

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

CÂMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia)

NELSON FLAUSINO JUNIOR

História evolutiva e filogeografia do grupo de espécies *Hemigrammus ocellifer*
(Characiformes: Characidae) dos rios da América do Sul cisandina

NELSON FLAUSINO JUNIOR

HISTÓRIA EVOLUTIVA E FILOGEOGRAFIA DO GRUPO DE ESPÉCIES
HEMIGRAMMUS OCELLIFER (CHARACIFORMES: CHARACIDAE) DOS RIOS DA
AMÉRICA DO SUL CISANDINA

Tese apresentada ao Programa de Pós –
Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia)
do Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” como
requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

Orientador: Dr. Claudio de Oliveira

Botucatu, 2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Flausino Junior, Nelson.

História evolutiva e filogeografia do grupo de espécies
Hemigrammus ocellifer (Characiformes: Characidae) dos rios
da América do Sul cisandina / Nelson Flausino Junior. -
Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Claudio de Oliveira
Capes: 2040000

1. Peixes - Distribuição geográfica. 2. Filogenia.
3. Polimorfismo de nucleotídeo único. 4. Espécies - Aspectos
moleculares. 5. Rios. 6. América do Sul.

Palavras-chave: Delimitação molecular de espécies;
Filogenia; Filogeografia; SNPs; UCEs.

You know a dream is like a river
Ever changin' as it flows
And a dreamer's just a vessel
That must follow where it goes
Trying to learn from what's behind you
And never knowing what's in store
Makes each day a constant battle
Just to stay between the shores and

I will sail my vessel
'Til the river runs dry
Like a bird upon the wind
These waters are my sky
I'll never reach my destination
If I never try
So I will sail my vessel
'Til the river runs dry

And there's bound to be rough waters
And I know I'll take some falls
But with the good Lord as my captain
I can make it through them all

Garth Brooks

Quando não podemos mais mudar uma situação, somos
desafiados a mudar a nós mesmos.

Viktor Frankl

DEDICATÓRIA

Ao meu Pai *in memoriam*, de onde você estiver eu prometi terminar o doutorado,
eternas saudades.

A minha mãe, a melhor pessoa do mundo, te amo.

A Alexandre, Geovani e André irmãos que me ajudaram muito.

Aos meus amigos de quatro patas (Scott, Sol, Sofia – cachorros e as gatas Meg,
Branquinha, Linda, Dorinha) tanto em Cuiabá, quanto em Botucatu estiveram nos
momentos mais difíceis comigo.

AGRADECIMENTOS

A UNESP/Botucatu – Ciência Biológicas – Programa de Pós – Graduação em Zoologia.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.496155/2020-00".

A Cláudio de Oliveira, orientador

Ao Eduardo (Abu) grande amigo do mestrado e que me ajudou muito na preparação do meu primeiro projeto de genética.

Ao povo do laboratório que me ajudaram Bruno Mello, Vanessa Paes, Najla Cerqueira, May.

Ao meu amigo Renato Deivid que me ajudou em tudo que precisei em Botucatu, um bom coração e a quem esteve presente comigo nas horas que mais precisei.

A Mariana Kuranaka que realmente me ensinou genética na prática, uma pessoa incrível.

Lais Reia a nossa conversa me marcou e você me ajudou muito com isso, obrigado.

Antonio Castilho obrigado pelas conversas no início e final do curso. Por sempre compreender o que eu estava passando e por sempre me ajudar.

Francisco Machado e Nilso Estevão foram com vocês que comecei a minha história na ictiologia, fomos uma equipe boa e obrigado pelos ensinamentos e na ajuda do peixe no Pantanal.

Aos amigos Cristiano Moreira, Veracilda Ribeiro, Lineuza, Cristiano Aloísio, Tio Luiz e Tia Valéria, por sempre estarem juntos, me darem conselhos e não me deixarem desistir.

Humberto Mendes, meu amigo e irmão louquinho que tive o prazer de conviver na nossa loucura por bichos em Santo André. Por estar presente nos momentos que precisei e por me ajudar, em especial no estágio docência.

Flavio Lima, meu coorientador e amigo. Nos conhecemos em Aripuanã a séculos atrás e desde lá você me orienta. Era para ter sido meu coorientador em Porto Alegre, mas tive problemas e passaram-se anos. Mesmo assim você aceitou me coorientar em Santo André, Unicamp e finalmente deu certo na Unesp. Você e sua família me acolheram em sua casa e vou ser sempre agradecido por confiar em mim e me ajudar nesse mundo acadêmico.

