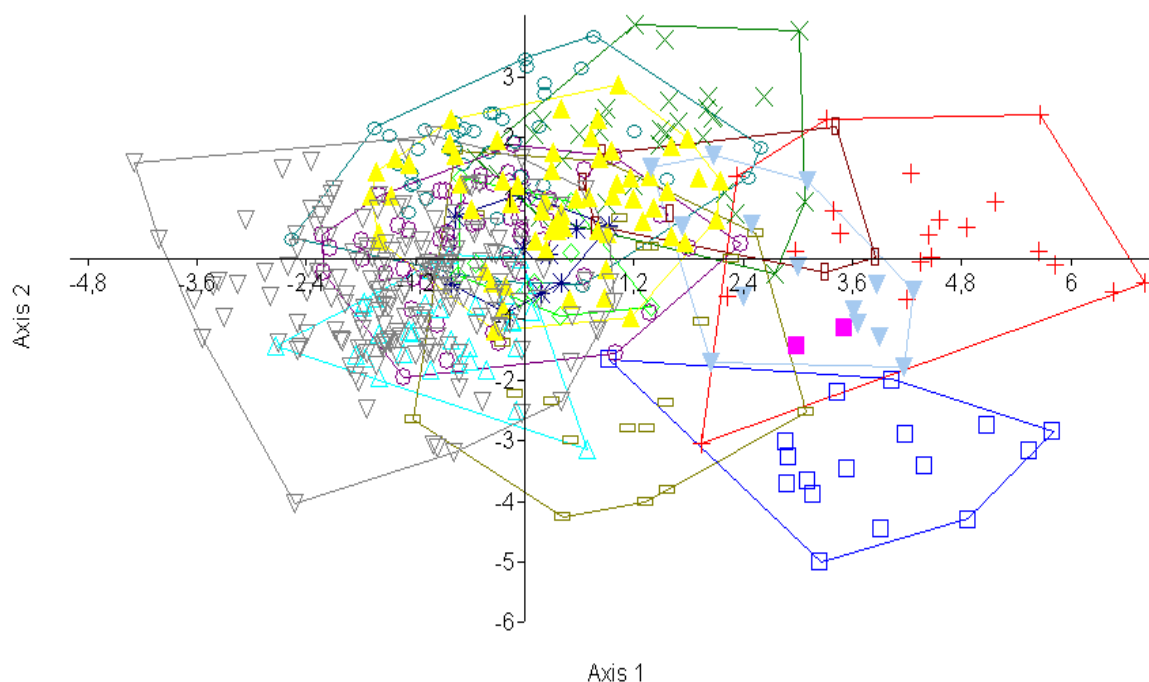


Figura 6. Dispersão dos escores individuais das amostras combinadas de *Microglanis*, nos dois primeiros eixos canônicos. *Microglanis garavelloi* (cruzes vermelhas), *M. eurystoma* (quadrados azuis), *M. malabarbai* (quadrados rosas cheios), *M. cibelaie* (cruzes verdes), *M. cottoides*-PAR (círculos roxos), *M. cottoides*-GUA (diamantes verdes claro), *M. cottoides*-MAD (estrelas azuis escuro), *M. cottoides*-ITA (triângulos azuis claro), *M. cottoides*-ARA (barras verticais verdes oliva), *M. cottoides*-MAM (barras verticais vermelhas escuro), *M. cottoides*-TRA (azul turquesa oval), *M. cottoides*-PAT (triângulos amarelos cheios), *M. cottoides*-RIB (triângulos invertidos cinzas), *M. cottoides*-URU (triângulos invertidos azuis claro).

A análise de similaridade com os centroides dos escores individuais nos dois primeiros eixos canônicos possibilitou notar dois agrupamentos principais, um formado pelas populações de *M. cottoides* (exceto a do rio Uruguai) e *M. cibelaie*, e o outro grupo formado pelas demais espécies de *Microglanis* e *M. cottoides* da bacia do rio Uruguai (Fig. 7).

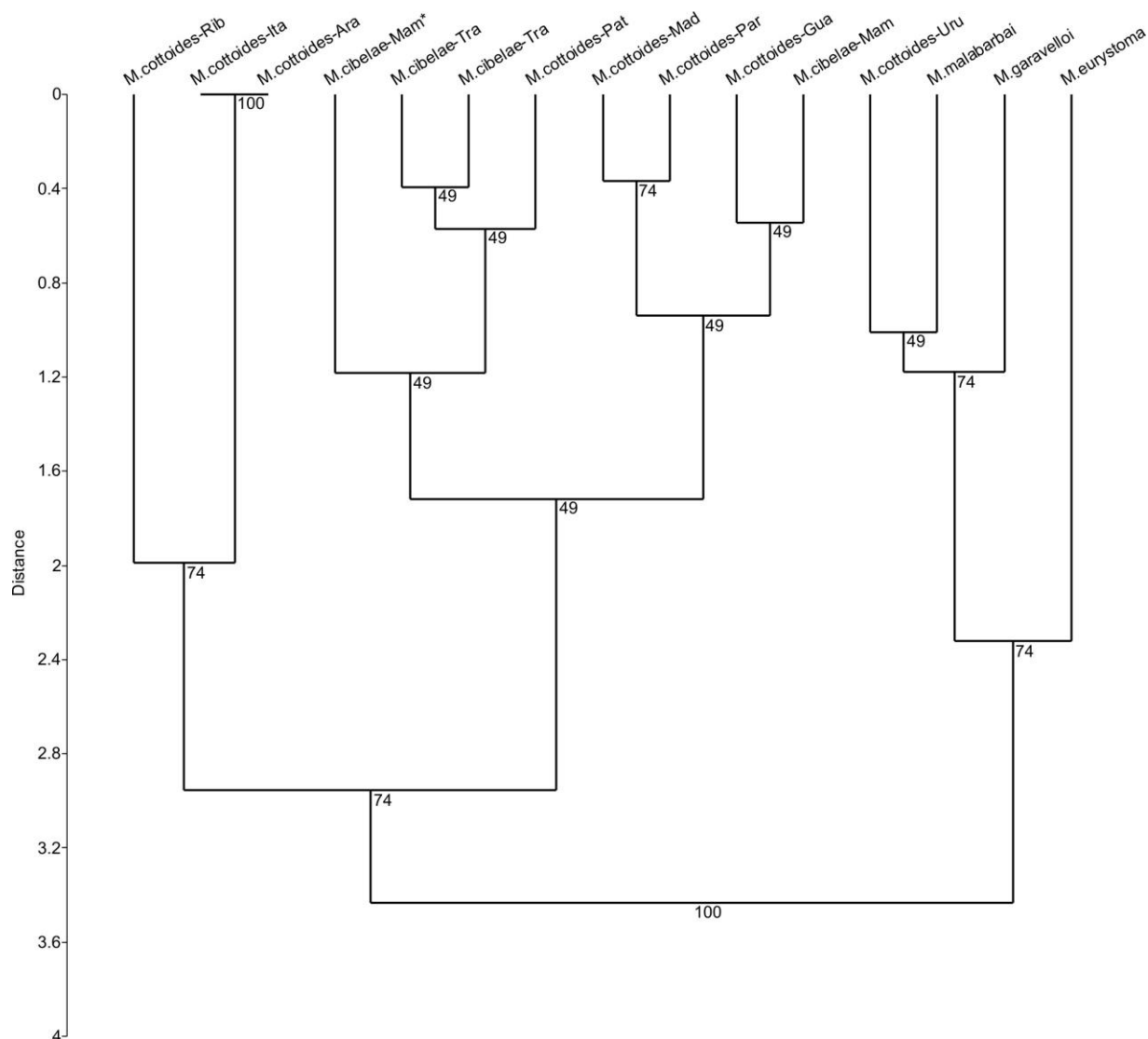


Figure 7. Dendrograma de similaridade das distâncias euclidianas entre os centroides das amostras de *Microglanis* das regiões sul e sudeste do Brasil. Números nos nós representam os valores percentuais de *Bootstrap*.

O grupo formado pelas espécies *M. garavelloii*, *M. eurystoma*, *M. malabarbai* e *M. cottoides* da bacia do rio Uruguai apresentam comprimento da cabeça, comprimento predorsal,

processo pós-cleitoral e diâmetro do olho ligeiramente maiores que os do grupo *M. cottoides*. Dentro do grupo *M. cottoides*, *M. cibela*e e *M. cottoides* da bacia do rio Mampituba diferiram das demais populações pelos maiores comprimentos dos espinhos das nadadeiras dorsal e peitoral, e da altura do pedúnculo caudal (Tab. 3).

Tabela 3. Peso das variáveis nos dois primeiros eixos canônicos, da análise das amostras combinadas de *Microglanis* das regiões sul e sudeste do Brasil. *Representa as variáveis com os maiores pesos para o grupo da bacia do rio Uruguai e outras espécies de *Microglanis*. **Representa os maiores pesos para o grupo das bacias costeiras.

VARIÁVEIS	CV1	CV2
Comprimento padrão	0,0003195	0,0028167
Comprimento da cabeça	0,011108*	0,00033948
Comprimento da nadadeira pélvica	0,0042656	0,0095006
Comprimento do espinho da nadadeira dorsal	-0,0076241	0,01969**
Comprimento do espinho da nadadeira peitoral	-0,0034811	0,024746**
Comprimento do processo pós-cleitoral	0,0079515*	0,019387
predorsal	0,0079522*	-0,0028729
Comprimento prepelvica	0,00050021	-0,00097081
Comprimento preanal	-0,0016046	-0,00099443
Comprimento do pedúnculo caudal	0,0030855	0,0064602
Altura do pedúnculo caudal	-0,0085169	0,0052186**
Largura do corpo	0,0044473	0,0064256
Comprimento da base da nadadeira dorsal	0,0032102	0,005506
Comprimento da base da nadadeira adiposa	-0,0043072	0,00062868
Comprimento da base da nadadeira anal	0,0033466	0,011733
Distância interorbital	-0,00064988	0,0031693
Diâmetro da órbita	0,0075002*	0,001079
Comprimento do focinho	0,0037633	0,0015915
Largura da boca	0,0048497	-0,0037231
Comprimento do barbilhão maxilar	-0,00013731	0,020853

DISCUSSÃO

As análises filogenéticas e de delimitação de espécies (GMYC) sugerem que *M. cibela*e pertence ao clado de *M. cottoides* e que os indivíduos da bacia do rio Uruguai sejam outra espécie, que não *M. cottoides*. Pois, o GMYC indicou dois *clusters* para *M. cottoides*, contendo os mesmos cladogramas recuperados nas análises filogenéticas. Vale à pena resaltar que o GMYC tem uma tendência a sobre-estimar o número de linhagens (Pons et al., 2006), ou seja, identificar linhagens intraespecíficas como linhagens distintas, o que reforça que a espécie denominada como *M. cibela*e seja um sinônimo Júnior de *M. cottoides*. Por outro lado, a grande divergência genética entre as populações de *M. cottoides* das bacias do rio Uruguai e das bacias costeiras, de 5,6% a 7,0%, corrobora a hipótese de que a espécie apontada como *M. cottoides* para a bacia do Rio Uruguai, pode não estar sendo identificada corretamente, pois divergências dessa magnitude são frequentemente encontradas entre espécies de um mesmo gênero em peixes Neotropicais (Carvalho et al., 2011; Pereira et al., 2011, 2013). Adicionalmente, em muitos trabalhos, divergências genéticas acima de 2% foram usadas como um valor de corte para separações interespecíficas (Hebert et al., 2003; Mabraganã et al., 2004; Hubert et al., 2010; Carvalho et al., 2011; Pereira et al., 2011, 2013).

A utilização do gene COI como “código de barra” genético, sugerido por Hebert et al. (2003), tem como base um estudo com 13.320 táxons, em que os resultados mostraram que 98% das espécies morfologicamente válidas apresentavam distâncias genéticas maiores que 3%, sendo que os 2% restantes consistiam em indivíduos do mesmo gênero com clara distinção morfológica, apesar da distância genética menor que 3%, o que sugere uma divergência recente.

Para a discriminação segura de espécies, utilizando a metodologia do *barcoding*, deve existir um “*Barcoding gap*” entre as variações genéticas intra e interespecífica (Herbert et al., 2003; Meyer & Paulay, 2005; Meier et al., 2008). Nossos resultados indicam sete vezes mais variação genética entre os indivíduos da bacia do rio Uruguai e as demais bacias costeiras, do

que dentro delas, bem como com as outras espécies de *Microglanis* adicionadas à análise, exceto de *M. cibela*.

Nossos resultados permitem supor que a espécie da bacia do rio Uruguai, designada como *M. cottoides*, se enquadra no critério de espécie críptica, uma vez que alguns autores (Bertaco & Cardoso, 2005; Malabarba & Mahler, 1998) apenas com a morfologia, não conseguiram distinguir *M. cottoides*, das bacias costeiras, da espécie do Uruguai. Segundo Pereira et al (2011) e Bellafonte et al. (2013), a grande divergência genética entre linhagens, que são morfologicamente indistintos, é evidência de espécies crípticas, e este parece ser o caso encontrado na morfoespécie de *Microglanis* do rio Uruguai.

Por outro lado, indivíduos coletados nas bacias do rio Mampituba e Tramandaí, sendo esta última a localidade-tipo de *M. cibela* (Malabarba & Mahler, 1998), apresentaram baixas divergências genéticas, de 0,5 a 1,8%, com média de 1,3%, entre *M. cottoides* das demais bacias costeiras. Apesar deste valor estar um pouco acima da média intrapopulacional observada em outros trabalhos, que é de cerca de 1,2% (Ratnasingham & Hebert, 2007; Lakra et al., 2011), ainda assim essa divergência é compatível para indivíduos de uma mesma espécie, ainda mais que estas populações estão isoladas e estudos genéticos comparativos sugerem que os peixes de água doce geralmente possuem altos níveis de diversidade genética intrapopulacional, como observado em *Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803, do Alto rio Paraná, que apresentou divergências variando de 0% a 2,2% (Frantine-Silva et al., 2015). Além disso, a distância genética entre os indivíduos destas bacias e a bacia da Lagoa dos Patos, que abriga o Rio Camaquã, localidade-tipo de *M. cottoides*, é de apenas 0,5%, sugerindo tratar-se da mesma espécie.

Sobreposição na distribuição das distâncias genéticas entre espécies de um mesmo gênero, como a observada em *M. cottoides*, podem ser originários de profundas divergências intraespecíficas ou baixas divergências entre espécies irmãs (Hubert et al., 2008) e a taxa de

evolução de genes mitocondriais pode variar dentro e entre grupos de espécies relacionadas (Frezal & Leblois, 2008). Entretanto, Pereira *et al.* (2013) demonstraram que aproximadamente 60%, das espécies analisadas do alto rio Paraná, apresentaram menos de 5% de divergência entre seus congêneres. Este baixo valor de divergência K2P pode refletir radiação recente dos peixes de água doce Neotropicais de cerca de 2 a 12 milhões de anos (Montoya-Burgos, 2003; Hubert *et al.*, 2007). Entretanto, até o momento, o menor valor de distância genética K2P encontrado entre congêneres, em peixes de água doce neotropical, foi de 1,68%, reportado por Rosso *et al.* (2012) em espécies que, segundo os mesmos autores, apresentam problemas taxonômicos. Por outro lado, Pereira *et al.* (2013) observaram altos índices de distância intraespecífica para *Hoplias intermedius* (Günther 1864) (>2%), levantando a hipótese de haver mais de uma unidade taxonômica dentro desta espécie. Porém, vale ressaltar que, segundo Vicari *et al.* (2006) e Ferreira *et al.* (2007), o gênero *Hoplias* é considerado um complexo de espécies e que o mesmo deve ser investigado com cautela para averiguar o real *status* taxonômico das espécies deste grupo na bacia do alto rio Paraná.

Outro fato bastante importante, que talvez explique a nomeação dos peixes das bacias dos rios Mampituba e Tramandaí como uma espécie diferente de *M. cottoides*, seja a utilização, como material comparativo, de indivíduos provenientes do rio Uruguai identificados como *M. cottoides* (Malabarba & Mahler, 1998), uma vez que, conforme nossos resultados tanto molecular quanto morfológico, os indivíduos da bacia do rio Uruguai não são *M. cottoides*.

A rede de haplótipos também confirma a formação de dois haplogrupos bem distintos. A quantidade de passos mutacionais que separam os indivíduos da bacia do rio Uruguai dos indivíduos das bacias costeiras é maior do que o encontrado em *M. parahybae* (21 passos mutacionais), da bacia do Paraíba do Sul e um pouco abaixo do encontrado em *M. leptostriatus* (37 passos mutacionais), da bacia do São Francisco. Desta forma, o DNA *barcoding* demonstrou ser útil no diagnóstico das espécies, porque as divergências de sequência foram menores entre

os indivíduos da mesma espécie do que entre espécies estreitamente relacionadas, com exceção de *M. cibela*.

A análise das variáveis canônicas também demonstra que existem dois grupos bem definidos, um formado pelos indivíduos da bacia do rio Uruguai com as demais espécies de *Microglanis*, com exceção de *M. cibela*, e o outro formado por essa espécie e pelos indivíduos das bacias costeiras. Nota-se que os indivíduos da bacia do rio Uruguai ficaram morfometricamente mais próximos à *M. malabarbai*, uma espécie descrita do rio Uruguai (Bertaco & Cardoso, 2005). Mesmo assim, as análises morfométricas apresentadas por Bertaco & Cardoso (2005) são estatisticamente consistentes para diferenciar *M. malabarbai* de *M. cottoides*, tanto da bacia do rio Uruguai, quanto das drenagens costeiras. Portanto, esses resultados reforçam a hipótese de que os indivíduos identificados como *M. cottoides*, da bacia do rio Uruguai, seja uma espécie nova.

Considerando que houve eficiente discriminação das outras espécies de *Microglanis* adicionadas às análises moleculares e morfométricas, ao fato de os indivíduos das bacias do Tramandaí e Mampituba apresentarem baixa divergência genética entre outras bacias, principalmente Madre, Araranguá e Lagoa dos Patos, e pelo compartilhamento de haplótipos com a bacia da Lagoa dos Patos, localidade-tipo de *M. cottoides*, é possível indicar que essas amostras das drenagens costeiras, do rio Ribeira de Iguape à Lagoa dos Patos, pertençam à espécie *M. cottoides*. Além disso, pelo fato dessas análises agruparem a espécie *M. cibela* com *M. cottoides* das bacias costeiras, é factível sugerir que *M. cibela* seja um forte candidato à sinônimo júnior de *M. cottoides*.

Desta forma, nossos resultados sugerem que *M. cottoides*, como atualmente diagnosticado, forma um grupo não monofilético, pois inclui uma espécie morfológica e geneticamente distinta, que ocorre na bacia do rio Uruguai, e exclui uma espécie morfológica e geneticamente similar, denominada *M. cibela*.

Próximos passos....



- ❖ Descrever a nova espécie de *Microglanis* para a bacia do Rio Uruguai e para tanto:
 - ✓ coletar mais exemplares da espécie nova;
 - ✓ testar a monofilia recíproca entre a espécie nova e *Microglanis eurystoma* e *Microglanis malabarbai*, ambas da bacia do rio Uruguai e
 - ✓ refinar as análises morfológicas na busca de caracteres diagnósticos.

Referências

- Aquino, L. M., Tango, J. M., Canoy, R. J., Fontanilla, I. K., Basiao, Z. U., Ong, P. S. & J. P. Quilang. (2011). DNA barcoding of fishes of Laguna de Bay, Philippines. *Mitochondrial DNA*, 22: 143–153.
- Ardura, A., Planes, S. & Garcia-Vazquez, E. (2013). Applications of DNA barcoding to fish landings: authentication and diversity assessment. *ZooKeys*, 365: 49–65.
- Ayala-Varela, F. P., Troya-Rodríguez, D., Talero-Rodríguez, X. & Torres-Carvajal, O. (2014). A new Andean Anoles species of the *Dactyloa* clade (Squamata: Iguanidae) from western Ecuador. *Amphibian & Reptile Conservation*. 8(1): 8 - 24.
- Bellafronte, E., Mariguela, T., Garcia-Pereira, L., Oliveira C. & Moreira-Filho O. (2013). DNA barcode of Parodontidae species from the La Plata river basin-applying new data to clarify taxonomic problems. *Neotropical Ichthyology*. (11):497–506.
- Bertaco, V. A. & Cardoso, A. R. (2005). A new species of *Microglanis* (Siluriformes: Pseudopimelodidae) from rio Uruguay drainage, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 3(1): 61-67.
- Bhattacharjee, M. J., Laskar, B. A., Dhar, B. & Ghosh, S. K. (2012). Identification and re-evaluation of freshwater catfishes through DNA barcoding PLoS ONE, 7 (11), p. e49950 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0049950>
- Bizerril, C. R. S. F. (1994). Análise taxonômica e biogeografia da ictiofauna de água doce do leste brasileiro. *Acta Biológica Leopoldensia*, 18(1): 51-80.
- Boulenger, G. A. (1891). An account of the siluroid fishes obtained by Dr. H. Von Ihering and Herr Sebastian Wolff in the province Rio Grande do Sul. *Proceedings of the Zoological Society of London*, (2): 231.
- Carvalho, D. C., Oliveira, D. A. A., Pompeu, P. S., Leal, C. G., Oliveira, C. & Hanner, R. (2011). Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River Basin. *Mitochondrial DNA*, 22(Suppl 1): 80-86.
- Clare, E. L., Lim, B. K., Fenton, M. B. & Hebert, P. D. N. (2011). Neotropical Bats: Estimating Species Diversity with DNA Barcodes. *PLoS ONE* 6 (7): e22648.
- Crawford, A. J., Cruz, C., Griffith, E., Ross, H., Ibáñez, R., Lips, K. R., Driskell, A. C., Bermingham, E. & Crump, P. (2012). DNA barcoding applied to ex situ tropical amphibian conservation programme reveals cryptic diversity in captive populations. *Molecular Ecology Resources*. doi: 10.1111/1755-0998.12054.
- Dayrat, B. (2005). Toward integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85:407-415.
- De Queiroz, K. & Gauthier, J. (1990). Phylogeny as a central principle in taxonomy: Phylogenetic definitions of taxon names. *Systematic Zoology*, 39(4): 307 – 322.

- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56 (6): 879 – 886.
- Ferreira, I. A, Bertollo, L. A. C., & Martins, C. (2007). Comparative chromosome mapping of 5S rDNA and 5SHindIII repetitive sequences in Erythrinidae fishes (Characiformes) with emphasis on the *Hoplias malabaricus* “species complex”. *Cytogenetic and Genome Research*, 118(1): 78–83.
- Frantine-Silva, W., Sofia, S. H., Orsi, M. L. & Almeida, F. S. (2015). DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. *Molecular Ecology Resources* (2015) doi: 10.1111/1755-0998.12385
- Frézal, L. E. & Leblois R. (2008). Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection Genetics and Evolution*, 8: 727-736.
- Fujita, M. K., Leaché, A. D., Burbrink, F. T., McGuire, J. A., Moritz, C. (2012). Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, 27 (9): 480 – 488.
- Gomes, A. L. (1946). A review of *Microglanis*, a genus of South American Catfishes, with notes on related Genera. *Occasional Papers of the Museum of Zoology*, 494: 1-19.
- Gosline, W. A. (1941). Synopsis of the Genera of Pimelodid Catfishes without a free orbital rim, 2 (3): 83-88.
- Grant, R.A.; Griffiths, H.J., Steinke, D. Wadley, V. & Linse, K. (2011). *Polar Biology*, 34: 775–780.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hammer, O., D. A. T. Harper & P. D. Ryan. (2001). PAST: Palaeontological Statistics Software Package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4: 1-9.
- Hang, D. X. & Hewitt, G.D. (1996). Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *TREE* 11: 247-251.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & Dewaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Real Society B*, 270(1): 313-321.
- Hebert, P. D. N., J. R.; Waard, Landry, J. F. (2010). DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biology Letters*, 6: 359–362.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & Dewaard, J. R. (2003a). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Real Society B*, 270(1): 96-99.
- Hubert, N., Delrieu-trottin, E., Irisson, J., Meyer, C., & Planes, S. (2010). Molecular Phylogenetics and Evolution Identifying coral reef fish larvae through DNA barcoding :

- A test case with the families Acanthuridae and Holocentridae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(3): 1195-1203.
- Hudson, R. R. & Coyne, J. A. (2002). Mathematical consequences of the genealogical species concept. *Evolution*, 56: 1557–1565.
- Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N. E., Taylor, E., Burrige, M., Watkinson, D., Dumont, P., Curry, A., Bentzen, P., Zhang, J., April, J. & Bernatchez, L. (2008). Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS ONE*, 3, e2490
- Johnsen, A., Rindal, E., Ericson, P. G. P., Zuccon, D., Kerr, K. C. R., Stoeckle, M. Y. & Lifjeld, D. (2010). DNA barcoding of Scandinavian birds reveals divergent lineages in trans-Atlantic species. *Journal of Ornithology*. 151: 565 - 578.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kizirian, D. & Donnelly, M. A. (2004). The criterion of reciprocal monophyly and classification of nested diversity at the species level. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32: 1072 – 1076.
- Knowles, L. L., Carstens, B. C. (2007). Delimiting species without monophyletic gene. *Systematic Biology*, 56 (6): 887 – 895.
- Lakra, W. S., Verma, M. S., Goswami, M., Lal, K. K., Mohindra, V., Punia, P., Gopalakrishnan, A., Singh, K. V., Ward, R. D. & Hebert, P. (2011). DNA barcoding Indian marine fishes. *Molecular Ecology Resources*, 11: 60-71.
- Lara, A., León, J. L. P., Rodríguez, R.; Casane, D.; Côte, G.; Bernatchez, L.; Garcia-Macahdo, E. (2010). DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Molecular Ecology Resources*, 10: 421-430.
- Liotta, J. (2006). Distribución geográfica de los peces de aguas continentales de la República Argentina La Plata: ProBiota, Universidad Nacional de La Plata. 653 p.
- Lucena, C. A. S. & S. O. Kullander. (1992). The *Crenicichla* (Teleostei: Cichlidae) species of the Uruguay River drainage in Brazil. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 3(2): 97-160.
- Mabraganã, E., Díaz, A. J. M., Hanner, R., Zhang, J. & González, C. M. (2011). DNA Barcoding Identifies Argentine Fishes from Marine and Brackish Waters. *PLoS ONE* 6(12): e28655. doi:10.1371/journal.pone.0028655
- Malabarba, L. R. & J. K. F. Mahler Jr. (1998). Review of the genus *Microglanis* in the rio Uruguay and coastal drainages of southern Brazil (Ostariophysi: Pimelodidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 9: 243-254

- McCusker, M. R., Denti, D., Van Guelpen, L., Kenchington, E. & Bentzen, P. (2013). Barcoding Atlantic Canada's commonly encountered marine fishes. *Molecular Ecology Resources*, 13: 177-188.
- Meyer, C. P. & Paulay, G. (2005). DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLOS Biol*, 3: 2229-2238.
- Meier, R., Zhang, G. & Ali, F. (2008). The use of mean instead of smallest inter-specific distances exaggerates the size of the "barcoding gap" and leads to misidentification. *Syst Biol*, 57: 809-813.
- Mees, G. F. (1974). The Auchenipteridae and Pimelodidae of Suriname (Pisces, Nematognathi). *Zoologische Verhandelingen*, 132: 1-246.
- Miquelarena, A. M. & H. L. López. (2004). Considerations on the ichthyofauna of the Uruguay River basin: *Hemiancistrus fuliginosus* Cardoso y Malabarba, 1999 (Loricariidae: Ancistrinae). *Journal of Applied Ichthyology*, 20: 234-237.
- Monaghan, M. T., Wild, R., Elliot, M. Fujisawa, T., Balke, M., Inward, D. J., Lees, D. C., Ranaivosolo, R., Eggleton, P., Barraclough, T. G. & Vogler, A. P. (2009). Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Systematic Biology*. 58, 298 - 311.
- Montoya-Burgo, J. I. (2003). Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, 12: 1855-1867.
- Mori, H. & Shibatta, O. A. (2006). A new species of *Microglanis* Eigenmann, 1912 (Siluriformes: Pseudopimelodidae) from Rio São Francisco basin, Brazil. *Zootaxa*, 1302: 31-42.
- Nguyen, S. N.; Yang, J. X., Le, T. N. T., Nguyen, L. T., Orlov, N. L., Hoang, C. V., Nguyen, T. Q., Jin, J. Q., Rao, D. Q., Hoang, T. N., Che, J., Murphy, R. W. & Zhang, Y. P. (2014). DNA barcoding of Vietnamese bent-toed geckos (Squamata: Gekkonidae: *Cyrtodactylus*) and the description of a new species. *Zootaxa*. 3784 (1): 048 - 066.
- Oyakawa, O. T., & Menezes, N. A. (2011). Checklist dos peixes de água doce do Estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica*, 11(1).
- Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I., Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7:16.
- Paz, A. & Crawford, A. J. (2012). Molecular-based rapid inventories of sympatric diversity: a comparison of DNA barcode clustering methods applied to geography-based vs clade-based sampling of amphibians. *Journal of Biosciences*. 37, 887 - 896.
- Pereira, L. H. G., Hanner, R., Foresti, F. & Oliveira C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics*, 14:20 <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/14/20>

- Pereira, L. H. G., Pazian, M. F., Hanner, R., Foresti, F. & Oliveira C. (2011a). DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22 (Suppl 1): 71–79.
- Pereira, L. H. G., Pazian, M. F., Hanner, R., Foresti, F. & Oliveira C. (2011b). DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paraná Basin of Brazil. *Mitochondrial DNA*. 22(Suppl 1): 87–96.
- Pons, J., Barraclough, T., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W. & Vogler, A. P. (2006). Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematics Biology*. 55: 595 - 609.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. & Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*. 1864 - 1877.
- Quevedo, R. & Reis, R.E. (2002). *Pogonopoma obscurum*: a new species of loricariid catfish (Siluriformes: Loricariidae) from southern Brazil, with comments on the genus *Pogonopoma*. *Copeia*, 402-410.
- Ratnasingham, S. & Heber (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (www.bacodingoflife.org). *Molecular Ecology Notes*, 7(1): 355–364.
- Ribeiro, A. C. (2006). Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical ichthyology*, 4(2): 225-246.
- Rosso, J. J., Mabragaña, E. Castro, M. G. & Díaz de Astarloa, M. (2012). DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. *Molecular Ecology Resource*, 12: 999–1011.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001). *Molecular cloning a laboratory manual*. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- Schilick-Steiner, B. C., Steiner, F. M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E., Crozier, R. H. (2010). Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology*, 55: 421 – 438.
- Schultz, L. P. (1944). The catfishes of Venezuela, with descriptions of thirty-eight new forms. *Proceedings of the United States National Museum*, 94: 173-338.
- Shibatta, O. A. (2003). Family Pseudopimelodidae (Bumblebee catfishes, dwarf marbled catfishes). pp. 401-405. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr. (Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Edipucrs.
- Shibatta, O. A. (2007). Família Pseudopimelodidae. Pp. 103-104. In: Buckup, P. A., N. A. Menezes & M. S. Ghazzi (Eds.). *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Rio de Janeiro, Museu Nacional, 195p.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12): 2725-2729.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673–4680.
- Togawa, R. C. & Brigido, M. M. (2003). PHPH : Web based tool for simple electropherogram quality analysis. In 1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology - IcoBiCoBi (p. 1). Ribeirão Preto.
- Vicari, M., Pazza, R., & Artoni, R. (2006). Cytogenetics and biogeography: considerations about the natural origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguaçú River. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(2): 297-303.
- Vogler, A. P. & Monaghan, M. T. (2006). Recent advances in DNA taxonomy. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 45:1 - 10.
- Ward, R. D.; Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R. & Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 360, 1847 - 1857.
- Ward, R. D., Hanner, R., & Hebert, P. D. N. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74(2): 329–56.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P. & Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*. 29, 2869 - 76.

CAPÍTULO 2

**FILOGEOGRAFIA DE *Microglanis cottoides* (Boulenger, 1891)
(PSEUDOPIMELODIDAE): EVENTOS E PROCESSOS RELACIONADOS À
DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE**

Este manuscrito será submetido à *Zoologica Scripta* na forma de artigo regular

FILOGEOGRAFIA DE *Microglanis cottoides* (Boulenger, 1891) (PSEUDOPIMELODIDAE): EVENTOS E PROCESSOS RELACIONADOS À DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE

Microglanis cottoides é amplamente distribuído em bacias ao longo da costa Atlântica brasileira que estão isoladas entre si, bem como separadas das grandes drenagens do interior, pelas montanhas escarpadas da margem oriental do escudo cristalino brasileiro, conferindo a esta espécie qualidades apropriadas para estudos filogeográficos. O objetivo deste trabalho foi analisar a estrutura genética, demografia histórica e padrões temporais de divergência em populações naturais de *Microglanis cottoides*, ao longo de sua área de distribuição, além da relação filogenética entre seus congêneres. A estrutura genética e a demografia histórica foram analisadas utilizando uma combinação de marcadores nuclear (microssatélites) e mitocondrial (COI), em 542 e 167 indivíduos, respectivamente. Os níveis de variação genética observados em *M. cottoides* ($H_e = 0,472-0,768$), estão dentro do esperado quando comparado com outras espécies de Siluriformes ($H_e = 0,055-0,861$ e $0,310-0,942$), e os *loci* investigados mostraram um alto nível de polimorfismo (14,2 alelos / loco). De forma geral, a diversidade genética encontrada nas populações de *M. cottoides* foi alta e semelhante ao que geralmente é encontrada em populações de peixes selvagens. No entanto, observou-se forte estruturação genética principalmente entre as amostras de Paranaguá, Guaratuba e Itajaí e menor estruturação entre Araranguá e Mampituba e Tramandaí e Patos, indicando maior possibilidade de fluxo gênico entre essas populações, e conseqüentemente, maior similaridade entre estas. Contudo, considerando a distância geográfica e principalmente o isolamento das bacias costeiras que, provavelmente, ocorreu entre 6.000 a 10.000 anos antes do presente, a similaridade entre as populações sugere fluxos gênicos históricos, refletindo um período em que as bacias estavam conectadas. Paleocanais fluviais presentes na plataforma continental pode indicar que estas drenagens tinham comunicação com outras drenagens de bacias próximas, permitindo a ampla distribuição de *Microglanis cottoides* em drenagens que hoje estão isoladas. Entretanto, nota-se que as divergências genéticas entre os indivíduos das bacias costeiras aumentam à medida que estas se distanciam, e observa-se que entre o sul de Santa Catarina e o norte do Rio Grande do Sul há uma quebra filogeográfica de cerca de 1,8 Ma, causando a divisão das populações de *M. cottoides* em dois filogrupos. As análises filogeográficas e filogenéticas demonstraram que as espécies litorâneas, *M. parahybae* e *M. cottoides*, são filogeneticamente mais relacionadas e divergiram-se há cerca de 5 Ma. Já *M. garavelloi* do Alto Paraná e *Microglanis* sp. do Rio Uruguai divergiram dessas espécies do litoral há pelo menos 8 Ma, coincidindo com a época de diversificação da maior parte da ictiofauna Neotropical, que ocorreu entre 3 e 10 Ma. Portanto, tudo indica que a história filogeográfica de *M. cottoides* envolve eventos vicariantes de origem tectônica como a formação das drenagens costeiras a partir de eventos orogênicos e, mais recentemente, por eventos climáticos pleistocênicos que isolaram várias populações. Entretanto, em períodos de glaciação, quando as drenagens voltam a se encontrar, as populações de *M. cottoides* possivelmente trocam informações genéticas e por isso mantêm sua unidade específica.

Introdução

O gênero *Microglanis* foi proposto por Eigenmann (1912), para abrigar a espécie *M. poecilus* da Guiana, e compreende os peixes da família Pseudopimelodidae de pequeno tamanho, menor que 11 cm de comprimento padrão (CP), linha lateral incompleta e com a placa dentígera com a lateral arredondada (Shibatta 2003). Esses peixes podem ser classificados, fisioecologicamente, como pertencentes à divisão primária (*sensu* Myers 1938), por não tolerarem a água salgada, o que impossibilita sua dispersão utilizando o ambiente marinho. Até o momento, foram descritas 24 espécies de *Microglanis*, todas com distribuição restrita à América do Sul (Shibatta 2014). Entre estas, *M. cottoides* (Boulanger, 1891) é considerada uma das mais amplamente distribuídas, ocorrendo do estado de São Paulo ao Rio Grande do Sul, ao longo da costa Atlântica brasileira (Malabarba & Mahler 1998, Shibatta 2003, 2007; Mori & Shibatta 2006; Oyakawa & Menezes 2011).

Conforme critérios apontados por Avise (2000), *Microglanis cottoides* apresenta qualidades adequadas para estudos filogeográficos, pois além de sua ampla distribuição, a espécie ocorre em uma região onde os rios formam uma série de bacias hidrográficas ao longo da costa, que drenam diretamente para o Atlântico e estão isoladas entre si, bem como separadas das grandes drenagens do interior, pelas montanhas escarpadas da margem oriental do escudo cristalino brasileiro (Ribeiro 2006). Esse cenário foi moldado por interações entre eventos orogênicos do Mioceno/Plioceno e oscilações climáticas do Pleistoceno ocorridos na região (Weitzman *et al.* 1988; Lundberg *et al.* 1998; Villwock *et al.* 2005; Ribeiro 2006), que proporcionaram padrões filogeográficos bastante complexos, como um elevado número de táxons endêmicos (Géry 1969; Menezes *et al.* 1978; Bizerril 1994; Buckup 2011). Entretanto, informações históricas sobre as comunidades de peixes dessa região ainda são escassas e fragmentadas, dificultando o entendimento dos processos históricos que determinaram a sua composição e distribuição (Bizerril & Lima 2000).

Peixes de água doce, em geral, exibem acentuada estrutura filogeográfica ligada às alterações históricas e ecológicas ocorridas no ambiente (Bermingham & Avise 1986; Waters *et al.* 2007; Ribeiro *et al.* 2013). Como esses organismos dependem diretamente de conexões entre rios e bacias para sua dispersão, a história das bacias e sua ictiofauna está intimamente ligada à história da paisagem. Assim, a diferenciação das espécies por isolamento geográfico é o reflexo do passado geológico e das mudanças ambientais ocorridas na região (Avise 2000, 2009; Ribeiro 2006; Ribeiro *et al.* 2013). Embora a escala temporal desses eventos ou processos possa ser bastante variável, níveis de divergências podem ser reconstruídos a partir de graus de divergência do DNA mitocondrial (mt) (Bermingham & Martin 1998; Sivasudar *et al.* 2001; Montoya-Burgo 2003; Ribeiro *et al.* 2013).

Estudos biogeográficos envolvendo níveis taxonômicos supraespecíficos frequentemente utilizam caracteres morfológicos nas inferências filogenéticas (Lucinda *et al.* 2005). Por outro lado, dados moleculares com enfoque filogeográfico são os mais utilizados em nível intraespecífico (Avise 2000; Froufe *et al.* 2005), pois possibilitam esclarecer padrões históricos e evolutivos entre populações de uma espécie, permitindo revelar eventos relacionados a processos demográficos, bem como os limites entre espécies (Avise *et al.* 1987; Avise 2000, 2009; Freeland 2005; Vazquez-Dominguez 2007), criando uma ponte entre os processos micro e macroevolutivos (Avise 2009; Martins & Domingues 2011).

Na atualidade, além das relações filogenéticas e da genética de populações clássicas, estudos filogeográficos contam com sofisticados métodos de inferência em demografia histórica baseados em abordagens matemáticas e estatísticas da teoria da Coalescência (Martins & Domingues 2011), a qual se baseia na identificação do processo genealógico de uma amostra de genes em uma população, capaz de identificar eventos que ocorreram com os genes desde o ancestral comum mais recente (Kingman 1982). Ou seja, é um modelo retrospectivo de genética populacional que emprega uma amostra dos indivíduos de uma população para rastrear todos os

alelos de um gene compartilhados por todos os membros da população até uma única cópia ancestral (Fu & Li 1999).

Até 2011, quase 80% dos estudos com abordagens filogeográficas na América do Sul utilizaram o DNAmT como marcador; destes, 20% foram em conjunto com outros marcadores, principalmente os Microsatélites, conhecidos também como SSRs (*Simple Sequence Repeat*) e STRs (*Single Tandem Repeat*) (Turchetto-Zolet *et al.* 2013). Marcadores microsatélites constituem uma ferramenta valiosa em estudos genéticos de populações (Selkoe & Toonen 2006), por permitir a determinação do grau de relação entre indivíduos e/ou grupos de uma mesma espécie, da análise de ascendência, de níveis de endogamia de uma população, de sua história demográfica, além de definir o tamanho efetivo, a magnitude e direcionamento do fluxo de genes entre as populações (Gaggiotti *et al.* 2002). Assim, esse marcador pode trazer informações valiosas sobre padrões filogeográficos, como níveis de parentesco e fluxo gênico entre as populações (Turchetto-Zolet *et al.* 2013).

Em peixes, os microsatélites têm sido aplicados, principalmente, em estudos relacionados à conservação e manejo de espécies, pois permitem inferências sobre a variabilidade e estrutura genética das populações e os efeitos de fragmentação de ambientes, além de possibilitar a construção das relações filogenéticas entre táxons relacionados, pois revelam diferenças significativas mesmo entre populações separadas por pequenas distâncias geográficas (Carvalho-Costa *et al.* 2008; Abreu *et al.* 2009; Calcagnotto & DeSalle 2009; Matsumoto & Hilsdorf 2009; Pereira *et al.* 2009; Sanches *et al.* 2012).