Decidi ser biólogo e zoólogo na sexta série do ensino fundamental, graças a professora Margarete. Demorou, mais o sonho se realizou.

AVISO

Esta tese é parte dos requerimentos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia), e como tal, não deve ser vista como uma publicação no senso do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (apesar de disponível publicamente sem restrições). Desta forma, quaisquer informações inéditas, opiniões e hipóteses, bem como nomes novos, mudanças taxonômicas não estão disponíveis na literatura zoológica. Pessoas interessadas devem estar cientes de que referências públicas ao conteúdo deste estudo, na sua presente forma, somente devem ser feitas com a aprovação prévia do autor.

NOTICE

This thesis is a partial requirement for the PhD degree in Biological Sciences with emphasis in Zoology and, as such, should not be considered as a publication in the sense of the International Code of Zoological Nomenclature (although it is available without restrictions). Therefore, any new information, opinions, and hypotheses, as well as new names, taxonomic changes are not available in the zoological literature. Interested people are advised that any public reference to this study, in its current form, should only be done after previous acceptance of the author.

RESUMO

O gênero *Hemigrammus* está entre os mais ricos em espécies de Characidae, com 61 espécies reconhecidas atualmente como válidas. As espécies de *Hemigrammus* foram consideradas por muito tempo como “*Incertae Sedis*” em vista do desconhecimento a respeito de suas relações filogenéticas, e atualmente estão alocadas em Stethaprioninae. A distribuição das espécies do gênero é ampla na região cisandina da América do Sul, com sua maior riqueza concentrada na bacia Amazônica. Foi proposta a existência de um grupo monofilético de espécies, o grupo *Hemigrammus ocellifer*, formado por nove espécies. Essas são caracterizadas por partilharem duas manchas umerais, uma mancha escura no pedúnculo caudal, margem superior do olho vermelho em vida, e presença de um gancho relativamente grande porção média dos raios anteriores da nadadeira anal em machos maduros. A fim de testar o monofiletismo do grupo *H. ocellifer*, usamos a captura de centenas de elementos ultraconservados (UCEs). Além disso, métodos moleculares modernos de delimitação de espécies com marcadores anônimos do tipo SNPs (single nucleotide polymorphisms), foram também utilizados para verificar as relações genéticas entre as espécies do grupo. Dados de UCEs mostram que o grupo *H. ocellifer* é monofilético e as relações entre as espécies são discutidas. Considerando que o grupo *H. ocellifer* não é relacionado ao demais *Hemigrammus*, incluindo a espécie tipo do gênero, *H. unilineatus*, sugere-se que essas espécies sejam alocadas no gênero *Holopristis*, considerado no momento como um sinônimo júnior de *Hemigrammus*. Os resultados com UCEs definiram que o grupo *Hemigrammus ocellifer* é monofilético. Por estar não estar relacionado com a espécie tipo do gênero é proposto a revalidação desse grupo para o gênero *Holopristis*. As delimitações de espécies representam sete grupos genéticos, sendo seis espécies e um complexo de espécies de *H. ocellifer*. A provável diferenciação de *H. ocellifer* em duas

linhagens é possivelmente devido a arranjos fluviais que ocorrem na bacia Amazônica.

Palavra-Chave – Filogenia, Delimitação molecular de espécies, Filogeografia, UCEs, SNPs, *Holopristis*

ABSTRACT

The genus *Hemigrammus* is among the richest in species within the family Characidae, with 61 species currently recognized as valid. *Hemigrammus* species were long considered as “*Incertae Sedis*” within the family due to the lack of knowledge about their phylogenetic relationships and are currently allocated within the subfamily Stethaprioninae. The species of the genus are widely distributed across the cis-Andean portion of South America, with its greatest richness concentrated in the Amazon basin. The existence of a monophyletic group of species, the *Hemigrammus ocellifer* group, formed by nine species, was previously proposed. The species of the group are characterized by sharing two humeral blotches, a dark blotch on the caudal peduncle, upper margin of the red eye in life, and the presence of a relatively large hooks in the middle portion of the anteriormost rays of the anal fin in mature males. In order to test the monophyly of the *H. ocellifer* group, we used the capture of hundreds of ultra-conserved elements (UCEs). Furthermore, modern molecular methods of species delimitation with anonymous SNPs (single nucleotide polymorphisms) markers were also used to verify the genetic relationships between species in the group. Data from ECUs show that the *H. ocellifer* group is monophyletic and the relationships between species are discussed. Considering that the group *H. ocellifer* is not closely related to the remaining *Hemigrammus* species, including the type species of the genus, *H. unilineatus*, it is suggested that these species should be allocated to the genus *Holopristis*, which currently is considered a junior synonym of *Hemigrammus*. The results with UCEs defined that the group *Hemigrammus ocellifer* is monophyletic. As it is not related to the type species of the genus, the revalidation of this group to the genus *Holopristis* is proposed. The species boundaries represent seven genetic groups, six species and a species complex of *H. ocellifer*. The probable differentiation

of *H. ocellifer* into two lineages is possibly due to fluvial arrangements that occur in the Amazon basin.

Keywords – *Hemigrammus ocellifer* group, Phylogeny, Molecular delimitation of species, Phylogeography, UCEs, SNPs, *Holoprist*

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1	GÊNERO <i>HEMIGRAMMUS</i> GILL 1858	19
1.1.2	O grupo de espécies <i>Hemigrammus ocellifer</i> (Steindachner, 1882)	21
1.2	MARCADORES MOLECULARES	27
1.2.1	Elementos Ultraconservados (UCEs)	28
1.2.2	Polimorfismo de nucleotídeos únicos (SNPs)	30
1.2.3	Delimitação molecular das espécies com SNPs	31
1.2.4	Análise filogográfica com SNPs	32
1.3	JUSTIFICATIVA	35
1.4	OBJETIVOS	36
1.5	REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
2.	MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1	Amostragem de táxons e preparação de biblioteca	46
2.1.1	Extração e sequenciamento de DNA	47
2.1.2	Processamento de dados de sequência	48
2.1.3	Análise Filogenética	49
2.2	RESULTADOS	50
2.3	DISCUSSÃO	52
2.3.1	<i>HOLOPRISTIS</i> Eigenmann, 1903	55
2.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
2.5	REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
3.	MATERIAL E MÉTODOS	61
3.1	Extração de DNA	61
3.1.2	Construção da biblioteca <i>ddRAD</i> para SNPs	61
3.1.3	Digestão enzimática	62
3.1.4	Ligação de adaptadores	62
3.1.5	Indexação	63
3.1.6	Construção do <i>Pool</i> e <i>Size selection</i>	63
3.1.7	Análise de Bioinformática	64
3.1.8	Inferência filogenômica	65
3.1.9	Genômica populacional	66
3.2	RESULTADOS	67
3.2.1	Gênero <i>Hemigrammus</i>	67

3.2.2	<i>Hemigrammus ocellifer</i>	71
3.3	DISCUSSÃO	73
3.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
3.5	REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
3.6	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	80

INTRODUÇÃO

HISTÓRIA EVOLUTIVA E FILOGEOGRAFIA DO GRUPO DE ESPÉCIES
HEMIGRAMMUS OCELLIFER (CHARACIFORMES: CHARACIDAE) DOS RIOS DA
AMÉRICA DO SUL CISANDINA

1. INTRODUÇÃO

O número de espécies de peixes de água doce da América do Sul é estimado em mais de 4500, podendo chegar a 9000 (Albert *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2016, Albert *et al.* 2020). Characiformes é uma das mais diversas entre os peixes de água doce, compreendendo 24 famílias, mais de 290 gêneros e 2300 espécies (Fricke *et al.*, 2022). Segundo Nelson *et al.* (2016), externamente os Characiformes podem ser diferenciados dos demais grupos por possuir corpo coberto de escamas, nadadeiras pélvicas (ventrais) geralmente situadas bem atrás da inserção das peitorais, raios das nadadeiras moles e, geralmente, pela presença de uma nadadeira adiposa. Existem vários tamanhos corporais entre os Characiformes, desde miniaturas como *Priocharax* Weitzman & Vari, 1987 e *Xenurobrycon* Myers & Miranda Ribeiro, 1945 que são os menores Characiformes (menos que 2 cm de comprimento padrão quando adultos; Lima *et al.*, 2013) até as formas grandes como *Hydrocynus goliath* Boulenger, 1898 que pode atingir cerca de 1 metro e 50 kg, sendo o maior dos Characiformes (e.g., Nelson *et al.*, 2016). Muitos Characiformes são econômica e ecologicamente importantes, com dominantes em várias drenagens em termos de biomassa total de peixes. Espécies do gênero *Prochilodus* Agassiz, 1829, por exemplo, em razão de sua alta biomassa, desempenham papéis importantes para o fluxo de energia intra-ecossistema e para o ciclo de material em sistemas fluviais (Flecker, 1996). A ordem Characiformes compreende peixes herbívoros, onívoros, iliófagos, carnívoros, algumas das quais muito especializadas (Nelson *et al.*, 2016).