Apesar da grande biodiversidade na América do Sul, estudos filogeográficos nesta região são bastante incipientes (Beheregaray 2008; Sérsic *et al.* 2011), representando apenas 6,3% de todos os trabalhos publicados no mundo sobre Filogeografia (Beheregaray 2008). Entretanto, nos últimos anos, trabalhos com esta abordagem aumentaram significativamente (Sivasundar *et al.* 2001; Beheregaray *et al.* 2001; Montoya-Burgos 2003) e vêm contribuindo

para a compreensão dos processos evolutivos que levaram à atual diversidade e distribuição de linhagens modernas nessa região (Turchetto-Zolet *et al.* 2013).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi analisar, utilizando marcadores microssatélites e mitocondriais, a estrutura genética, demografia histórica e padrões temporais de divergência em populações naturais de *Microglanis cottoides*, ao longo de sua área de distribuição, além da relação filogenética entre seus congêneres geograficamente mais próximos.

Material e Métodos

Amostragem de exemplares e extração do DNA

No total, 73 pontos de coletas em rios e riachos ao longo da costa brasileira, do estado de São Paulo ao Rio Grande do Sul, foram amostrados utilizando peneiras, redes de arrasto e tarrafas. Os exemplares de *M. cottoides* foram capturados em 45 localidades, ao longo de nove bacias hidrográficas (Ribeira de Iguape-RIB, Paranaguá-PAR, Guaratuba-GUA, Itapocu-ITA, Madre-MAD, Araranguá-ARA, Mampituba-MAM, Tramandaí-TRA e Lagoa dos Patos-PAT) de São Paulo ao Rio Grande do Sul (Figura 1). Os peixes foram coletados em conformidade com as leis brasileiras com autorização de coletas para fins científicos: licença ICMBio número 12120-10. Após a coleta, os animais foram anestesiados por imersão em Eugenol a 1% e preservados em etanol a 95%. Todos os indivíduos coletados foram depositados na coleção do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), do Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Londrina, Paraná, Brasil.

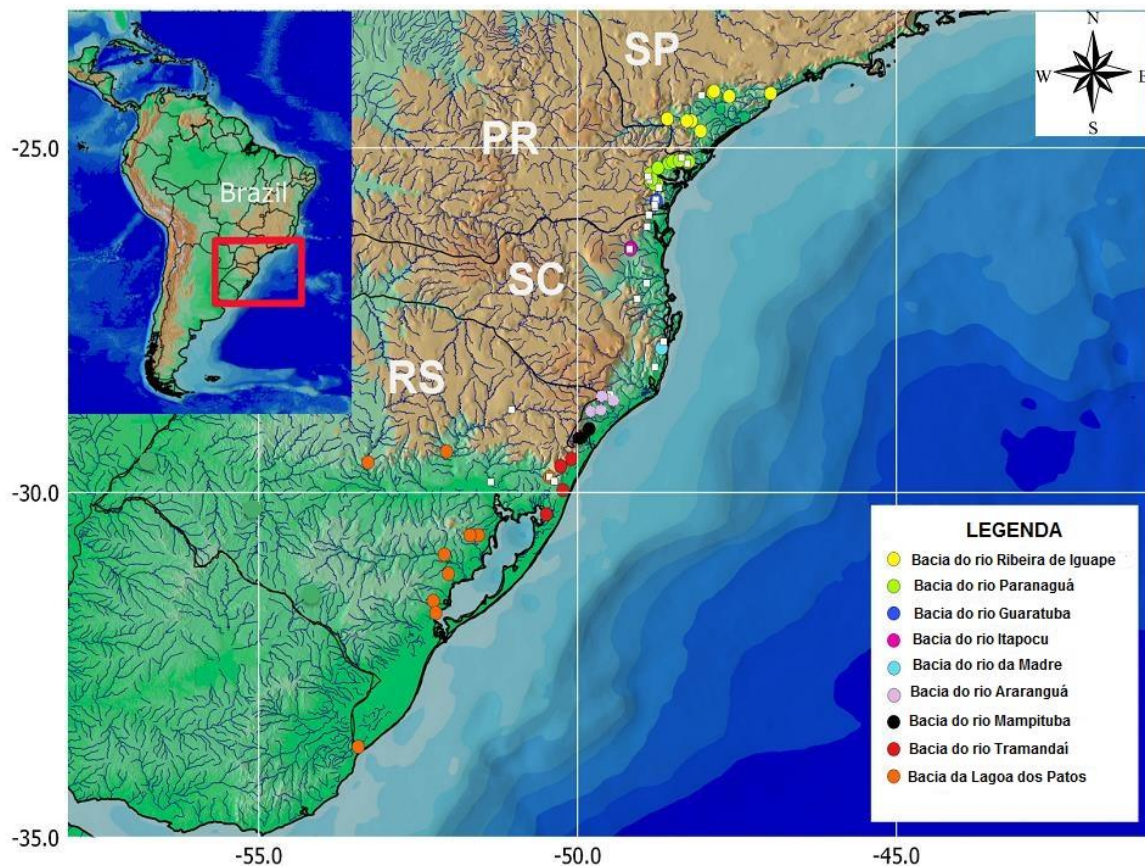


Figura 1. Mapa com os pontos de coleta nos estados do sudeste e sul do Brasil. Pontos brancos representam as 28 localidades onde não foi encontrado *Microglanis*. As siglas SP, PR, SC e RS, referem-se aos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, respectivamente.

Para a análise da estrutura genética e a demografia histórica de *M. cottoides* foram utilizados uma combinação de marcadores nuclear (10 *loci* microssatélites) e mitocondrial (sequências da citocromo oxidase I - COI, região *barcoding* com 620 pb), utilizando-se amostras de 542 e 167 indivíduos, respectivamente.

Cinco espécies de *Microglanis* (*M. parahybae* (Steindachner, 1880), da bacia do rio Paraíba do Sul, *Microglanis* sp., da bacia do rio Uruguai, *M. garavelloii* Shibatta & Benine, 2005, da bacia do Alto rio Paraná, *M. leptostriatus* Mori & Shibatta, 2006, da bacia do rio São Francisco e *M. poecilus* Eigenmann, 1912, da bacia do rio Tapajós) e sete outras espécies de Pseudopimelodidade (*Pseudopimelodus pulcher* (Boulenger, 1887), *P. aff. pulcher*,

Pseudopimelodus charus (Valenciennes, 1840), *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876, *Cephalosilurus apurensis* (Mees, 1978), *Batrochoglanis raninus* (Valenciennes, 1840) e *Batrochoglanis villosus* (Eigenmann, 1912)), foram adicionadas às análises filogenéticas, como material comparativo. Algumas amostras foram doadas e as informações a respeito destas estão sumarizadas na Tabela 1.

O DNA genômico dos animais foi isolado a partir do tecido muscular usando o protocolo de extração fenol/clorofórmio segundo Almeida *et al.* (2001). A concentração das amostras foi determinada a partir do espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Posteriormente, as amostras foram diluídas em água para a concentração de 5 ng/ μ L.

Tabela 1. Amostras das populações de *Microglanis cottoides*, utilizadas nas análises moleculares, conforme suas bacias hidrográficas de origem e de outras espécies de *Microglanis* e de Pseudopimelodidae utilizadas como material comparativo.

ESPÉCIES	BACIAS	DRENAGENS	NÚMERO DE TOMBO	REGISTRO NO GENBANK	AMOSTRAS	
					COI	Microssatélite
<i>Microglanis cottoides</i>	Ribeira de Iguape - RIB	Rio Juquiá	MZUEL 8014	KP 063067 a 063071	39	182
		Rio Ipiranga	MZUEL 8015			
		Rio Fau	MZUEL 8016			
		Rio Preto I	MZUEL 8017			
		Rio Preto II	MZUEL 8018			
		Afluente Rio Jaguarí I	MZUEL 8019			
		Afluente Rio Jaguarí II	MZUEL 8020			
		Rio Iporanga	MZUEL 8021			
		Rio Pindaúba	MZUEL 8021			
			LBP 7426			
	Paranaguá - PAR	Rio Tagaçaba	MZUEL 7941	PK 063072 a 063075	27	62
		Rio Utinga	MZUEL 7942			
		Rio Passa Sete	MZUEL 7943; LBP 762			
		Rio Mergulhão	MZUEL 7945			
		Rio Sambaqui	MZUEL 7946			
		Rio Bananal	MZUEL 7947			
		Rio Ipiranga	MZUEL 7949			
		Rio São João/Capivari	MZUEL 7950			
		Rio das Antas	MZUEL 7953			
		Rio Nhundiaquara	LBP 2081			
	LBP 3616					
Guaratuba - GUA	Rio Rasgado	MZUEL 7944, 7952	KP063073- 063079	12	23	
	Rio Canavieira	MZUEL 7951				
Itapocu - ITA	Rio Itapocu	MZUEL 7441	KP 063080 a 063083)	08	55	
	Ribeirão do Cavalo	MZUEL 7452 e 7944				
Madre – MAD	Rio da Madre	MZUEL 10184	KP 063084 a 063088	05	10	
Araranguá - ARA	Rio Manin	MZUEL 7442	KP063089- 063093	11	28	
	Rio Serrinha	MZUEL 7444				
	Rio Amola Faca	MZUEL 7446				

		Rio Serra Velha	MZUEL 7447			
	Mampituba – MAM	Rio Sanga da Paca Praia Grande	MZUEL 7443 UFRGS 12720	KP 063094 e 063095	02	07
	Tramandaí – TRA	Rio Quebrada dos Sinos Riacho Três Forquilhas Rio Maquiné Conexão entre duas lagoas	MZUEL 7445 MZUEL 7449 MZUEL 7452 MZUEL 8964	KP063096 a 063100	21	93
	Lagoa dos Patos - PAT	Rio Forquetinha Arroio Contagem Arroio Teixeira Rio Camaquã Chuí – Riacho sem nome Arroio Velhaco Arroio Santa Isabel Arroio Carmelita Agudo – Riacho sem nome Caraá – Riacho sem nome	MZUEL 6033 MZUEL 7448 MZUEL 7450 MZUEL 7453 LBP 14517 UFRGS 13819 UFRGS 12499 UFRGS 13605 LBP 14547 LBP 14459	KP063101 a 063105	35	82
<i>Microglanis sp.</i>	Uruguai	Rio Negro Margem BR 290, Km 10 Arroio Putiá Rio Inhandava	UFRGS 14654 UFRGS 11931 LBP 13151 LBP 13088	KP 063066 KP 063063 a 063065 KP 063059 a 063062	09	-
<i>M. parahybae</i>	Parafba do Sul	Rio Macabu	LBP 10741	KP 0603106 a 063110	05	-
<i>M. garavelloii</i>	Alto Rio Paraná	Alto Rio Paraná	LBP 10562, 10561, 1193, 22539 e 22540	JN 989032 e GU 701443, 701629, 701627 e 701626	05	-
<i>M. leptostriatus</i>	São Francisco	Rio São Francisco	DCC 00611 a 00615	HM 405152, 405154 a 405157	05	-
<i>M. poecilus</i>	Rio Tapajós	Igarapé montanha Igarapé Urubutu	LBP 14085 LBP14226	-	02	-
<i>Pseudopimelodus aff. pulcher</i>	Alto Rio Paraná	-	LBP 37226	GU 701444	01	-
<i>Pseudopimelodus aff. pulcher</i>	Araguaia	-	LBP 1567	EU 179812	01	-
<i>Pseudopimelodus charus</i>	-	-	DCC 13715	HM 405014	01	-
<i>Batrochoglanis villosus</i>	-	-	UFAM_CTGA 14497	KP 772594	01	-
<i>Batrochoglanis raninus</i>	-	-	LBP 1777	EU 179809	01	-

<i>Cephalosilurus apurensis</i>	-	-	LBP 3034	EU 179818	01	-
<i>Lophiosilurus alexandri</i>	-	-	DCC 00373	HM 405152	01	-
TOTAL					193	542

Microsatélites

Amplificação e genotipagem

Foi realizada a amplificação utilizando-se os marcadores microsatélites desenvolvidos por Souza-Shibatta *et al.* (2013) em 542 indivíduos de *Microglanis cottoides*. Foram amplificados 10 *loci*, os quais apresentaram polimorfismos. A Tabela 2 sumariza as principais características dos *loci* utilizados.

Tabela 2. Características dos 10 *loci* microsatélites desenvolvidos por Souza-Shibatta *et al.* (2013), utilizados no presente estudo.

<i>Loci</i>	Repetições <i>motif</i>	Sequências dos <i>Primers</i> (5'-3')	Ta(°C)	Tamanho (pb)
Mcot2	(AC) ₉	F: AACTGCCTGCAAAACAACC R: TTACCCTGACAACCAGCTCAC	54	110 - 126
Mcot3	(TG) ₁₆	F: AGCCCAATCTGTCTGAGAGC R: ATCATCACCACGTGGAACAC	54	183 - 221
Mcot4	(TG) ₁₈	F: AGCGGCTGTAATAGGCTGTG R: CGGCTGTTCTTCCTTTACAG	48	159 - 211
Mcot5	(GTAAAA) ₃	F: CGTTGAAGAGTAACACAGACGTG R: AAGCGGAGGTTCAATTTTCG	54	126 - 132
Mcot6	(GT) ₁₀	F: TTCACTCAAGAGGCAGCTGTAG R: ACCGTGTTTCGTCGCTAATG	48	245 - 245
Mcot7	(GT) ₇	F: TCATGATGGCGACTGAACTC R: TTATTGCGTGTGCTTTCTGG	54	127 - 183
Mcot8	(AC) ₁₉	F: CGCAGCACACCAGACTTATG R: TCATGGGTAACGACACCAAG	54	156 - 204
Mcot10	(ATGA) ₆	F: GTGGGATCCGGATTAACCTC R: AAATAACAGGAAAGTTTTTATCCACTC	48	118 - 138
Mcot11	(GT) ₅	F: TCATTTGGAACCAGGACTCTG R: GGAATCGAACCCATGAACTC	54	165 - 188
Mcot12	(ATGA) ₆	F: GTGGGATCCGGATTAACCTC R: CCGTCAGTATGTCAGTCAGTCAG	60	166 - 182

Para esta técnica, os *primers forward* foram modificados recebendo na extremidade 5' uma sequência adicional, denominada cauda M13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'). Esta sequência também foi sintetizada de forma independente com três fluoróforos (FAM, HEX e NED), funcionando como um terceiro *primer*, de acordo com metodologia descrita por Schuelke (2000). Essa metodologia elimina a necessidade da marcação dos *primers forward* em todos os

loci. As reações de PCR foram realizadas em 10 µL de volume final contendo 1X GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 10 ng de DNA, 1% glycerol, 0,125 µM do marcador fluorescente (FAM, HEX or NED, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0,125 µM do *primer reverse* e 0,0125 µM do *primer forward*. As amplificações foram submetidas a 94°C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 48 °C (Mcot4, Mcot6 e Mcot10) ou 54 °C (Mcot2, Mcot3, Mcot5, Mcot7, Mcot8 e Mcot11) or 60 °C (Mcot12) por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto) e uma extensão final de 72 °C por 30 minutos. Para a genotipagem, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese automática no sequenciador ABI PRISM 3500-XL (Applied Biosystems) e o marcador GeneScan 600 Liz (Applied Biosystems) foi usado como padrão de peso molecular.

Análise dos dados

Para a identificação de possíveis erros de genotipagem devido à presença de *stutters* (pequenas alterações no tamanho dos alelos durante o PCR), *allele drop-out* (quando alelos maiores não amplificam tão eficientemente quanto alelos menores) e alelos nulos (quando um ou mais alelos falham ao amplificar), foi utilizado o programa GENEMARKER V.1.85 (demo version) (SoftGenetics, State College, PA).

Diversidade e identidade genética

A diversidade genética nuclear foi calculada para cada população considerando o número de alelos por *locus* (A), média de alelos por *locus* (\bar{N}_A), número de alelos privados (N_P), heterozigosidade observada (H_o) heterozigosidade esperada (H_e) e taxas de endogamia (F_{IS}) através do programa POPGEN v. 1.31 (Yeh et al., 2000). O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e o desequilíbrio de ligação foram testados no program GENEPOP v.1.2 (Raymond & Rousset 1995). O valor de p foi ajustado pela correção sequencial de Bonferroni (Rice 1989).

The software GenAlEx v.6.41 (Peakall and Smouse, 2006) foi usado para calcular a identidade genética e o número de alelos compartilhados pelas populações.

Estrutura populacional

Para verificar se as populações estavam realmente estruturadas em populações distintas ou se todos os indivíduos faziam parte de uma única metapopulação foi utilizado o software STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) que define o número de populações geneticamente diferenciadas em uma amostra total, e simultaneamente associa os indivíduos às suas populações fonte. Nesta análise foi testada a possibilidade de existência de até 10 populações diferenciadas ($K= 1-10$), estimado pelo modelo log-likelihood ($\log (P(X/K))$) (Falush *et al.* 2003) e pelo método proposto por Evanno *et al.* (2005). Para cada K foram realizadas 20 corridas independentes, a fim de averiguar a consistência dos dados, de acordo com Evanno et al. (2005), com 500.000 interações no *burn-in* e 1.000.000 interações na Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC). Foi utilizado o modelo de mistura que assume que os indivíduos podem ter ascendência mista, com contribuições genotípicas de diferentes populações (Pritchard *et al.* 2000), sem a utilização de informações prévias de origem geográfica.

A AMOVA (Excoffier *et al.* 1992), realizada com auxílio do programa ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.* 2000), foi utilizada para testar a significância da variabilidade encontrada dentro e entre as populações amostradas. Essa análise utiliza as informações de uma matriz de distância entre as sequências para medir dois componentes da variância total que são: (1) o número de mutações entre as diferentes populações e (2) o número de mutações entre os diferentes haplótipos de cada população. Esses componentes são então utilizados para o cálculo dos índices de fixação (Φ_{ST}), parâmetro semelhante ao F_{ST} de Wright, que incorpora além das análises de variância das frequências gênicas, a informação do número de mutações entre os haplótipos (Weir & Cockerham 1984). Por se tratar de uma análise hierárquica, é possível

agrupar os indivíduos dentro de populações e as populações dentro de grupos, determinando, dessa maneira, a estrutura a ser testada (Schneider *et al.* 2000). Para testar se todas as populações apresentam-se isoladas, mantivemos as nove populações como distintas. Assim, primeiramente foram testadas as diferenças dentro e entre as nove populações e, em seguida, essas populações foram divididas em dois grupos (grupo 1: RIB+PAR+GUA+ITA e grupo 2: MAD+ARA+MAM+TRA+PAT), para testar a diferença encontrada entre esses dois grupos.

As estimativas dos índices de Φ_{ST} par a par, que é equivalente ao F_{ST} mas que considera tamanhos desiguais de amostras (Weir & Cockerham 1984), com intervalo de confiança de 95% entre as diferentes populações, foram calculadas também pelo software ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.* 2005). Alternativamente, o programa SMOGD 1.2.5 (Crawford 2010), o qual emprega o estimador de diferenciação genética D_{est} de Jost (Jost 2008) foi usado para acessar a estrutura populacional, uma vez que o F_{ST} tradicional pode ter atributos indesejáveis em algumas situações, quando estimada a partir de marcadores altamente polimórficos, como microsatélites (Jost 2008; Heller & Siegismund 2009). De acordo com Jost (2008), as estatísticas F_{ST} tendem a subestimar os verdadeiros níveis de diferenciação da população em relação ao D de Jost porque eles detectam níveis menores de diferenciação genética em relação ao D_{est} . Nosso conjunto de dados fornece uma oportunidade para comparar essas duas estatísticas. As estimativas de significância foram realizadas com base em 10.000 permutações.

Fluxo gênico

O fluxo gênico pode ser quantificado por meio de medidas diretas, que se refere ao fluxo gênico contemporâneo, e indiretas que são baseadas na estrutura de populações (F_{ST}) e referem-se ao fluxo gênico histórico, ou passado. Estas abordagens, segundo Wilson & Rannala (2003) são complementares e fornecem informações sobre a migração em diferentes escalas de tempo.