Peixes são considerados organismos importantes para os ecossistemas aquáticos de água doce, em especial na região Neotropical, sendo os que mais sofrem pressões ambientais antrópicas, principalmente por alterações hidrológicas,

introdução de espécies exóticas, destruição e poluição de seus habitats (Pelicice *et al.*, 2017). Assim sendo, essas mudanças podem acarretar o risco da ocorrência de perdas importantes de espécies, de forma localizada, desta forma afetando o funcionamento dos ecossistemas aquáticos, padrões biogeográficos e processos evolutivos (Pelicice *et al.*, 2017). Nesse sentido, estudos de peixes são importantes para conservação e manejo das espécies neotropicais, sendo este um procedimento que aumentará o pouco conhecimento ainda existente sobre biologia dos peixes de água doce, em especial os de pequeno porte, muitas deles utilizados na aquarioria.

Characidae é a mais diversa entre os peixes Neotropicais, com mais de 1000 espécies distribuídas desde o sul dos EUA ao norte da Patagônia (Argentina); muitos peixes desta família são comumente conhecidos como tetras no meio aquarista (Nelson *et al.*, 2016).

Oliveira *et al.* (2011), em um estudo molecular incluindo representantes de todas as famílias de Characiformes e da maioria das subfamílias de Characidae reconhecidas até então, encontraram um grupo monofilético fortemente apoiado nas análises moleculares e circunscreveu Characidae aos táxons compartilhando a ausência de um osso supraorbital e a posição derivada da emergência da artéria hióide a partir do cerato-hial anterior. Assim, a família Characidae sensu Oliveira *et al.* (2011) era composta por quatro linhagens principais: Clados A, B e C e um quarto clado composto pelo gênero *Spintherobolus*. Mariguela *et al.* (2013) em um estudo filogenético de Cheirodontinae descobriram que *Amazonspinther* Bührnheim, Carvalho, Malabarba & Weitzman 2008 estava relacionado a *Spintherobolus* Eigenmann 1911 como sugerido anteriormente por dados morfológicos (Bührnheim *et al.*, 2008), ambos os gêneros de Cheirodontinae colocando-os em uma linhagem de caracídeos independente. Mirande (2019), em um estudo filogenético de Characidae

incluindo 520 caracteres morfológicos e 6.133 dados moleculares recuperados do GenBank, corroborou a hipótese de Oliveira *et al.* (2011) e concordou que Characidae deveria ser composto pelas quatro linhagens principais, nomeando-os como Spintherobolinae (nova subfamília), Stethaprioninae (Clade C), Stevardiinae (Clade A), e o Clade B composto por Exodontinae, Tetragonopterinae, Characinae, Aphyocharacinae e Cheirodontinae.

Cerca de 52 gêneros de Characidae são monotípicos, outros são muitos especiosos, em especial os de pequeno porte, como *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (124 espécies), *Bryconamericus* Eigenmann, 1907 (56 espécies), *Creagrutus* Günther, 1864 (81 espécies), *Hemigrammus* Gill, 1858 (61 espécies), *Hyphessobrycon* Durbin, 1908 (161 espécies), *Jupiaba* Zanata, 1997 (29 espécies) e *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (98 espécies). Characidae tem a diversidade em nível específico ainda mal compreendida, particularmente entre as espécies de pequeno porte, por esse motivo sendo provável que a família inclua uma percentagem desproporcional de espécies ainda a serem descritas (Oliveira *et al.*, 2011). A subfamília Stethaprioninae inclui alguns dos mais diversos e problemáticos gêneros da família Characidae (*Astyanax*, *Hemigrammus*, *Hyphessobrycon* e *Moenkhausia*), sendo necessário mudanças nomenclaturais e a definição de vários novos gêneros para se tornarem monofiléticos (Mirande, 2019).