A taxa de migração recente entre as populações foi determinada com o uso do software BAYESASS (Wilson & Rannala 2003), por um método Bayesiano que utiliza genótipos multilocus individuais para estimar as taxas de imigração recente (nas últimas gerações) entre as populações. Esse método estima as distribuições de probabilidade posterior de imigrantes e se baseia em cadeia de Markov de Monte Carlo para a estimativa das probabilidades posteriores. Para estimar a taxa de migração histórica entre os pares de populações e o parâmetro Θ foi utilizado o método de coalescência do programa MIGRATE-n 3.2.6 (Beerli & Felsenstein 1999, 2001; Beerli 2004). O número de migrantes por geração (Nm) foi obtido a partir da multiplicação dos valores gerados pelo programa, da taxa de migração “M”, a partir dos valores obtidos de Θ para a população recipiente em cada par de comparações. A análise foi realizada utilizando-se o modelo Browniano, com uma distribuição uniforme e uma taxa de mutação constante entre os *loci*. As estimativas foram geradas usando cadeia de Markov de Monte Carlo (MCMC) com os seguintes parâmetros: método Bayesiano consistindo de 10 cadeias curtas, com 1.000 genealogias, seguido por três cadeias longas com 10.000 genealogias e um *burn-in* de 10.000. O tamanho efetivo das populações, de acordo com os dados de microsatélite, foram estimados a partir da fórmula $N_e = \Theta / 4M\mu$, com uma taxa de substituição de 10^{-4} (Whitaker *et al.* 2003; Hedrick, 2005)

Citocromo Oxidase I (COI)

Amplificação e sequenciamento

Um segmento de aproximadamente 620 pb da extremidade 5' do gene mitocondrial da citocromo oxidase I (COI), denominado região *barcoding*, foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os *primers* FishF1 5'T C A A C C A A C C A C A A A G A C A T T G G C A C-3' e FishR1-5'T A G A C T T C T G G G T G G C C A A A G A A T C A-3' (Ward *et al.* 2005). A PCR foi realizada em volumes de 15 μ L, com 7,5 μ L com 1X de GoTaq

Green Master Mix (Promega), 0,15 µL dos primers FishF1 e FishR1 (20 mM), 2,0 µL de molde de DNA (5 ng) e 5,2 µL de água ultrapura. A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de 95 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos e 54 °C durante 30 segundos e 72 °C durante 1 minuto, e uma extensão final a 72 °C durante 10 minutos. Após a amplificação, os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% (2µL de amostra/2µL ficol+azul de bromofenol) e corados com SYBR® Safe DNA gel stain (Life Technologies). Após visualização do produto amplificado, o restante foi purificado com a adição de 0,5 µL de ExoSAP IT® (Prodinol Biotecnologia SA) e sequenciado. As duas fitas foram sequenciadas em reações independentes, de acordo com as recomendações de Hajibabaei *et al.* (2005), utilizando o Big Dye Terminator v 3.1 kit (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante, com a leitura subsequente em um sequenciador automático ABI Prism 3500-XL (Applied Biosystems).

Análise dos dados

A análise da qualidade das sequências de ambas as fitas, *forward* e *reverse*, e geração da sequência consenso foi realizada utilizando o aplicativo on-line *Electropherogram Quality Analysis* (Togawa & Brígido 2003) acessado em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. A avaliação dos consensos foi realizada manualmente usando o programa DNA Baser v. 3.5.5.216 (Heracle Biosoft SRL, Romênia, <http://www.DnaBaser.com>). Em seguida, as sequências foram editadas com auxílio do programa Bioedit (Hall 1999) e alinhadas utilizando o aplicativo ClustalW (Thompson 1994) do programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.* 2013). As sequências do COI de *Microglanis cottoides* (dois a cinco indivíduos de cada população, totalizando 38 indivíduos), de *M. parahybae* (cinco indivíduos) e *Microglanis* sp. (nove indivíduos) foram submetidas ao GenBank, com um total de 52 sequências.

Distância Genética

As distâncias genéticas intra e interpopulacionais de *Microglanis cottoides* foram determinadas pelo modelo de Kimura 2 Parâmetro (K2P) (Kimura 1980), no programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.* 2013). A definição de espécie foi inicialmente realizada utilizando 2% de divergência como um valor de corte, como empregado em trabalhos utilizando a ferramenta de *barcoding* (Ward 2009; Ward *et al.* 2009; Pereira *et al.* 2011, 2013; Mabragaña *et al.* 2011; Carvalho *et al.* 2011). Para essa análise foram utilizados 167 espécimes de *M. cottoides*.

Análises Filogenéticas e tempo de divergência

Hipóteses filogeográficas e tempo de diversificação para as populações dos espécimes estudados foram estimadas com base nas sequências do gene *COI*, região de *barcoding*, utilizando dois critérios distintos: Máxima Verossimilhança (ML) e Métodos Bayesianos (IB). A reconstrução do método ML foi realizado no programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.* 2013), usando o modelo de substituição GTR+G. O suporte para os nós foi estimado através de 1000 réplicas não paramétricas de *bootstrap* nas buscas feitas com ML. As estimativas do tempo de divergência foram realizadas com o auxílio do BEAST v.2.1.3 (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*) (Drummond & Rambaut, 2015), empregando o método de coalescência (Heled & Drummond 2010), utilizando como calibrante do relógio molecular a datação de um fóssil da família Pseudopimelodidae (*Cephalosilurus* Haseman 1911), que é estimada entre 15,9 a 11,5 milhões de anos (Ma) (Lundberg *et al.* 2010). Nesta análise utilizou-se o relógio relaxado Lognormal não correlacionado, opção que acomoda a possibilidade de taxas independentes de evolução molecular em diferentes ramos (Drummond *et al.* 2007); e o prior Birth Death Model, uma extensão do modelo Yule, que assume que em qualquer ponto no tempo cada linhagem pode sofrer especiação ou extinção. Os dados foram analisados como uma única partição e o modelo evolutivo utilizado foi GTR + I + G, especificado previamente pelo programa

Mrmodeltest 2.3 (Nylander 2004). As análises foram executadas por 100 milhões de gerações amostrando-se uma árvore a cada 10000 gerações. Para essas análises, adicionamos sequências de *M. parahybae*, *Microglanis* sp., *M. garavelloi*, *M. leptostriatus*, *Batrochoglanis raninus*, *B. villosus*, *Pseudopimelodus* aff. *pulcher*, *Lophiosilurus alexandri* e *Cephalosilurus apurensis* (Mees, 1978) como material comparativo, totalizando 200 indivíduos analisados. O pacote BEAST inclui um conjunto de programas que permitem especificar o projeto de análise, processar arquivos de saída e sumarizar e visualizar os resultados. Em conjunto, esses programas permitem uma inferência bayesiana de dados moleculares, incluindo modelos filodinâmicos e estimativa de tempo de divergência (Drummond *et al.* 2012). O programa TRACER v. 1.5 foi usado para assegurar que a amostragem da distribuição posterior tenha alcançado o tamanho efetivo mínimo suficiente (ESS > 200) e para garantir a estimativa significativa dos parâmetros e as médias de idades dos nós foram calculadas através de um *burn-in* de 25 milhões de gerações. As árvores foram sumarizadas, com 25% das árvores iniciais descartadas, e visualizadas usando os programas TREEANNOTATOR 1.5.3 e FIGTREE 1.3.1, respectivamente (Drummond & Rambaut 2007).

Resultados

Diversidade Genética (Microsatélites)

Foram analisadas 542 amostras de *Microglanis cottoides*, provenientes de nove populações, sendo cada população correspondente a uma bacia hidrográfica (Tabela 1). Com exceção do *locus* Mcot 03, que foi monomórfico apenas na amostra da população MAD, os demais *primers* foram polimórficos em todas as populações, apresentando 116 alelos diferentes, com média de 8,6 alelos por *locus* por população. O número de alelos por *locus* variou de um (Mcot 03) até 32 (Mcot 04), enquanto o número de alelos por população variou de 31 (MAD) a 142 (PAT). A amostra de MAD (n=10 ind.) apresentou os menores valores de diversidade genética, como número médio de alelos ($\bar{N}_A= 3,1$), heterozigosidade observada ($H_o= 0,450$) e heterozigosidade esperada ($H_e= 0,472$). De modo diverso, PAT (n=82 ind.) apresentou os maiores índices de diversidade, com os maiores valores de número médio de alelos ($\bar{N}_A= 14,2$). As amostras das populações RIB (n=182 ind.) e PAR (n=62) apresentaram o maior número de alelos privados ($N_P= 12$), enquanto que as amostras de ARA (n=28) e MAM (n=7) não apresentaram alelos privados. O coeficiente de endogamia (F_{IS}), após a correção de Bonferroni, apresentou valores significativos apenas em alguns *loci* para algumas amostras de ITA (n=55) e MAM. Entretanto, para o conjunto de *loci* analisados por amostra não foi evidenciado valores significativos de F_{IS} (Tabela 3).

Tabela 3. Diversidade genética de *Microglanis cottoides* a partir de marcadores microssatélites. N= número de indivíduos analisados, A= total de alelos, \bar{N}_A = média de alelo, N_p = número de alelos privados, H_o = heterozigosidade observada, H_e = heterozigosidade esperada, F_{IS} – coeficiente de endogamia. *valor de $p \leq 0,05$. RIB = Ribeira de Iguape, PAR = Paranaguá, GUA= Guaratuba, ITA = Itapocu, MAD = Madre, ARA = Araranguá, MAM = Mampituba, TRA = Tramandaí, PAT = Lagoa dos Patos.

Populações	N	A	\bar{N}_A	N_p	H_o	H_e	F_{IS}
RIB	182	123	12,3	12	0,582	0,673	0,093
PAR	62	99	9,9	9	0,582	0,673	0,098
GUA	23	52	5,2	6	0,538	0,571	-0,037
ITA	55	83	8,3	7	0,513	0,558	0,040
MAD	10	31	3,1	1	0,450	0,472	-0,026
ARA	28	92	9,2	–	0,680	0,768	0,119
MAM	7	51	5,1	–	0,671	0,736	0,067
TRA	93	106	10,6	5	0,570	0,670	0,151
PAT	82	142	14,2	12	0,673	0,716	0,057
Geral	542	116	8,6	52	0,584	0,648	0,062

Em uma análise mais detalhada da distribuição dos alelos (Tabela 4), observou-se que dos 116 alelos presentes nas populações, 18 foram encontrados somente nas populações RIB, PAR, GUA e ITA (grupamento 1) e nove nas populações MAD, ARA, MAM, TRA e PAT (grupamento 2). Os demais alelos são compartilhados por quase todas as populações, mas apenas um está presente nos dois grupamentos, sendo esse mais frequente no grupamento 1 (3%). Entre os pares de populações, ARA - MAM e RIB - PAR, são os que apresentam maior número de alelos em comum, 19 e 18, respectivamente, entretanto observa-se maior identidade entre as populações PAR - GUA e TRA - PAT.

Tabela 4. Identidade genética de Nei (diagonal superior) e número de alelos compartilhados (diagonal inferior) entre as nove populações de *Microglanis cottoides*.

	RIB	PAR	GUA	ITA	MAD	ARA	MAM	TRA	PAT
RIB		0,553	0,453	0,617	0,332	0,564	0,603	0,429	0,514
PAR	18		0,694	0,532	0,295	0,452	0,417	0,294	0,378
GUA	12	13		0,332	0,247	0,419	0,451	0,202	0,299
ITA	12	10	9		0,257	0,502	0,469	0,521	0,460
MAD	11	9	9	7		0,467	0,476	0,501	0,457
ARA	14	12	11	11	14		0,781	0,702	0,796
MAM	17	13	14	11	14	19		0,610	0,683
TRA	10	10	9	9	11	11	16		0,879
PAT	13	11	10	8	10	13	17	14	

Alguns *loci* mostraram desvios significativos no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), RIB (Mcot10 x Mcot8, Mcot10 x Mcot12 e Mcot10 x Mcot7), PAR (Mcot11 x Mcot3, Mcot11 x Mcot5), ARA (Mcot8 x Mcot11 e Mcot6 x Mcot12) TRA (Mcot10 x Mcot12) e PAT (Mcot10 x Mcot12). Entretanto, após a correção sequencial de Bonferroni, observou-se que apenas alguns *loci* das populações de PAR (Mcot11 x Mcot2 e Mcot5 x Mcot7) e PAT (Mcot10 x Mcot12) estavam efetivamente em desequilíbrio de ligação, pois os demais que apresentaram valores significativos, para o teste de desequilíbrio, foram causados pela presença de alelos nulos.

Segundo a análise de variância molecular (AMOVA) (Tabela 5), foi identificado que a maior fonte de variação está dentro das populações (80,37%), do que entre elas (19,63%). Ainda nesta análise, foi observado que a estimativa do índice de fixação interpopulacional Φ_{ST} (baseado no modelo evolutivo IAM) para todos os grupos foi de 0,1967, valor este suficientemente alto para indicar uma estruturação genética entre as populações. Quando as nove populações são consideradas em dois grupamentos, grupamento 1 (RIB+PAR+GUA+ITA) e agrupamento 2 (MAD+ARA+MAM+TRA+PAT), a variação é menor (12,86%), demonstrando maior similaridade. Entretanto, o Φ_{ST} continua significativo para estruturação populacional.

Tabela 5. Análise da Variância Molecular (AMOVA) para as nove populações de *Microglanis cottoides* (RIB + PAR + GUA + ITA + MAD + ARA + MAM + TRA + PAT) apresentando a porcentagem de variação intra e interpopulacional. # Análise das nove populações divididas em dois grupos: 1 (RIB + PAR + GUA + ITA) e 2 (MAD + ARA + MAM + TRA + PAT). (Φ_{ST}): Índice de fixação interpopulacional. * $p < 0,01$ (teste de significância usando 1000 permutações). RIB = Ribeira de Iguape, PAR = Paranaguá, GUA = Guaratuba, ITA = Itapocu, MAD = Madre, ARA = Araranguá, MAM = Mampituba, TRA = Tramandaí, PAT = Lagoa dos Patos.

Fonte de variação	Porcentagem de variação	Φ_{ST}
Entre nove populações	19,63	0,1967*
Dentro das nove populações	80,37	
# Entre os dois grupos	12,86	0,1286*
# Dentro dos dois grupos	87,14	

Nas análises par a par (Tabela 6), foi possível identificar, aplicando-se os estimadores Φ_{ST} e D_{est} , que os maiores valores de diferenciação genética foram observados na comparação entre as amostras de GUA e MAD ($\Phi_{ST} = 0,4290 / D_{est} = 0,744$) e de ITA e MAD ($\Phi_{ST} = 0,4142 / D_{est} = 0,736$), e os menores valores entre ARA e MAM ($\Phi_{ST} = 0,0408 / D_{est} = 0,106$) e TRA e PAT ($\Phi_{ST} = 0,0514 / D_{est} = 0,111$). Nota-se, em todos os casos, que o equivalente estimador de diferenciação D_{est} indicou um nível superior de diferenciação entre as populações, em relação ao Φ_{ST} .

Tabela 6. Diferenciação genética par a par entre populações de *Microglanis cottoides*, utilizando 10 *primers* de microssatélites, envolvendo 542 indivíduos. Diagonal inferior, valores de Φ_{ST} (parâmetro baseado nas estatísticas F de Wright), e diagonal superior, D_{est} (parâmetro de Jost). Após a correção sequencial de Bonferroni, os resultados de $p < 0,05$ foram significativos para estruturação genética para as duas análises. RIB = Ribeira de Iguape, PAR = Paranaguá, GUA = Guaratuba, ITA = Itapocu, MAD = Madre, ARA = Araranguá, MAM = Mampituba, TRA = Tramandaí, PAT = Lagoa dos Patos.

Populações (N)	RIB	PAR	GUA	ITA	MAD	ARA	MAM	TRA	PAT
RIB (182)		0,440	0,544	0,387	0,669	0,421	0,334	0,567	0,480
PAR (62)	0,1732		0,294	0,466	0,701	0,536	0,538	0,701	0,616
GUA (23)	0,2332	0,1608		0,661	0,744	0,580	0,513	0,795	0,700
ITA (55)	0,1748	0,2372	0,3540		0,736	0,505	0,501	0,477	0,544
MAD (10)	0,2995	0,3448	0,4290	0,4142		0,542	0,496	0,495	0,547
ARA (28)	0,1343	0,1923	0,2345	0,2169	0,2493		0,106	0,282	0,176
MAM (7)	0,1054	0,2081	0,2437	0,2351	0,2849	0,0408		0,328	0,242
TRA (93)	0,2069	0,2724	0,3308	0,2194	0,2623	0,1089	0,1330		0,111
PAT (82)	0,1663	0,2267	0,2774	0,2267	0,2600	0,0623	0,0884	0,0514	

A representação gráfica da análise dos grupamentos bayesianos (STRUCTURE), entre as nove populações, demonstrou a formação de dois *clusters* ou grupamentos ($K= 2$) evidenciando que as populações RIB, PAR, GUA e ITA (em verde) são mais semelhantes geneticamente entre si, assim como as populações de MAD, ARA, MAM, TRA e PAT (em vermelho) (Figura 2A). Entretanto, quando estes dois grupamentos são analisados separadamente, a análise detecta a formação de três *clusters* ($K= 3$) dentro de cada um destes dois grupos maiores (Figura 2B e C). Estes resultados evidenciam uma clara disjunção filogeográfica entre estes dois grupamentos, ao sul de Santa Catarina (Figura 2D).

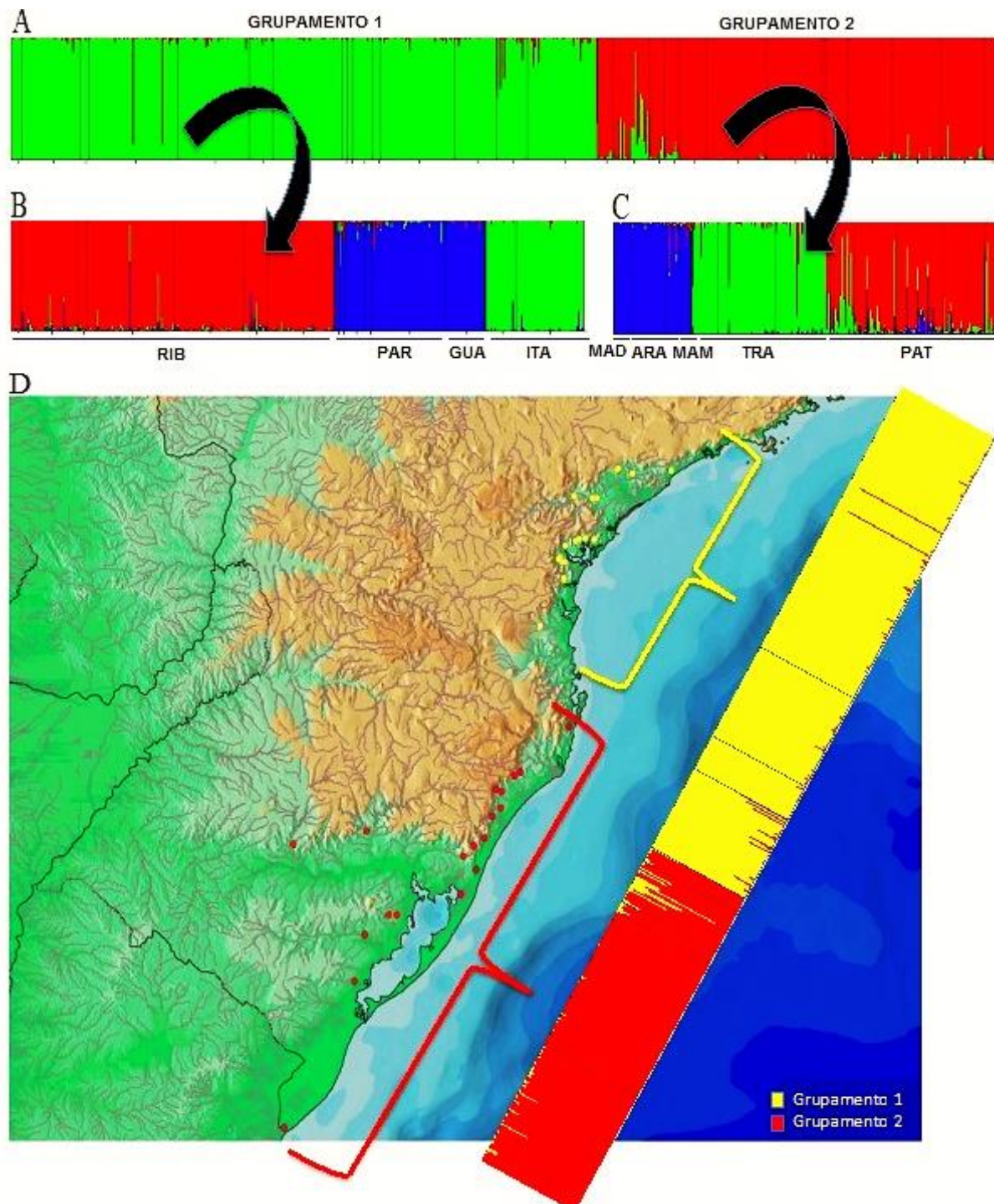


Figura 2. Representação gráfica da análise de agrupamentos bayesianos (STRUCTURE). Em A, a partir da análise entre as nove populações ($K = 2$) de *Microganis cottoides*; em B, entre as populações do grupamento 1 (RIB = Ribeira de Iguape, PAR = Paranaguá, GUA = Guaratuba e ITA = Itapocu); em C, entre as populações do grupamento 2 (MAD = Madre, ARA = Araranguá, MAM = Mampituba, TRA = Tramandaí e PAT = Lagoa dos Patos); e em D, mapa com representação gráfica, evidenciando a quebra filogeográfica ao sul de Santa Catarina.

As maiores estimativas de fluxo gênico histórico, apresentado pelo programa MIGRATE-n, foram observadas entre as amostras PAT x TRA ($Nm \cong 25$) e RIB x PAR ($Nm \cong 22$). Observa-se, ainda, um alto número de migrantes bidirecional, principalmente entre as populações PAT, TRA, MAM e ARA, variando de $Nm \cong 13,8$ a 25 migrantes por geração (Tabela 7).

Tabela 7. Fluxo gênico entre as amostras de *Microglanis cottoides*, estimados a partir do programa MIGRATE-n. Estimativa de Máxima Verossimilhança da taxa de migração M ($M = m/\mu$). RIB = Ribeira de Iguape, PAR = Paranaguá, GUA= Guaratuba, ITA = Itapocu, MAD = Madre, ARA = Araranguá, MAM = Mampituba, TRA = Tramandaí, PAT = Lagoa dos Patos.

Pop	Θ xN m μ	M [m/ μ] [população de onde os migrantes são provenientes]								
		RIB	PAR	GUA	ITA	MAD	ARA	MAM	TRA	PAT
RIB	0,7090	-	21,959	1,682	3,979	3,019	4,138	1,896	2,830	2,965
PAR	0,8900	22,419	-	5,029	4,918	2,93	2,294	1,907	2,265	1,077
GUA	0,6274	1,293	3,176	-	1,152	1,995	1,658	2,475	0,449	1,546
ITA	0,7593	1,944	3,408	1,757	-	2,608	0,346	1,996	1,943	1,437
MAD	0,3664	2,461	2,864	3,759	4,208	-	2,058	5,817	2,998	2,909
ARA	1,3265	1,923	1,802	1,559	1,519	1,964	-	5,526	2,227	2,895
MAM	0,3363	1,857	1,816	3,496	0,531	5,618	9,510	-	14,908	19,331
TRA	0,2186	3,488	4,021	1,453	2,519	1,163	3,391	15,743	-	25,090
PAT	1,0320	3,772	0,936	1,445	1,658	1,845	7,595	13,826	18,266	-

Um fluxo gênico recente (Tabela 8), apresentado pelo programa BYESASS, foi identificado nas populações de ITA, MAD, MAM, TRA e PAT, sendo a população de ARA a que contribuiu com maior porcentagem de migrantes, principalmente para as populações de MAD ($\cong 22\%$) e MAM ($\cong 18\%$). Entretanto, observa-se que a população de ARA tem ausência de migrantes, bem como RIB, PAR e GUA.

Tabela 8. Média da distribuição dos indivíduos não migrantes e migrantes para as nove populações de *Microglanis cottoides*, com nível de confiança de 95%. RIB = Ribeira de Iguape, PAR = Paranaguá, GUA= Guaratuba, ITA = Itapocu, MAD = Madre, ARA = Araranguá, MAM = Mampituba, TRA = Tramandaí, PAT = Lagoa dos Patos.

Populações	Não-migrantes		Migrantes
RIB	99,4%		-
PAR	99,4%		-
GUA	98,7%		-
ITA	92,7%	←←	5,5% (ARA)
MAD	69,5%	←←	22,4% (ARA)
ARA	98,9%		-
MAM	70,4%	←←	18,4% (ARA)
TRA	93,4%	←←	5,7% (PAT)
PAT	97,1%	←←	2,0% (TRA)

Distância genética (COI- região *barcoding*)

A distância K2P, dentro das populações das nove bacias (Tabela 9), variou de 0,000 a 0,004, enquanto que entre estas a variação foi de 0,000 a 0,018. As menores variações observadas foram entre PAR, GUA e ITA, que não ultrapassam a 0,1%, e entre PAT, TRA e MAM, ficando em 0,5%. Observa-se que, à medida em que as bacias vão se distanciando, de norte para o sul, há um aumento gradativo nas distâncias genéticas. Entretanto, nota-se que a partir de ARA, há um aumento considerável nas divergências genéticas em comparação ao grupamento 1 (definido pelo programa Structure, com base nos marcadores microsatélites), sendo TRA a população que possui as maiores distâncias, variando de 1,5 a 1,8%.

Tabela 9. Divergência genética (K2P) entre populações de *Microglanis cottoides*, a partir de sequências do gene mtDNA COI, região *barcoding*. Envolvendo 167 indivíduos. RIB = Ribeira de Iguape, PAR = Paranaguá, GUA= Guaratuba, ITA = Itapocu, MAD = Madre, ARA = Araranguá, MAM = Mampituba, TRA = Tramandaí, PAT = Laguna dos Patos. N (número de indivíduos analisados).

Populações (n)	RIB	PAR	GUA	ITA	MAD	ARA	MAM	TRA	PAT
RIB (n= 182)									
PAR (n= 62)	0,007								
GUA (n= 23)	0,006	0,001							
ITA (n= 55)	0,007	0,001	0,000						
MAD (n= 10)	0,010	0,007	0,006	0,007					
ARA (n= 28)	0,016	0,014	0,013	0,013	0,008				
MAM (n= 07)	0,016	0,014	0,013	0,013	0,006	0,007			
TRA (n= 93)	0,018	0,015	0,015	0,015	0,008	0,012	0,005		
PAT (n=82)	0,015	0,012	0,012	0,012	0,005	0,009	0,005	0,005	

As árvore de Máxima Verossimilhança (ML) (Fig. 3) e Bayesiana (IB) (fig. 4), demonstraram que as populações de *Microglanis cottoides* formam um grupo monofilético, tendo como grupo-irmão *M. parahybae*, igualmente de drenagens costeiras. Observou-se também que, entre as espécies do escudo brasileiro, *M. garavelloii* – do Alto rio Paraná e *Microglanis* sp. - do rio Uruguai são filogeneticamente mais próximas das espécies litorâneas. Foram observados altos valores de *bootstrap* para a maioria dos nós, evidenciando um forte suporte dos clados. Entretanto, as populações de *M. cottoides* apresentam baixo suporte de *bootstrap* (Figura 3).

Os resultados das estimativas do tempo de divergência entre os dois filogrupos de *Microglanis cottoides*, com base na datação do fóssil, indicaram que o(s) evento(s) que envolveu(ram) a separação em dois clados, ocorreu há 1,8 milhão de anos, em média, antes do presente. Probabilidades posteriores indicaram alto apoio na maioria dos nós dentro de Pseudopimelodidae (Figura 4).

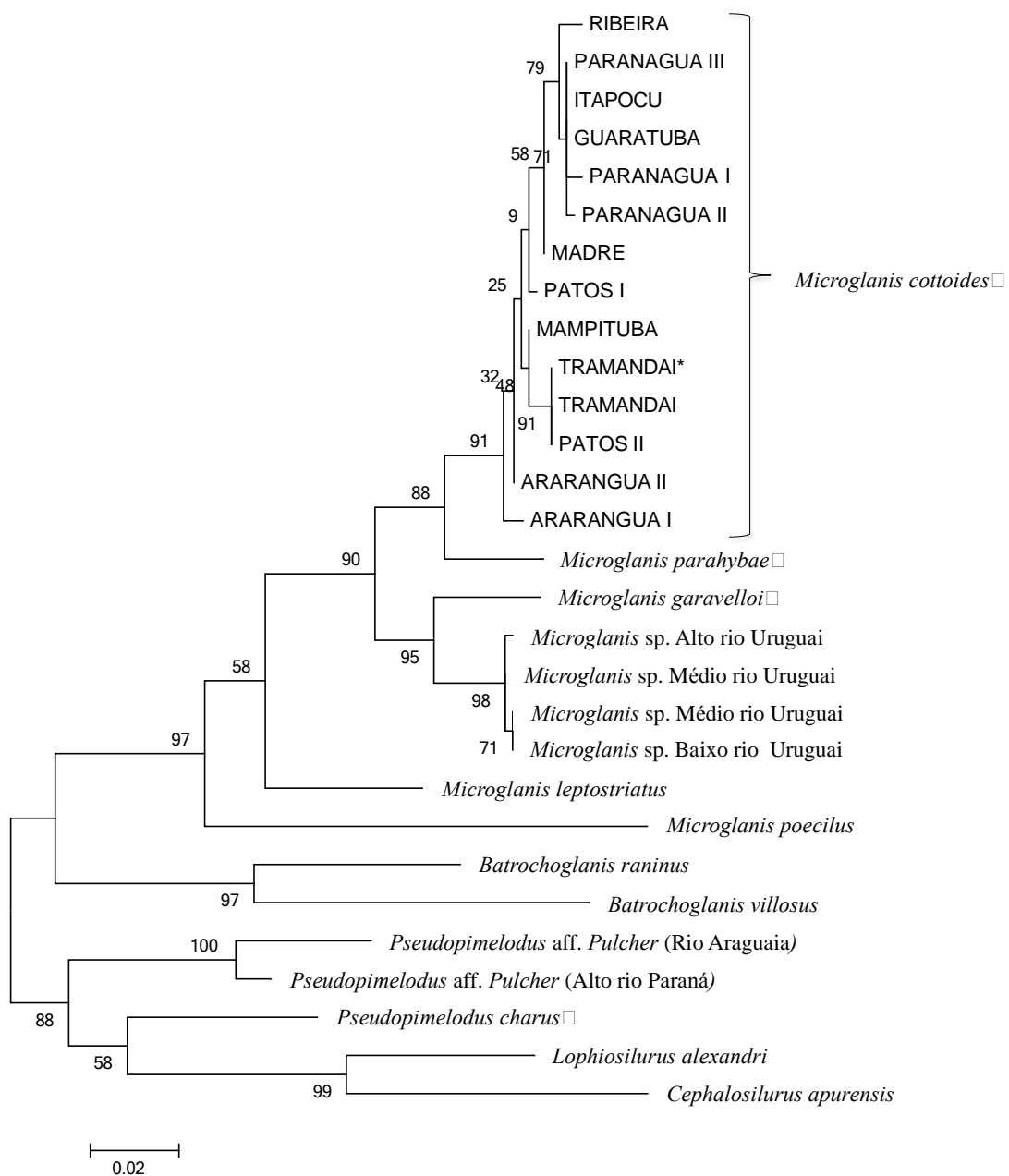


Figura 3. Árvore de Máxima Verossimilhança (ML), obtida a partir de um segmento de 620 pb do gene mitocondrial *COI*, região *barcoding*. Os valores de *bootstrap* são mostrados nos nós.

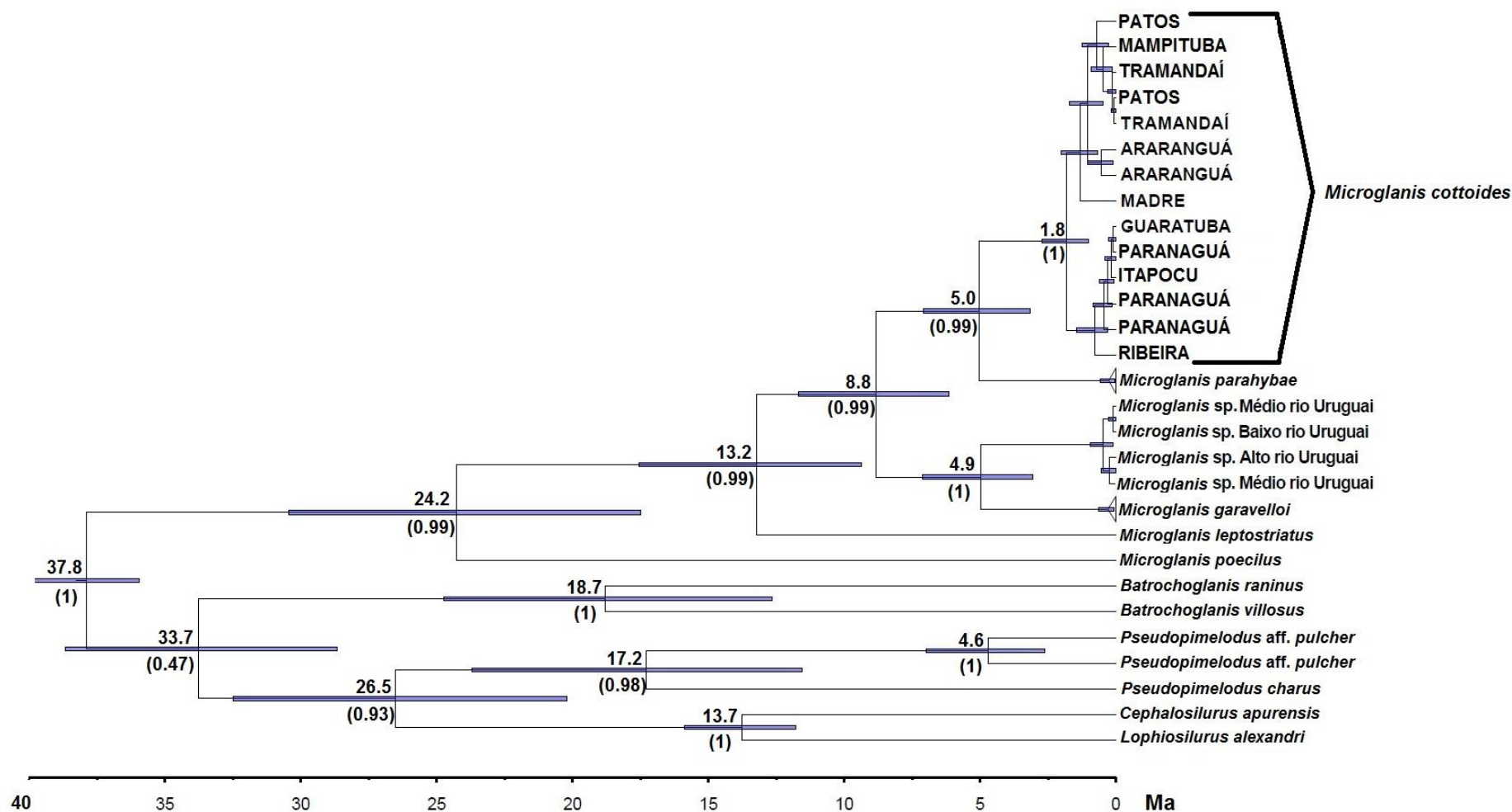


Figura 4. Árvore Bayesiana inferida pelo gene mitocondrial *COI*, a partir de 620 pares de bases da região *barcoding*, utilizando o programa BEAST. Calibração do relógio molecular com a taxa de mutação do fóssil *Cephalosilurus* (15,9 a 11,5 Ma), segundo Lundberg et al. (2009). Os números entre parênteses indicam os valores das probabilidades posteriores e os demais valores referem-se as idades dos nós. A barra azul corresponde ao intervalo de confiança de 95%. Análise com 100 milhões de gerações.

Discussão

Os níveis de variação genética observados em *M. cottoides* ($H_e = 0,472-0,768$), estão dentro do esperado quando comparado com outras espécies de Siluriformes ($H_e = 0,055-0,861$ (Abreu *et al.* 2009) e $0,310-0,942$ (Pereira *et al.* 2009). De forma geral, a diversidade genética encontrada nas populações de *M. cottoides* foi alta e semelhante ao que geralmente é encontrada em populações de peixes selvagens (Martins *et al.* 2003; Pereira *et al.* 2009; Garcez *et al.* 2011), apesar das populações de MAD e MAM apresentarem \bar{N}_A abaixo do esperado. Porém, este fato pode ser atribuído ao pequeno número amostral dessas populações avaliadas na análise, pois segundo Hale *et al.* (2012) para detectar mais de 95% da variação é preciso que o tamanho amostral seja de 25 a 30 indivíduos.

A diversidade genética mantida dentro e entre populações ocorre em função de eventos históricos e processos evolutivos recentes e os nossos resultados demonstram que apesar da maior fonte de variação estar dentro das populações (80,37%), que pode indicar falta de estruturação geográfica (Excoffier *et al.* 1992), o valor global do índice de fixação interpopulacional ($\Phi_{ST} = 0,1967$) é considerado alto segundo Wright (1965). Nas análises par a par, alguns valores ainda mais elevados foram detectados para diversos pares de populações, indicando forte estruturação genética entre estes, principalmente entre PAR, GUA e ITA. Entretanto, menor estruturação (moderada) foi encontrada entre ARA e MAM, e entre TRA e PAT, indicando maior possibilidade de fluxo gênico entre essas populações, e conseqüentemente, maior similaridade entre estas. As estimativas de diferenciação genética reveladas pelo estimador Φ_{ST} se mostraram fortemente corroboradas pelas análises de D_{est} , estimador de Jost (2008). Os maiores valores encontrados eram de fato esperados para esse estimador, uma vez que o mesmo tem sido proposto para estudos populacionais com marcadores microssatélites, por se revelar mais adequado para estimativas de diferenciação genética com marcadores altamente variáveis, como é o caso dos microssatélites (Jost, 2008).

Em diversos estudos com peixes, que fizeram uso de ambos os estimadores, os valores de D_{est} foram usualmente mais acentuados (Ribolli *et al.* 2012; Henriques *et al.* 2014; Ferreira *et al.* 2015).

A estruturação genética de populações naturais de peixes de água doce é um fato frequentemente evidenciado, muitas vezes influenciado por fatores geológicos e comportamentais (Allan & Flecker 2003). De modo distinto, altas taxas de diversidade genética podem sugerir heterogeneidade ambiental e grande tamanho populacional (Nei 1987). Assim, as investigações sobre os mecanismos envolvidos no processo de estruturação genética nas populações de *Microglanis cottoides* são importantes porque a variação genética pode refletir como esta espécie reagiu e se adaptou a um ambiente em transformação.

A taxa de migração depende de vários fatores como, por exemplo, do número de populações que se encontram dentro da região, da distribuição geográfica, da distância entre elas e da habilidade de dispersão da espécie (Frankham *et al.* 2002). Contudo, considerando a distância geográfica e principalmente o isolamento das bacias costeiras, provavelmente desde o período da transgressão marinha Flandriana, que ocorreu entre 6.500 a 17.000 anos antes do presente (Suguió, 2010), a similaridade entre populações de *M. cottoides* sugere fluxos gênicos históricos, refletindo um período em que as bacias estavam conectadas. Esta hipótese pôde ser testada e confirmada pela migração histórica observada entre todas as populações, com valores mais altos entre RIB e PAR e entre PAT, TRA, MAM e ARA. Entretanto, além do isolamento histórico também foi detectada migração contemporânea, mais expressivamente da população de ARA para MAD e MAM, sugerindo um possível restabelecimento do fluxo gênico entre estas populações mais recentemente. Estas análises são complementares e, segundo Wilson & Rannala (2003), fornecem informações sobre a migração em diferentes escalas de tempo, possibilitando uma interpretação mais robusta sobre a história de vida da espécie e sua capacidade de ajuste ao meio.

O compartilhamento de uma mesma espécie entre bacias isoladas pode refletir eventos vicariantes recentes como mudanças no curso das drenagens ou captura de rios de uma bacia pela outra, gerados por modificações geomorfológicas (Ribeiro 2006). Ou então, no caso de *Microglanis cottoides*, dispersão longitudinal entre rios costeiros, devido às flutuações do nível do mar no Pleistoceno tardio, principalmente na regressão marinha nos períodos glaciais, que permitiram a comunicação entre drenagens, ao longo da plataforma continental (Weitzman *et al.* 1988; Menezes & Weitzman 1990).

Distribuição entre bacias não conectadas também foi observada em algumas espécies de *Mimagoniates* Regan, 1907, como em *M. microlepis* (Steindachner, 1876), espécie que apresenta uma ampla distribuição nas drenagens costeiras da Bahia (sudeste) ao Rio Grande do Sul (sul do Brasil), bem como no alto rio Iguaçu e na bacia do rio Tibagi (Santana *et al.* 2006), e em *M. inequalis* (Eigenmann, 1911), que ocorre nas drenagens costeiras do Rio Grande do Sul e na bacia do rio Uruguai (Menezes *et al.* 2008). Entretanto, apesar de algumas espécies de peixes ocorrerem tanto nas bacias costeiras quanto nas bacias do planalto adjacente (Ingenito *et al.* 2004; Silva 2004; Lucinda 2005; Oyakawa *et al.* 2005), grande parte da ictiofauna presente nas drenagens da costa oriental brasileira são consideradas exclusivas dessas bacias, com mais de 95% de sua ictiofauna considerada endêmica (Bezerril 1994).

Possivelmente, as bacias costeiras estejam isoladas devido ao atual nível do mar, desde o final do Último Máximo de Glacial (UMG) que, segundo Mangerud *et al.* (2004) durou de 110.000 a 10.000 anos antes do presente. Flutuações do nível do mar ocorridas durante o Quaternário deixaram evidências, como paleocanais e paleovales, na plataforma continental que comprovam a ocorrência de fases de exposição e submersões sucessivas da costa (Abreu & Calliari 2005). Estudos atuais na plataforma continental brasileira evidenciaram presença de paleovales, escavados por antigos leitos fluviais nos estados do Rio Grande do Sul (Abreu & Calliari 2005; Weschenfelder *et al.* 2008; Suguio 2010) e São Paulo (Conti & Furtado 2009).

A presença e a geometria de paleodrenagens na plataforma continental e a posição das drenagens atuais podem representar uma conexão histórica entre elas, como observado nas paleodrenagens correlacionadas aos rios Ribeira de Iguape e Juqueriquerê, ambos no estado de São Paulo (Conti & Furtado 2009).

Com base em estudos da plataforma continental do Rio Grande do Sul, Suguio (2010) sugere que a evolução do nível do mar na costa brasileira teve início durante a última fase transgressiva, entre 17.000 e 6.500 anos antes do presente, e que o nível relativo do mar chegou a ter cerca de 130 metros abaixo do nível atual, com a emersão de uma grande área da plataforma continental, que pode ter chegado a mais de 120 km de extensão e que hoje está submersa, como evidenciado na região de Chuí, no Rio Grande do Sul. Desta forma, feições geomorfológicas associadas à presença de canais fluviais em plataformas continentais podem indicar que as drenagens costeiras, que hoje desembocam diretamente nos oceanos, tinham comunicação com outras drenagens de bacias próximas, permitindo o fluxo da ictiofauna. Esta, talvez, seja uma das explicações bastante plausíveis para a ampla distribuição de *Microglanis cottoides* em drenagens costeiras que hoje estão isoladas.

Entretanto, nota-se que as divergências genéticas, entre os indivíduos das bacias costeiras, vão aumentando à medida que estas vão se distanciando; e observa-se que a partir de MAD, nas bacias ARA e MAM (sul de Santa Catarina) e TRA (norte do Rio Grande do Sul) há um expressivo aumento nestas divergências, motivada por uma quebra filogeográfica de cerca de 1,8 Ma, com intervalo de confiança entre 1,0 – 2,8 Ma, causando a divisão das populações de *M. cottoides* em dois filogrupos (RIB+PAR+GUA+ITA e MAD+ARA+MAM+TRA+PAT), também evidenciado pela análise bayesiana (realizada pelo Structure). Interessantemente, Hirschmann *et al.* (2015) estudando populações de *Cyanocharax itaimbe* Malabarba & Weitzman 2003, presentes nas bacias ARA, MAM e TRA, observaram que a população de ARA divergiu das demais no Pleistoceno, na mesma época de divergência

entre os dois filogrupos de *M. cottoides* (1,6 Ma), evidenciando um evento histórico comum nesta região, que afetou os dois táxons. A comparação dos padrões inter e intraespecíficos a partir de espécies co-distribuídas permite, segundo *Avise et al.* (1987) e *Moritz & Faith* (1998), avaliar como linhagens independentes responderam aos mesmos processos históricos em uma determinada região. Além disso, como esses organismos dependem diretamente de conexões entre rios e bacias para sua dispersão, a história das bacias e sua ictiofauna associada está intimamente ligada à história da paisagem. Assim, a diferenciação das espécies por isolamento geográfico é o reflexo do passado geológico e as mudanças ambientais ocorridas na região (*Avise* 2000, 2009; *Ribeiro* 2006; *Ribeiro et al.* 2013) e o grau de divergência genética entre as populações está fortemente correlacionada com a idade de isolamento físico (*Craw & Waters* 2007).

Outro fato que chama a atenção é que várias espécies de lambaris (*Cyanocharax itaimbe*, *Deuterodon stigmaturus* (*Gomes*, 1947), *Hollandichthys taramandahy* *Bertaco & Malabarba*, 2013, *Odontostoechus lethostigmus* *Gomes*, 1947 e *Mimagoniates rheocharis* *Menezes & Weitzman*, 1990) e de cascudos (*Pareiorhaphis hypselurus* (*Pereira & Reis*, 2002) e *Pareiorhaphis nudulus* (*Reis & Pereira*, 1999) são encontradas, exclusivamente, nessas três bacias (ARA, MAM e TRA), evidenciando uma origem histórica comum dessa ictiofauna (*Malabarba & Isaia* 1992; *Reis & Schaefer* 1999; *Lucena & Lucena* 2002; *Pereira & Reis* 1999, 2002; *Bertaco & Malabarba* 2013; *Hirschmann et al.* 2015).

Apesar de algumas drenagens como Maquiné e Três Forquilhas, pertencentes à bacia TRA, se conectarem nas planícies, próximos de suas fozes, em lagoas como Quadros e Itapeva, tais conexões não representam corredores de dispersão para certas espécies (*Malabarba et al.* 2013). Pelo contrário, atuam como barreiras ao fluxo gênico, como observado em populações de *Cyanocharax itaimbe*, que apresenta uma forte estruturação filogeográfica, causada pelo isolamento de 450 mil anos entre as duas populações (*Hirschmann et al.* 2015). *Malabarba et*

al. (2013) reconhecem diferenças na composição da ictiofauna entre rios e lagoas dessa região e identificam 16 espécies encontradas em rios que nunca foram capturadas nas lagoas, demonstrando que essas espécies estão isoladas dentro dessas drenagens, apesar de fazerem parte de uma mesma bacia.

Diferentemente de Malabarba *et al.* (2013) e Hirschmann *et al.* (2015), nossos resultados demonstram que os riachos de planície e lagoas não representam barreiras para *M. cottoides*, pois esta espécie foi coletada nos dois ambientes, e os indivíduos oriundos dos rios Maquiné e Três Forquilhas não apresentam divergências genéticas. Além disso, os resultados apontam fluxo gênico constante entre as populações dessas duas drenagens, e sugerem que as lagoas assumem papel de corredores de dispersão para *M. cottoides*, há pelo menos 5 mil anos, quando da formação de várias lagoas ao longo da costa, como as Lagoas dos Quadros e Itapeva, devido ao recuo do mar (Schwarzbald & Schafer 1984; Villwock & Tomazelli 1995).

Assim, é provável que a presença de várias lagoas ao longo da costa sul, que se conectam por pequenos canais fluviais presentes na planície, estejam permitindo fluxo gênico recente entre as populações do filogrupo 2, pois observa-se menor estruturação e divergências genéticas entre suas populações, se comparadas ao filogrupo 1. Vale destacar que, apesar de MAD apresentar alta estruturação genética entre as populações do filogrupo 2, ainda assim está alocada neste grupamento devido, provavelmente, à alta porcentagem de migrantes de ARA (22%) nesta bacia, bem como pelo expressivo compartilhamento de alelos com MAM, TRA e PAT.

Com base na divergência de sequências de mtDNA, Avise (2000) caracterizou a estruturação filogeográfica em cinco categorias e dentre essas, as populações de *M. cottoides*, dentro de cada filogrupo, se enquadram principalmente na categoria III, que se refere à linhagens que ocorrem em alopatria, com divergências genéticas menores que 1%. Por outro lado, quando a comparação é entre as populações dos dois filogrupos, a categoria I é mais

evidenciada, que se refere a linhagens que também ocupam áreas geográficas distintas, mas com divergências superiores a 1-2%). Segundo Avise (2000), as categorias I e III são as mais comuns entre as espécies de peixes de água doce já analisadas, representando 56% e 14%, respectivamente.

Em complementação ao estudo das populações, as inferências filogenéticas entre táxons proximamente relacionados a *M. cottoides*, podem fornecer informações acerca dos eventos biogeográficos responsáveis pelos processos de diversificação das espécies, de forma que a formulação e o teste de hipóteses gerais sobre a diversidade e diversificação dos peixes neotropicais requerem conhecimento sobre sua filogenia e distribuição no tempo e no espaço (Lundberg *et al.* 1998). Embora seja desejável que mais genes sejam incluídos nas análises filogenéticas, pois a hipótese da história pode refletir somente a história do determinado marcador, e não a história dos organismos (Edwards & Beerli 2000), nossos resultados com a família Pseudopimelodidae corroboram com aqueles obtidos por Sullivan *et al.* (2013), que analisaram vários genes mitocondriais e nucleares. Dessa forma, as relações obtidas neste estudo com o gene COI (região *barcoding*) parecem ser consistentes e adequadas para interpretações biogeográficas.

As análises filogeográficas e filogenéticas demonstraram que as espécies litorâneas, *M. parahybae* e *M. cottoides*, são filogeneticamente mais relacionadas e divergiram a cerca de 5,0 Ma. Já *M. garavelloi*, do Alto Paraná, e *Microglanis* sp., do Rio Uruguai, divergiram dessas espécies do litoral há pelo menos 8,0 Ma. Nossos resultados concordam com Weitzman & Weitzman (1982) e Lundberg (1997), os quais sugerem que a diversificação de peixes até o nível de espécies modernas antecede o Pleistoceno, bem como com Albert & Reis (2011) que declaram que a maior parte da ictiofauna Neotropical divergiu entre 3,0 e 10 Ma.

O padrão filogeográfico observado das nossas análises sugere uma relação próxima entre os rios que correm para o Atlântico e as terras altas adjacentes do escudo cristalino

brasileiro, como já observado por Ribeiro (2006). Segundo o mesmo autor, padrões biogeográficos exibidos pela ictiofauna de água doce entre as drenagens costeiras do Atlântico e rios de terras altas adjacentes são potencialmente informativos, podendo revelar linhagens filogenéticas, bem como grupos de espécies estreitamente relacionadas. Com base nesses padrões, *Microglanis* se enquadra no padrão biogeográfico em que espécies endêmicas de drenagens costeiras (*M. cottoides* e *M. parahybae*) têm como grupo-irmão espécies do planalto adjacente (*Microglanis* sp. e *M. garavelloii*).

É oportuno destacar que na época da separação entre as espécies litorâneas e as do planalto adjacente, o Rio Uruguai mantinha comunicação com o Alto rio Paraná, que segundo Kullander *apud* Beurlen (1970), só vieram a se separar no Mioceno, quando o Alto rio Paraná tornou-se parte do rio Paraná, por ocasião de erosão em sua cobertura basáltica. Este fato corrobora os nossos resultados, que demonstram a relação filogenética próxima entre *M. garavelloii* do Alto rio Paraná e *Microglanis* sp. do rio Uruguai, assim como justifica que estas duas espécies sejam grupo-irmão das espécies litorâneas. Desse modo, a diferenciação das espécies por isolamento geográfico é o reflexo do passado geológico e das mudanças ambientais ocorridas na região (Avice 2000, 2009; Ribeiro 2006; Ribeiro *et al.* 2013).

A origem de muitas drenagens que hoje correm diretamente para o oceano Atlântico foi por ocasião de atividades tectônicas, no início do Terciário, gerando um complexo sistema de ‘falhamentos’ no escudo cristalino, que culminou em erosões e, subsequentes eventos de captura de cabeceiras, como ocorrido entre os rios Tietê, do Alto rio Paraná, e Paraíba do Sul (Kullander 1983; Castro *et al.* 2003; Ribeiro 2006). Esses eventos foram responsáveis pela distribuição de algumas de suas espécies também em drenagens vizinhas, como Ribeira de Iguape, bem como em drenagens litorâneas menores (Malabarba 1998; Langeani 2007; Serra *et al.* 2007; Maceniuk *et al.* 2011). Provavelmente, esses mesmos eventos permitiram que as espécies de *Microglanis*, que hoje ocorrem no litoral Sudeste-Sul, primeiro divergissem das

espécies do planalto adjacente, do sistema do Alto rio Paraná, e depois, em um episódio mais recente, que provavelmente envolveu a serra do Mar, a diversificação das espécies litorâneas em *M. cottoides*, ocorrendo de São Paulo ao Rio Grande do Sul, e *M. parahybae*, ocorrendo no Rio de Janeiro (Shibatta 2007).

Outras espécies costeiras de planície (*lowland*) com distribuição limitada ao sul do Rio de Janeiro, como *M. cottoides*, são *Cyphocharax santacatarinae* (Fernández-Yépez 1948) (Vari 1992) e *Oligosarcus hepsetus* (Cuvier 1829) (Ribeiro & Menezes 2015). *Cyphocharax santacatarinae* tem sua distribuição ao norte muito próxima aos limites de *M. cottoides*, ocorrendo desde Santa Catarina até São Paulo, no rio Ribeira de Iguape. A partir do rio Paraíba do Sul, no estado de São Paulo, até o rio de Contas, na Bahia, a espécie costeira é *Cyphocharax gilbert* (Quoy & Gaimard 1824) que, segundo Vari (1992), foi confundida com *C. santacatarinae* por muito tempo devido à similaridade morfológica. Entretanto, as relações filogenéticas das espécies de *Cyphocharax* (Fowler, 1906) permanecem desconhecidas, não permitindo extrair qualquer informação com relação às suas histórias biogeográficas. *Oligosarcus hepsetus* apresenta distribuição similar a *C. santacatarinae*, ocorrendo em rios costeiros de Santa Catarina ao Rio de Janeiro e, ao norte dessa distribuição, do Espírito Santo à Bahia, ocorre *O. acutirostris* Menezes, 1987 (Ribeiro & Menezes 2015). Segundo a análise filogenética apresentada por esses autores, *O. hepsetus* (+ *O. longirostris* Menezes & Géry, 1983 do rio Iguaçu) é grupo irmão de *O. acutirostris* (+ *O. menezesi* Miquelarena & Protogino, 1996 do rio Uruguai).

Embora essas relações filogenéticas, não sejam congruentes com àquela observada entre *M. cottoides* e *M. parahybae*, é notória a zona de separação dessas espécies no estado do Rio de Janeiro, justamente no extremo norte da Serra do Mar, onde esta se aproxima da linha de costa. Desta forma, essa região da Serra do Mar possivelmente serviu como um importante divisor de ictiofauna dos rios localizados ao norte e ao sul, sendo que para *M. cottoides* e *M.*

parahybae o tempo estimado da divergência é de aproximadamente 5 Ma. O limite de distribuição sul de *C. santacatarinae* e *O. hepsetus*, em Santa Catarina, parece ser similar ao do filogruppo 1 de *M. cottoides*. Nessa região encontra-se uma parte da Serra Geral que se aproxima da linha de costa o que, como acontece com a Serra do Mar, pode ter restringido a distribuição dessas espécies ou populações em um passado não muito distante na escala geológica.

Portanto, tudo indica que a história filogeográfica de *Microglanis cottoides* envolve eventos vicariantes de origem tectônica como a formação das drenagens costeiras a partir de eventos orogenéticos e, mais recentemente, por eventos climáticos pleistocênicos que isolaram várias populações. Entretanto, ao contrário do que parece ocorrer com espécies mais especializadas em ambientes de cabeceiras como *Cyanocharax itaimbe*, espécies como *M. cottoides* se distribuem amplamente e possivelmente mantêm fluxo gênico em períodos de glaciação, quando as drenagens se encontram, mantendo sua unidade específica, mesmo que sejam separadas nos períodos de interglaciação.

Referências

- Abreu, J. G. N. & Calliari, L. J. (2005). Paleocanais na plataforma continental interna do Rio Grande do Sul: evidências de uma drenagem fluvial pretérita. *Revista Brasileira de Geofísica*, 23(2): 123-132.
- Abreu, M. M., Pereira, L. H. G., Vila, V. B. & Foresti, F. (2009) Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguay River Basin. *Genetic Molecular Biology*, 32: 868-873.
- Albert, J. S. & Reis, R. E. (2011). *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. Berkeley, CA: University of California Press, 388 pp.
- Allan, J. D. & A. S. Flecker. (1993). Biodiversity conservation in running waters. Identifying the major factors that threaten destruction of riverine species and ecosystems. *BioScience*, 43(1): 32-43.
- Almeida, F. S., Pelegrinelli, M. H. & Sodr , L. M. K. (2001). RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi River. *Brazilian Journal of Zoology*, 25(3): 113-120.
- Avice, J. C. (2000). *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press; Cambridge, MA. 447p.
- Avice, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lambt, T., Neigel, J. E., Reeb, C.A. & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Avice, J. C. (2000). *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Cambridge: Harvard University Press.
- Avice, J. C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36: 3-15.
- Berli, P. & Felsenstein, J. (2001). Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 4563-4568.
- Beheregaray, L. B. (2008). Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, 17: 3754-3774.
- Beheregaray, L. B., Sunnucks, P. & Briscoe, D. A. (2001). A rapid fish radiation associated with the last sea-level changes in southern Brazil: the silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proceedings Biological sciences. The Royal Society*, 269: 65-73.
- Bermingham, E. & Martin, A. P. (1998). Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing sharded history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology*, 7: 499-518.

- Bermingham, E. & Avise, J. C. (1986). Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. *Genetics*, 113: 939-965.
- Bertaco, V. A. & Malabarba, L. R. (2013). A new species of the characid genus *Hollandichthys* Eigenmann from coastal rivers of southern Brazil (Teleostei: Characiformes) with a discussion on the diagnosis of the genus. *Neotropical Ichthyology*, 11: 767-778.
- Bizerril, C. R. S. F. (1994). Análise taxonômica e biogeografia da ictiofauna de água doce do leste brasileiro. *Acta Biológica Leopoldensia*, 18(1): 51-80.
- Bizerril, C. R. S. F. A. & Lima, N. R. M. (2000). Levantamento da ictiofauna da bacia do rio Ribeira de Iguape, Brasil. *Acta Biológica Leopoldensia*, 22: 103-110.
- Buckup, P. A. (2011). The eastern Brazilian Shield. In Albert, J. S. & Reis, R. E. (Eds) *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (pp. 203–210). Berkeley, CA: University of California Press.
- Calcagnotto, D. & DeSalle, R. (2009). Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná- Paraguay basin: Evidence from microsatellites. *Neotropical Ichthyology*, 7: 607-616.
- Carvalho-Costa, L. F., Hatanaka, T. & Galetti Jr, P. M. (2008). Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Genetics and Molecular Biology*, 31: 377-380.
- Carvalho, D., Denise, A. A. O., Pompeu, P. S., Leal, C. G., Oliveira, C. & Hanner, R. (2011). Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial DNA*, 22: 80–86.
- Castro, R. M. C., Casatti, L., Santos, H. F., Ferreira, K. M., Ribeiro, A. C., Benine, R. C., Dargis, G. Z. P., Melo, A. L. A., Stopiglia, R., Abreu, T. X., Bockmann, F. A., Carvalho, M., Gibran, F. Z. & Lima, F. T. C. (2003). Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do Rio Parapanema, sudeste do Brasil. *Biota Neotropica*, Campinas, 3(1): 1-31.
- Conti, L. A. & Furtado, V. V. (2009). Topographic Registers Of Paleo-Valleys on the Southeastern Brazilian Continental Shelf. *Brazilian Journal of Oceanography*, 57(1).
- Craw, D. & Waters, J. (2007). Geological and biological evidence for regional drainage reversal during lateral tectonic transport, Marlborough, New Zealand. *Journal of the Geological Society*, 164 :785-793.
- Crawfor, D. N. G. (2010). SMOGD: Software for the measurement of genetic diversity. *Molecular Ecology Resources*, 10: 556-557.
- Drummond, A. J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Heled, J., Kearse, M., Markowitz, S., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., Swidan, F., Thierer, T. & Wilson, A. (2012). Geneious v5.6, Available from <http://www.geneious.com>.

- Drummond, A. J. & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7:214.
- Edwards, S. V. & Beerli, P. (2000). Perspective: Gene divergence, Population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution*, 54(6): 1839-1854.
- Eigenmann, C. H. (1912). The freshwaters fishes of British Guiana, including a study of the ecological grouping of species and the relation of the fauna of the Plateau to that of lowlands. *Memoirs of the Carnegie Museum*. 5: i – xxii + 1-578, pls1-103.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620.
- Excoffier, L., Smouse, P. E. & Quattro, J.M. (1992). Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Ferreira, D. G., Galindo, B. A., Frantine-Silva, W., Almeida, F. S. & Sofia, S. H. (2015). Genetic structure of a Neotropical sedentary fish revealed by AFLP, microsatellite and mtDNA markers: a case study. *Conservation Genetics (Online)*, 16: 151-166.
- Frankham, R., Ballou, J. D. & Briscoe, D. A. (2002) *Introduction to Conservation Genetics*, Cambridge University Press, Cambridge UK, 617 pp.
- Freeland, J. R. (2005). *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex.
- Froufe, E., Alekseyev, S. I., Knizhin, I. & Weiss, S. (2005). Comparative mtDNA sequence (control region, ATPase 6 and NADH-1) divergence in *Hucho taimen* (Pallas) across four Siberian river basins. *Journal of Fish Biology*, 67: 1040-1053.
- Fu Y. X.; Li, W. H. (1999). Coalescing into the 21st century: D_e , an overview and prospects of coalescent theory *Theor. Pop. Biol* 56: 1-10
- Gaggiotti, O. E., Lange, O., Rassmann, K. & Gliddon, C. A. (2002). Comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology*, 8: 1513-1520.
- Garcez, R., Calcagnotto, D. & Almeida-Toledo, L. F. (2011). Population structure of the migratory fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes) from rio Grande basin (Brazil), an area fragmented by dams. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 21: 268-275.
- Géry, J. (1969). The freshwater fishes of South America. In: Fitkau, E. J. (ed), *Biogeography and Ecology un South America* (2: 828-848). Dr. W. Junk. The Hage.
- Hajibabaei, M., Waard, J. R., Ivanova, N.V., Ratnasingham, S., Dooh, R. T., Kirk, S. L. & Hebert, P. D. N. (2005). Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360(1): 1959–1967.

- Hale, M. L., Burg, T. M. & Steeves, T. E. (2012). Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. *PLoS ONE* 7(9): e45170. doi:1371/journal.pone.0045170
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(1): 95-98.
- Hedrick, P. W. (2005). A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 59: 1633-1638.
- Heled, J. & Drummond, A. J. (2010). Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology Evolution*, 27(3): 570-580.
- Heller, R. & Siegismund, H. R. (2009). Relationship between three measures of genetic differentiation G_{ST} , D_{EST} and G'_{ST} : How wrong have we been? *Molecular Ecology*, 18: 2080-2083.
- Henriques, R., Potts, W. M., Santos, C. V., Sauer, W. H. H. & Shaw, P. W. (2014). Population Connectivity and Phylogeography of a Coastal Fish, *Atractoscion aequidens* (Sciaenidae), across the Benguela Current Region: Evidence of an Ancient Vicariant Event. *PLoS ONE* 9(2): e87907. doi:10.1371/journal.pone.0087907
- Hirschmann, A., Malabarba, L. R., Thomaz, A. T., Fagundes, N. J. R. (2015). Riverine habitat specificity constrains dispersion in a Neotropical fish (Characidae) along Southern Brazilian drainages. *Zoologica Scripta*, p. n/a-n/a.
- Ingenito, L. F. S. & Buckup, P.A. (2007). The Serra da Mantiqueira, Southeastern Brazil, as a Biogeographical Barrier for Fishes. *Journal of Biogeography*, 34: 1173–1182.
- JOST, L. (2008). G_{ST} and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology* 17: 4015-4026.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(1330): 111-120.
- Kingman, J. F. C. (1982). *The Coalescent. Stochastic. Processes and their Applications*. North-Holland Publishing Company, 13: 235-248.
- Kullander, S. O. (1983). A revision of the South American cichlid genus *Cichlasoma* (Teleostei: Cichlidae). Swedish Museum of Natural History, Stockholm. 296p.
- Langeani, F., Castro, R. M. C., Oyakawa, O. T., Shibatta, O. A., Pavanelli, C. S. & Casatti, L. (2007). Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica*, 7: 1-17.
- Lucena, C. A. S. & Lucena, Z. M. S. (2002). Redefinição do gênero *Deuterodon* Eigenmann (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia. PUCRS Séries Zoológicas*, 15(1): 113-136.

- Lucinda, P. H. F. (2005). Systematics of the genus *Cnesterodon* Garman, 1895 (Cyprinodontiformes: Poecilidae: Poeciliinae). *Neotropical Ichthyology*, 3(2): 259-270.
- Lundberg, J. G. (1997). Fishes of the Miocene La Venta fauna: additional taxa, biotic and paleoenvironmental implications. In: Kay, R. F., Madden, R. H., Cifelli, R. I. & Flynn, J. J. (ed). *Vertebrate Paleontology in the Neotropics: the Miocene of La Venta, Colombia*. Washington: Smithsonian Institution Press. 592 p.
- Lundberg, J. G., Linares, O., Antonio, M. & Nass, P. (1988). *Phractocephalus hemiliopterus* (Pimelodidae, Siluriformes) from the upper Miocene Urumaco formation, Venezuela: a further case of evolutionary stasis and local extinction among south American fishes. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 8: 131-138.
- Lundberg, J. G., Sabaj-Peréz, M. H., Dahdul, W. M. & Aguilera, O. (2010). The Amazonian Neogene Fish Fauna. In: C. Hoorn, F. Wesselingh, and H. Vonhoff (eds.) *Amazonia, Landscape and Species Evolution. A Look into the Past*. Wiley-Blackwell, Oxford 447 pp.
- Mabraganã, E., Díaz, A. J. M., Hanner, R., Zhang, J. & González, C. M. (2011). DNA Barcoding identifies argentine fishes from marine and brackish waters. *PLoS ONE* 6(12): e28655. doi:10.1371/journal.pone.0028655
- Malabarba, L. R. & Isaia, E. A. (1992). The fresh water fish fauna of the rio Tramandaí drainage, Rio Grande do Sul, Brazil, with a discussion of its historical origin. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia, PUCRS, Série Zoologia*, 5: 197–223.
- Malabarba, L. R. & Mahler–Jr, J. K. F. (1998). Review of the genus *Microglanis* in the rio Uruguay and coastal drainages of southern Brazil (Ostariophysi: Pimelodidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, 9(3): 243-254.
- Malabarba, Luiz R., Carvalho Neto, P., Bertaco, V. A., Carvalho, T. P., Santos, J. F. & Artioli, L. G. S. (2013). *Guia de Identificação dos Peixes da Bacia do Rio Tramandaí*. 1. ed. Porto Alegre: Via Sapiens. v. 1. 140p.
- Mangerud, J., Jakobsson, J., Alexanderson, H., Astakhov, V., Clarke, G. K. C., Henriksen, M., Hjort, C., Krinner, G., Lunkka, J. P., Möller, P., Murray, A., Nikolskaya, O., Saarnisto, M. & Svendsen J. I. (2004). Ice-dammed lakes and rerouting of the drainage of northern Eurasia during the last glaciation. *Quaternary Science Reviews*, 23: 1313–1332.
- Marceniuk, A. P., Hilsdorf, A. W. S. & Langeani, F. (2011). A ictiofauna de cabeceiras do rio Tietê, São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica*, 11(3): 217-236.
- Martins, C., Wasko, A. P., Oliveira, C. & Foresti, F. (2003). Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. *Genetics and Molecular Biology*, 26: 33-38.
- Martins, F. M & Domingues M. V. (2011). Filogeografia. pp. 137-150. In: Carvalho, C. J. B. & Almeida, E. A. B. (Orgs). *Biogeografia da América do Sul: Padrões & Processos*. Roca, São Paulo, 306p.

- Matsumoto, C.K. & Hilsdorf, A. W. S. (2009). Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. *Neotropical Ichthyology*, 7: 395-402.
- Menezes, N.A. (1988). Implications of the distribution patterns of the species of *Oligasarcus* (Teleostei, Characidae) from central and southern South America. In: Heyer, W. R. & Vanzolini, P. E. (Eds). *Proceedings of Workshop on Neotropical Distribution Patterns*. (Pp. 295-304). Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, Rj.
- Menezes, N. A., Ribeiro, A. C., Weitzman, S. H. & Torres, R. A. (2008). Biogeography of Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae) revisited: phylogenetic patterns, historical geology and genetic connectivity. *Zootaxa*, 1726: 33-48.
- Menezes, N. A. & Weitzman, S. H. (1990). Two new species of *Mimagoniates* (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae), their phylogeny and biogeography and a key to the glandulocaudin fishes of Brazil and Paraguay. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 103(2): 380-426.
- Montoya-Burgo, J. I. (2003). Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, 12: 1855-1867.
- Mori, H. & Shibatta, O. A. (2006). A new species of *Microglanis* Eigenmann, 1912 (Siluriformes: Pseudopimelodidae) from Rio São Francisco basin, Brazil. *Zootaxa*, 1302: 31-42.
- Moritz, C., Faith, D. P. (1998). Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology*, 7: 419-429.
- Myers, G. S. (1938). Fresh-water fishes and West Indian zoogeography. *Annual Report Smithsonian*, 1937: 339-364.
- Nei, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, 512 pp.
- Nylander, J. A. A. (2004). MrModeltest v. 2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Oliveira, C., Foresti, F. & Hilsdorf, A. W. S. (2009). Genetics of neotropical fish: From chromosomes to populations. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35: 81-100.
- Oyakawa, O. T., & Menezes, N. A. (2011). Checklist dos peixes de água doce do Estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica*, 11(1).
- Oyakawa, O. T., Akama, A. & Zanata, A. M. (2005). Review of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 from Ribeira de Iguape basin, with descriptions of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Zootaxa*, 921: 1-27.

- Peakall R, Smouse PE (2006) GENEALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Pereira, E. H. L. & R. E. Reis. (1992). *Hemipsilichthys vestigipinnis* sp. n. (Teleostei, Siluriformes) a new loricariid catfish from the rio Uruguay basin, Southern Brazil. *Revue Française d'Aquariologie et Herpetologie*, 18: 111-116.
- Pereira, E. H. L. & R. E. Reis. (2002). Revision of the loricariid genera *Hemipsilichthys* and *Isbrueckerichthys* (Teleostei: Siluriformes), with descriptions of five new species of *Hemipsilichthys*. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 13: 97-146.
- Pereira, L. H. G., Foresti, F. & Oliveira, C. (2009). Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes, Pimelodidae) suggests homing behavior. *Ecology Freshwater Fisheries*, 18: 215-225.
- Pereira, L. H. G., Hanner, R., Foresti, F. & Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics*, 14:20 <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/14/20>
- Pereira, L. H. G., Maia, G. M. G., Hanner, R., Foresti, F. & Oliveira, C. (2011). DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22(1): 71–79.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- QGIS Development Team, 2015. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>
- Raymond, M. & Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.
- Reis, R. E. & Schaefer, S. A. (1998). New cascudinhos from Southern Brazil: systematics, endemism, and relationships (Siluriformes, Loricariidae, Hypoptopomatinae). *American Museum Novitates*, 3254, 1–25.
- Ribeiro, A. C. & Menezes, N. A. (2015). Phylogenetic Relationships of the species and biogeography of the characid genus *Oligosarcus* Günther, 1864 (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). *Zootaxa*, 3949: 41-81,
- Ribeiro, A. C., Jacob, R. M., Silva, R. R. R. S., Lima, F. C. T., Ferreira, D. C., Ferreira, K. M., Mariguela, T. C., Perreira, L. H. G. & Oliveira, C. (2013). Distributions and phylogeographic data of rheophilic freshwater fishes provide evidences on the geographic extension of a central-brazilian amazonian palaeoplateau in the area of the present day pantanal wetland. *Neotropical Ichthyology*, 11: 319-326.
- Ribeiro, A. C. (2006). Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, 4(2): 225-246.

- Ribolli, J., Melo, C. M. R. D. & Zaniboni-Filho, E. (2012). Genetic characterization of the neotropical catfish *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) in the Upper Uruguay River. *Genetics and Molecular Biology*, 35: 761-769.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223–225.
- Sanches, A., Galetti Jr., P.M., Galzerani, F., Derazo, J., Cutilakbianchi, B. & Hatanaka, T. (2012). Genetic population structure of two migratory freshwater fish species (*Brycon orthotaenia* and *Prochilodus argenteus*) from the São Francisco River in Brazil and its significance for conservation. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40: 177-186.
- Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L. (2000). Arlequin: a software for population genetics data analysis user manual ver. 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva, Geneva.
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnologies*, 18: 223-234.
- Schwarzbold, A. & Schäfer, A. (1984). Gênese e morfologia das Lagoas Costeiras do Rio Grande do Sul. *Amazoniana*. IX – 1: 87-104.
- Selkoe, K. A. & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9: 615-629.
- Serra, J. P., Carvalho, F. R. & Langeani, F. (2007). Ichthyofauna of the rio Itatinga in the Parque das Neblinas, Bertioga, São Paulo: composition and biogeography. *Biota Neotropical*, 7(1): <http://www.biotaneotropica.org>.
- Sérsic, A. N., Cosacov, A., Cocucci, A. A., Johnson, L. A., Pozner, R., Avila L. J., Sites Jr., J. W. & Morando, M. (2011). Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society*. 103: 475-494
- Shibatta, O. A. (2003). Family Pseudopimelodidae (Bumblebee catfishes, dwarf marbled catfishes). pp. 401-405. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr. (Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Edipucrs.
- Shibatta, O. A. (2007). Família Pseudopimelodidae. pp. 103-104. In: Buckup, P. A., N. A. Menezes & M. S. Ghazzi (Eds.). *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Rio de Janeiro, Museu Nacional, 195p.
- Shibatta, O. A. (2015). A new species of *Microglanis* (Siluriformes: Pseudopimelodidae) from the upper rio Tocantins basin, Goiás State, Central Brazil. *Neotropical ichthyology*, 12(1): 81-87.
- Silva, F. S. D., Manna-de-Deus, J. R. & Hilsdorf, A. W. S. (2005). The upper reached ichthyofauna of the Tietê River, São Paulo, Brazil: aspects of their diversity and conservation. *Marine, Freshwater, and Wetlands Biodiversity Conservation*, 4: 201-209.

- Sivasundar, A., Bermingham, E. & Orti, G. (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus, Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10: 407-417.
- Souza-Shibatta, L., Ferreira, D. G., Oliveira, C., Almeida, F. S., Shibatta, O. A. & Sofia, S. H. (2013). Development and characterization of microsatellite *loci* of *Microglanis cottoides* (Siluriformes: Pseudopimelodidae) and cross-species amplification. *Neotropical Ichthyology*, 11(3): 581-585.
- Stamatakis A. (2006). RAxML-vi-hpc: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22: 2688–2690.
- Suguio, K. (2010). *Geologia do Quaternário e Mudanças Ambientais*. São Paulo: Oficina de Textos. 408 p.
- Sullivan, J. P., Muriel-Cunha, J. & Lundberg, J. G. (2013). Phylogenetic relationships and molecular dating of the major groups of catfishes of the neotropical superfamily Pimelodoidea (Teleostei, Siluriformes). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 162: 89-110.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12): 2725-2729.
- Thompson, J.D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- Togawa, R. C. & Brigido, M. M. (2003). PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. In 1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology - IcoBiCoBi (p. 1). Ribeirão Preto.
- Tomazelli, L. J., Dillenburg, S. R. & Villwock, J. A. (2000). Late Quaternary geological history of Rio Grande do Sul coastal plain, southern Brazil. *Revista Brasileira de Geociências*, 30: 474-476.
- Turchetto-Zolet, A. C., Pinheiro, F., Salgueiro, F. & Palma-Silva, C. (2013) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America *Molecular Ecology*, 22: 1193–1213.
- Vari, R. P. (1992). Systematics of the neotropical characiform genus *Cyphocharax* Fowler (Pisces, Ostariophysi). *Smithsonian Contributions of Zoology*, 529:137.
- Vázquez-Domínguez, E. (2007). Filogeografía y vertebrados. pp. 441–466. In: Eguiarte, L., Souza, V. & Aguirre, X. (Eds.). *La Ecología molecular de plantas y animales*. INE, Mexico.
- Villwock, J.A., Lessa, G.C., Suguio, K., Angulo, R. J. & Dillenburg, S. R. (2005). Geologia e geomorfologia de regiões costeiras. pp. 94-113. In: Souza, C. R. G., Suguio, K., Oliveira, A. M. S. & Oliveira, P. E (Eds.). *Quaternário do Brasil*. Ribeirão Preto, Hollos.

- Ward, R. D., Zemplak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Herbert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360: 1847–1857.
- Ward, R. D., Zemplak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R. & Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360: 1847–1857.
- Waters, J. M., Rowe, D. L., Apte, S., King, T. M., Wallis, G. P., Anderson, L., Norris, R. J., Craw, D. & BurrIDGE, C. P. (2007). Geological dates and molecular rates: rapid divergence of rivers and their biotas. *Systematic Biology*, 56: 271–282.
- Weir, B. S., Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.
- Weitzman, S. H., Menezes, N. A., Weitzman, M. J. (1988). Phylogenetic biogeography of the *Glandulocaudini* (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distribution of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. pp. 379-427. In: Heyer, W.R. & Vanzolini P. E. (Eds.). *Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns* Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- Weitzman, S. H. & Weitzman, M. J. (1982). Biogeography and evolutionary diversification in Neotropical freshwaters, with comments on the refuge theory. pp. 403-422. In: Prance, G. T. (Ed). *Biological Diversification in the Tropics*: Nova Iorque: Columbia University Press.
- Weschenfelder, J., Corrêa, I.C.S., Toldo Jr., E.E. & Baitelli, R., (2008). Paleocanais como indicativo de eventos regressivos quaternários do nível do mar no Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Geofísica*, 26 (3): 367-375.
- Wilson, G. A., Rannala, B. (2003). Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics*, 163: 1177-1191.
- Wright, S. (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19: 395-420.
- Yeh, F. C., Yang, R., Boyle, T. J. & Xiyan, J. M. (2000). Pop Gene 32. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis, v.1.32. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton.

APÊNDICE

Development and characterization of microsatellite *loci* of *Microglanis cottoides* (Siluriformes: Pseudopimelodidae) and cross-species amplification

Lenice Souza-Shibatta¹, Dhiego Gomes Ferreira², Claudio Oliveira³,
Fernanda Simões de Almeida², Oscar Akio Shibatta¹ and Silvia Helena Sofia^{1,2}

Thirteen microsatellite *loci* were isolated and characterized in *Microglanis cottoides*. Of these, two were monomorphic and 11 were polymorphic. These polymorphic *loci* tested on 24 individuals from a wild population produced a total of 108 different alleles, with levels of variability high, ranging from 2 to 20, with an average of 8.3 alleles per *locus*. The observed and expected heterozygosity ranged from 0.125 to 0.958 and from 0.119 to 0.931, respectively. A high combined probability of paternity exclusion value and a low probability combined genetic identity value obtained show that the set of *loci* described herein displays good suitability for paternity studies and differentiation of *M. cottoides*. Additionally, all thirteen microsatellite primers developed for *M. cottoides* were tested in four other Pseudopimelodidae species and successful cross-species amplification was achieved for the majority of *loci*.

Treze *loci* microssatélites foram isolados e caracterizados em *Microglanis cottoides*. Destes, dois foram monomórficos e 11 foram polimórficos. Estes *loci* polimórficos foram testados em 24 indivíduos de uma população selvagem e produziram um total de 108 alelos diferentes, com níveis de variabilidade alta, variando de 2 a 20, com uma média de 8,3 alelos por *locus*. A heterozigosidade observada e esperada variou de 0,125 a 0,958 e 0,119 a 0,931, respectivamente. Um elevado valor de exclusão de paternidade e um baixo valor de identidade genética foram obtidos, demonstrando que o conjunto de *loci* descritos no presente trabalho exibe boa aplicabilidade no estudo de parentesco e diferenciação populacional em *M. cottoides*. Adicionalmente, os treze primers de microssatélites desenvolvidos para *M. cottoides* foram testados em outras quatro espécies de Pseudopimelodidae e a transferibilidade foi obtida para a maioria dos *loci*.

Key words: Brazilian Eastern basin, Catfish, Enriched genomic library, Genetic marker, SSR.

Introduction

Microglanis Eigenmann 1912, also known as bumblebee catfishes (Shibatta, 2003a), is a genus of small South American catfishes that do not exceed over 110 mm in standard length (Shibatta, 2003a; Shibatta & Benine, 2005). Initially regarded as a member of the pimelodids (Eigenmann, 1912), this genus was subsequently included in the small Pseudopimelodidae family (Shibatta, 2003b), which is considered a monophyletic group (Lundberg *et al.*, 1991).

With 21 valid species described to date (Ruiz & Shibatta, 2011), the genus *Microglanis* is also characterized by its wide

mouth (gape width same as head width), short maxillary barbel (occasionally reaching pectoral-fin origin) and small eye without free orbital margin, among other particular characters (Shibatta, 2003a, 2003b). These small catfishes are widely distributed across South America, occurring from Guyana to the Rio de La Plata basin in Argentina (Shibatta & Benine, 2005; Sarmiento-Soares *et al.*, 2006).

Although our knowledge of the number of *Microglanis* species has increased in the last decade (Shibatta, 2003a, 2003b; Bertaco & Cardoso, 2005; Shibatta & Benine, 2005; Sarmiento-Soares *et al.*, 2006; Alcaraz *et al.*, 2008; Ottoni *et al.*, 2010; Shibatta & Ruiz, 2010; Shibatta & Ruiz, 2011), the

¹Universidade Estadual de Londrina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Centro de Ciências Biológicas, 86051-990 Londrina, PR, Brazil. lenicesouza@hotmail.com (LSS); shibatta@uel.br (OAS)

²Universidade Estadual de Londrina, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, 86051-990 Londrina, PR, Brazil. shsofia@uel.br (SHS)

³Universidade Paulista Júlio Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Departamento de Biociências. Distrito de Rubião Júnior s/n, 18618-970 Botucatu, SP, Brazil.

biology of *Microglanis* still remains poorly known (Shibatta, 2003a). Recently, it has been shown that some species can occur in small populations patchily distributed along the river basins where they are found (Esguicero & Arcifa, 2010). According to these authors, such conditions which may be associated with the progressive environmental degradation of freshwater habitats could represent threats to populations of some *Microglanis* species. Despite this fact, up to this moment population genetic studies involving *Microglanis* species are still lacking.

Among the known species, *Microglanis cottooides* (Boulenger 1891) is especially interesting for phylogeographic and genetic population studies, owing to its geographical distribution in the Brazilian Atlantic Forest, being present in the Uruguay River basin and along the eastern coast of Brazil, with records of their occurrence in drainages across the southern and southeastern regions (Malabarba & Mahler, 1998; Shibatta, 2003b, 2007; Mori & Shibatta, 2006). These regions can be considered of great biogeographical significance, not only for the high degree of endemism of its fish fauna (Bizerril, 1994, 1995), but also for being a very populated area with high environmental degradation due to human activities.

Studies on geographic distribution of genealogical lineages have been widely used to describe historical events, such as habitat fragmentation or expansion of the range of species and populations. These studies also serve to understand migration events, vicariance and extinction of gene lineages, and other processes that affect the population structure or generate speciation in a spatial and temporal context (Avisé, 2001, 2009; Hardy *et al.*, 2002).

A good way to study the genetic structure of natural fish populations is through the use of molecular markers such as microsatellite (SSR-Simple Sequence Repeats) (O'Connell & Wright, 1997). In fact, SSR are considered a class of molecular markers highly polymorphic and useful for population studies (Zane *et al.*, 2002). Therefore, the current work describes 13 SSR markers developed for *Microglanis cottooides* and tests their applicability for four other Pseudopimelodidae species.

Material and Methods

Microsatellites were isolated and characterized following the protocol of Billotte *et al.* (1999), with some minor modifications. Total genomic DNA was extracted from muscle tissue preserved in 95% ethanol. The DNA was isolated according to Almeida *et al.* (2001). Genomic DNA (5 µg) was digested with *RsaI* and the blunt-ended fragments were ligated to the adaptors Rsa 21 and Rsa 25 (Edwards *et al.*, 1996). Fragments were selected with (AGA)₂, (CT)₈ and (GT)₈ probes, and then cloned into the pGem®-T (Promega) vector. Such recombinant plasmids were used to transform the *E. coli* DH5- α lineage. The recombinant clones were selected and sequenced using the BigDye Terminator™ kit (v. 3.1 - Applied Biosystems). Sequencing was performed on an ABI

3500 XL automated sequencer. Sequences were analyzed using BioEdit v.7.0 software (Hall, 1999) and primers were designed using Primer 3 software (Rozen & Skaletsky, 2000). The selected forward primers were labelled with the M13 sequence (5'-TGTAACAACGACGGCCAGT-3') at the 5' end (Schuelke, 2000). The AutoDimer software (Vallone & Butler, 2004) was used to test the potential presence of hairpin structures and primer-dimer problems. The individual genotyping was performed on an ABI 3500 XL automated sequencer.

PCR amplifications were carried out on 24 individuals of *M. cottooides* (MZUEL 7453), collected in the arroio Divisa (30°54'5.6''S 52°05'18.0''W), municipality of Cristal, Rio Grande do Sul State, southern Brazil. Cross-species amplification tests were performed using four other pseudopimelodid species, as follows: *Microglanis cibela* Malabarba & Mahler, 1998 (MZUEL 7452), from the rio Maquiné (Rio Grande do Sul State, 29°37'2.1''S 50°15'51.8''W); *M. garavello* Shibatta & Benine, 2005 (MZUEL 7878), from the Couro de Boi Stream (Paraná State, 23°05'41.4''S 50°59'49.5''W); *M. parahybae* Steindachner, 1880 (LBP 10741), from the rio Paraiba do Sul (Rio de Janeiro State, 22°04'07.8''S 41°54'36.2''W) and *Pseudopimelodus pulcher* Boulenger, 1887 (MZUEL 6039), from rio Laranjinha (Paraná State, 23°24'52.98''S 50°27'8.55''W), using five individuals of each species.

Reactions were performed in 5 µL reaction volume containing 1× GoTaq Master Mix (Promega), 10 ng of template DNA, 1% glycerol, 0.125 µM forward labeled primer (FAM, HEX or NED, Applied Biosystems, CA), 0.125 µM reverse primer, 0.0125 µM forward primer. Amplifications were performed with an initial denaturation step at 94°C for 4 min, followed by 35 cycles at 94°C for 40 s, 48°C, 54°C or 60°C (according to Table 1) for 1 min, 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 30 min. The PCR products were submitted to electrophoresis on an automated sequencer (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer) and the GeneScan 600 Liz (Applied Biosystems) was used as the molecular weight standard.

The individuals were genotyped with the GeneMarker 1.85 software (SoftGenetics, State College, PA) followed by manual checking. Tests for Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) and the presence of linkage disequilibrium among the pairs of loci were calculated using GENEPOP 4.0.10 (Raymond & Rousset, 1995; Rousset, 2008); *P* values were subsequently adjusted applying the sequential Bonferroni correction (Rice, 1989). The software GenAlEx v.6.41 (Peakall & Smouse, 2006) was used to estimate the observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities and the average number of alleles per locus. The paternity exclusion probability (Q) (Weir, 1996), and the genetic identity probabilities (I) (Paetkau *et al.*, 1995) were estimated using Identity 1.0 (Wagner & Sefc, 1999). Estimates of the polymorphic information content (PIC) and potential null alleles were obtained through Cervus v.3.0 (Marshall *et al.*, 1998) and Micro-Checker v.2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) software, respectively. Default settings were used for all tests.

Results

Of 96 clones sequenced, 25 contained microsatellite repeats but only 18 were suitable for primer design and PCR reactions. After testing the different amplification conditions, 13 *loci* were successfully amplified. From these, two were monomorphic and 11 were polymorphic (Table 1).

The eleven polymorphic *loci* produced a total of 108 different alleles, with high levels of variability, ranging from 2 to 20, with an average of 8.3 alleles per *locus*. The observed and expected heterozygosity ranged from 0.125 to 0.958 and from 0.119 to 0.931, respectively. After Bonferroni correction for multiple comparisons, no evidence of linkage disequilibrium between any pair of *loci* examined was observed. Only the *locus* Mcot09 showed significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$). This *locus* showed the presence of null alleles, inferred from excess homozygous genotypes which could explain the observed deviation from HWE. Additionally, the *locus* Mcot08 revealed an excess of homozygotes and the possible presence of null alleles, but did not show any significant deviation from the HWE. It was also observed that the *loci* Mcot08 and Mcot12 were the only ones showing significant values of endogamic coefficient (F_{IS}) (Table 1).

Discussion

A high combined probability of paternity exclusion value (0.999) and a low combined probability of genetic identity value (2.16×10^{-6}) were obtained, showing that the set of *loci* described herein, exhibits good applicability for studies of parentage and population differentiation of *M. cottoides*.

The average PIC was 0.528, ranging from 0.115 to 0.927. According to Botstein *et al.* (1980), PIC values above 0.5 indicate highly informative markers; from 0.25 to 0.50, moderately informative; and below 0.25, slightly informative. Of the 13 *loci* obtained, eight proved to be highly informative (Mcot02, Mcot03, Mcot04, Mcot07, Mcot08, Mcot09, Mcot10 and Mcot12) with PIC values equal to or higher than 0.589; two were moderately informative (Mcot05 and Mcot11) presenting PIC values equal to or higher than 0.337. Only one *locus* (Mcot13) was slightly informative, exhibiting a PIC value equal to 0.115.

All 13 microsatellite primers developed for *M. cottoides* were successfully cross-amplified in two from four Pseudopimelodidae species (Table 2). Only two *loci* (Mcot04 and Mcot09) failed to amplify in *P. pulcher* and *M. garavello*, respectively. From the set of *loci* tested, *Microglanis garavello* and *M. parahybae* exhibited 10 polymorphic *loci*, while *M. cibela* and *P. pulcher* showed, respectively, 11 and 12 polymorphic *loci* each.

Table 1. Description of 13 microsatellite *loci* (11 polymorphic and two monomorphic) isolated from the Neotropical fish *Microglanis cottoides*. Flanking primers, T_a = optimal annealing temperatures, k = number of alleles, allele size range (bp), H_o = observed heterozygosity, H_e = expected heterozygosity estimated from 30 individuals, Q = paternity exclusion probability, I = probability of genetic identity, F_{IS} = endogamy coefficient, PIC = polymorphic information content, GenBank accession numbers. * Significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$). ** Significant value for the endogamy coefficient (F_{IS}).

Locus	Sequence	Primers (5'-3')	T_a (°C)	k	Allele size range (pb)	H_o	H_e	(Q)	(I)	PIC	F_{IS}	GenBank
Mcot01	(GT) ₇	F: TCATGATGGCGACTGAAGTC R: TTATTGCGTGTGCTTTCTGG	48	1	244	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	-	KF134914
Mcot02	(AC) ₉	F: AACTGCCGCAAAAACAACC R: TTACCCTGACAACCAGCTCAC	54	8	110 - 126	0.792	0.786	0.593	0.074	0.758	0.014	KF134915
Mcot03	(TG) ₁₆	F: AGCCCAATCTGTCTGAGAGC R: ATCATCACACGTGGAAACAC	54	17	183 - 221	0.917	0.915	0.828	0.013	0.909	0.019	KF134916
Mcot04	(TG) ₁₈	F: AGCGGCTGTAATAGGCTGTG R: CGGCTGTTCTTCCTTTACAG	48	20	159 - 211	0.917	0.931	0.861	0.008	0.927	0.037	KF134917
Mcot05	(GTAAAA) ₅	F: CGTTGAAGAGTAACACAGACGTG R: AAGCGGAGGTTCAATTCG	54	2	126 - 132	0.458	0.430	0.168	0.417	0.337	-0.045	KF134918
Mcot06	(GT) ₇	F: TCATGATGGCGACTGAAGTC R: TTATTGCGTGTGCTTTCTGG	48	1	245	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	-	KF134919
Mcot07	(GT) ₁₀	F: TTCACTCAAGAGGCAGCTGTAG R: ACCGTGTTTCGTCGCTAATG	54	15	127 - 183	0.917	0.875	0.759	0.025	0.865	-0.026	KF134920
Mcot08	(AC) ₁₉	F: CGCAGCACACCAGACTTATG R: TCATGGGTAAACGACACCAAG	54	17	156 - 204	*0.792	0.908	0.815	0.015	0.901	**0.148	KF134921
Mcot09	(TGAA) ₄	F: CAGGTGGGTTCGGATTAAC R: CAGTAGAGACTCTCATAACAATGCAC	54	7	97 - 125	0.958	0.681	0.428	0.156	0.627	-0.388	KF134922
Mcot10	(ATGA) ₈	F: GTGGGATCCGGATTAACCTC R: AAATAACAGGAAAGTTTTATCCACTC	48	7	118 - 138	0.667	0.666	0.409	0.170	0.607	0.019	KF134923
Mcot11	(GT) ₅	F: TCATTTGGAACCAGGACTCTG R: GGAATCGAACCCATGAAGTC	54	4	165 - 188	0.417	0.386	0.215	0.400	0.363	-0.057	KF134924
Mcot12	(ATGA) ₆	F: GTGGGATCCGGATTAACCTC R: CCGTCAGTATGTCAGTCAGTCAG	60	5	166 - 182	0.375	0.641	0.393	0.180	0.589	**0.432	KF134925
Mcot13	(TGT) ₈	F: GAAGGTGTGGATTGAGAGCAG R: CAGATTACCCATCCGTCCAT	60	3	125 - 131	0.125	0.119	0.0598	0.780	0.115	-0.029	KF134926
All <i>loci</i>				108	8.3	0.580	0.579	0.999	2.16x10 ⁻⁶	0.538	0.021	

Table 2. Cross-amplification of 13 loci in four species of Pseudopimelodidae. Amplifications and polymorphisms were tested in five individuals of each species. - indicates no amplification. *k* = the number of alleles per locus.

Species	Primers												
	Mcot01	Mcot02	Mcot03	Mcot04	Mcot05	Mcot06	Mcot07	Mcot08	Mcot09	Mcot10	Mcot11	Mcot12	Mcot13
	Allele size range (bp) and the number of alleles per locus observed (<i>k</i>)												
<i>Microglanis cibela</i>	244-246 <i>k</i> =2	114-122 <i>k</i> =4	104-218 <i>k</i> =2	180-196 <i>k</i> =5	114-132 <i>k</i> =3	148-168 <i>k</i> =5	244-246 <i>k</i> =2	168-214 <i>k</i> =5	113-125 <i>k</i> =3	122-132 <i>k</i> =4	165 <i>k</i> =1	166-174 <i>k</i> =3	128 <i>k</i> =1
<i>Microglanis garavello</i>	232 <i>k</i> =1	114-124 <i>k</i> =3	195-197 <i>k</i> =1	181-191 <i>k</i> =3	112-132 <i>k</i> =3	155-161 <i>k</i> =3	232-256 <i>k</i> =2	152-172 <i>k</i> =3	- <i>k</i> =3	116-130 <i>k</i> =3	184 <i>k</i> =1	168-172 <i>k</i> =3	126-129 <i>k</i> =2
<i>Microglanis parahybae</i>	251 <i>k</i> =1	116-126 <i>k</i> =5	202-208 <i>k</i> =3	207-221 <i>k</i> =4	114-132 <i>k</i> =2	145-155 <i>k</i> =4	244-252 <i>k</i> =1	162-176 <i>k</i> =5	114-124 <i>k</i> =4	122-126 <i>k</i> =3	184 <i>k</i> =1	170-178 <i>k</i> =3	122 <i>k</i> =1
<i>Pseudopimelodus pulcher</i>	238-258 <i>k</i> =4	100-134 <i>k</i> =5	182-214 <i>k</i> =6	- <i>k</i> =4	110-156 <i>k</i> =2	145-153 <i>k</i> =4	245-247 <i>k</i> =2	158-170 <i>k</i> =5	115-197 <i>k</i> =5	122-126 <i>k</i> =2	186-192 <i>k</i> =2	170-174 <i>k</i> =2	101-128 <i>k</i> =5

The successful cross-species amplification of microsatellite loci described herein can be attributed to the high conservatism of the flanking microsatellite regions, which is expected among close related species, as reported elsewhere (Barbará *et al.*, 2007). Thus, the set of primers presented in the current study appear as promising tools for future population genetic studies involving these five species of Neotropical fish.

Acknowledgments

The authors are grateful to "Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior" (CAPES) for the scholarship granted to L. Souza-Shibatta, and Fundação Araucária for their financial support to this research (Programa Universal 05/2011, protocol 22.633); Lúcia Giuliano Caetano (Universidade Estadual de Londrina) for donating samples of *M. cottoides*; Claudete F. Ruas, for helping build the library; and IBAMA/SISBIO, for providing permission to collect fish (License nº 12120-1). The authors also thank to the anonymous referees, who contributed with valuable comments and suggestions.

Literature Cited

- Alcaraz, H. S. V., W. J. Graça & A. O. Shibatta. 2008. *Microglanis carlae*, a new species of bumblebee catfish (Siluriformes: Pseudopimelodidae) from the rio Paraguay basin in Paraguay. *Neotropical Ichthyology*, 6: 425-432.
- Almeida, F. S., M. H. Pelegrinelli & L. M. K. Sodrè. 2001. RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi River, Brazil. *Journal of Zoology*, 253: 113-120.
- Avise, J. C. 2001. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, New Haven, Connecticut.
- Avise, J. C. 2009. Retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36: 3-15.
- Barbará, T., C. Palma-Silva, G. M. Paggi, F. Bared, M. F. Fay & Lexer, C. 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*, 16: 3759-3767.
- Bertaco, V. A. & A. R. Cardoso. 2005. A new species of *Microglanis* (Siluriformes: Pseudopimelodidae) from the rio Uruguay drainage, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 3: 61-67.
- Billotte, N., P. J. Lagoda, A. M. Risterucci & F. C. Baurens. 1999. Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, 54: 277-288.
- Bizerril, C. R. S. F. 1994. Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste brasileiro. *Acta Biológica Leopoldinense*, 18: 51-80.
- Bizerril, C. R. S. F. 1995. Análise da distribuição espacial da ictiofauna de uma bacia hidrográfica do leste brasileiro. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 38: 477-499.
- Botstein, D. R. L. White, M. Skolnick & R. W. Davis. 1980. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.
- Esguicero, A. L. H. & M. S. Arcifa. 2010. Which is the best environment for the development of the early life stages of fish during the dry season? *Acta Limnologica Brasiliensia*, 22: 267-275.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hardy, M. E. J., M. Grady & E. J. Routman. 2002. Intraspecific phylogeography of the slender madtom: the complex evolutionary history of the Central Highlands of United States. *Molecular Ecology*, 11: 2393-2403.
- Lundberg, J. G., A. H. Bornbusch & F. Mago-Leccia. 1991. *Gladioglanis conquistador* n. sp. from Ecuador with diagnoses of the Subfamilies Rhamdiinae Bleeker and Pseudopimelodidae n. subf. (Siluriformes: Pimelodidae). *Copeia*, 1991: 190-209.
- Malabarba, L. R. & J. K. F. Mahler-Jr. 1998. Review of the genus *Microglanis* in the rio Uruguay and coastal drainages of southern Brazil (Ostariophysi: Pimelodidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 9: 243-254.
- Marshall, T. C., J. Slate, L. E. B. Kruuk & J. M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7: 639-655.
- Mori, H. & O. A. Shibatta. 2006. A new species of *Microglanis* Eigenmann 1912 (Siluriformes, Pseudopimelodidae) from rio São Francisco basin, Brazil. *Zootaxa*, 1302: 31-42.
- O'Connell, M. & J. M. Wright. 1997. Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7: 331-363.
- Otoni, F. P., J. L. O. Mattos & M. A. Barbosa. 2010. Description of a new species of *Microglanis* from the rio Barra Seca basin, southeastern Brazil (Teleostei: Siluriformes: Pseudopimelodidae). *Vertebrate Zoology*, 60: 187-192.
- Paetkau, D., W. Calvert, I. Stirling & C. Strobeck. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4: 347-354.

- Peakall, R. & P. E. Smouse. 2006. GENEALX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Raymond, M. & F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.
- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Rousset, F. 2008. GENEPOP*007: a complete re-implementation the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103-106.
- Rozen, S. & H. J. Skaletsky. 2000. Primer 3 on the www for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Pp. 365-386. In: Krawetz S. & S. Misener S (Eds.). Humana Press, Totowa.
- Ruiz, W. B. G. & O. A. Shibatta. 2010. A new species of *Microglanis* (Siluriformes, Pseudopimelodidae) from lower Rio Tocantins basin, Pará, Brazil, with description of superficial neuromasts and pores of lateral line system. *Zootaxa*, 2632: 53-66.
- Ruiz, W. B. G. & O. A. Shibatta. 2011. Two new species of *Microglanis* (Siluriformes, Pseudopimelodidae) from the upper-middle Araguaia basin, Central Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 9: 697-707.
- Sarmento-Soares, L. M., R. F. Martins-Pinheiro, C.C. Chamon & A.T. Aranda. 2006. *Microglanis pataxo*, a new catfish from southern Bahia coastal rivers, northeastern Brazil (Siluriformes: Pseudopimelodidae). *Neotropical Ichthyology*, 4: 157-166.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnologies*, 18: 223-234.
- Shibatta, O. A. 2003a. Family Pseudopimelodidae. Pp. 401-405. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris (Eds.). *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Edipucrs.
- Shibatta, O. A. 2003b. Phylogeny and classification of 'Pimelodidae'. Pp. 385-400. In: Arratia, G., B. G. Kapoor, M. Chardon & R. Diogo (Eds.). *Catfishes*. Science Publishers, Enfield.
- Shibatta, A. O. & R. C. Benine. 2005. A new species of *Microglanis* (Siluriformes: Pseudopimelodidae) from upper rio Paraná basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 3: 579-585.
- Shibatta, O. A. 2007. Família Pseudopimelodidae. Pp. 103-104. In: Buckup, P. A., N. A. Menezes & M. S. Ghazzi (Eds.). *Catálogo das Espécies de Peixes de Água Doce do Brasil*. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Vallone, M. V. & J. M. Butler. 2004. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *BioTechniques*, 37: 226-231.
- Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills & P. F. Shipley. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538.
- Wagner, H. W. & K. M. Sefc. 1999. IDENTITY 1.0. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, Vienna. Available from <http://www.boku.ac.at/zag/forsch/identity.htm>. (18 March 2013)
- Weir, B. S. 1996. *Genetic Data Analysis II*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- Zane, L., L. Bargelloni & T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: A review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16.

Submitted July 3, 2013

Accepted August 26, 2013 by Alexandre Hilsdorf

Published September 30, 2013