1.1 GÊNERO *HEMIGRAMMUS* GILL, 1858

Hemigrammus está entre os mais ricos em espécies de Characiformes, com 61 espécies reconhecidas atualmente como válidas (Lima *et al.* 2003; Albornoz-Garzon *et al.*, 2019; Bittencourt *et al.*, 2020). As espécies de *Hemigrammus* apresentam ampla

distribuição na região cisandina da América do Sul, incluindo a bacia Amazônica, do Orinoco, do Prata e do São Francisco, além de rios da Guiana, Suriname, Guiana Francesa e nordeste do Brasil (Lima *et al.*, 2003; Lima & Sousa, 2009; Ota *et al.*, 2015), com sua maior riqueza concentrada na bacia amazônica.

São peixes de pequeno porte, com exemplares adultos entre 2-6 cm CP (comprimento padrão), conhecidos popularmente, entre os pequenos Characidae, como “piabas” ou “tetras”, sendo algumas espécies muito populares como peixes de aquário. A maioria dos gêneros de Characidae foram no passado alocados em Tetragonopterinae (Géry, 1977), porém considerando a falta de evidência de monofiletismo para a subfamília, vários gêneros, entre eles *Hemigrammus*, cujas espécies foram consideradas como “*Incertae Sedis*” devido ao desconhecimento de suas relações filogenéticas (Weitzman & Fink, 1983; Weitzman & Palmer, 1997; Lima *et al.*, 2003). Em um estudo com dados morfológicos e moleculares, Mirande (2019) aloca *Hemigrammus* dentre de Stethaproninae, sendo esta subfamília a mais diversa dentro de Characidae.

De fato, nem hipóteses morfológicas (Mirande, 2010) nem hipóteses moleculares (Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011) suportam o monofiletismo de *Hemigrammus*. Entretanto, espécies continuam a ser descritas nesse gênero seguindo a definição clássica apresentada por Eigenmann (1917, 1918), que se baseia nos seguintes caracteres, nenhum deles exclusivo para o gênero: pré-maxilar com duas séries de dentes, a interna com cinco ou mais dentes; linha lateral incompleta; poucos dentes no maxilar; nadadeira adiposa presente; e escamas presentes nos lobos da nadadeira caudal. Porém, várias dessas características também são compartilhadas por outros gêneros. A única diferença no esquema tipológico apresentado por Eigenmann (1917, 1918) para distinguir espécies de *Hemigrammus* e *Hyphessobrycon* é a presença de pequenas escamas na base da

nadadeira caudal, estendendo-se para os lobos superior e inferior presentes em *Hemigrammus* e ausentes de *Hyphessobrycon*. Entretanto, trata-se de um caráter extremamente lábil, e na prática de pouca utilidade na separação desses gêneros. Mirande (2010) propõe o clado *Hemigrammus* composto por: *Bario* Myers 1940, *Deuterodon* Eigenmann 1907, *Hasemania* Ellis 1911, *Hemigrammus* Gill 1858, *Hyphessobrycon* Durbin 1908, *Moenkhausia* Eigenmann 1903, *Myxiops*?, *Paracheirodon* Géry 1960, *Petitella*?, *Pristella* Eigenmann 1908, *Probolodus* Eigenmann 1907, e *Thayeria* Eigenmann 1908, tendo como única sinapomorfia para este clado um processo ósseo dorsal no rinosfenoide, que separa os nervos oftálmicos orientados anteriormente, sendo este, entretanto, um caráter muito homoplástico.

1.1.2 O grupo de espécies *Hemigrammus ocellifer* (Steindachner, 1882)

Hemigrammus foi descrito por Gill (1858) como um subgênero de *Poecilurichthys* (atualmente um sinônimo de *Astyanax*), com espécie-tipo *Poecilurichthys unilineatus* (= *Hemigrammus unilineatus*), das demais congêneres por apresentar a linha lateral abruptamente interrompida na metade do corpo (*H. unilineatus*). Steindachner (1882) descreveu *Tetragonopterus ocellifer* de Tabatinga (estado do Amazonas, Brasil).

Um novo gênero foi criado por Eigenmann (1903), na subfamília Tetragonopterinae, denominado *Holopristis*, com espécie tipo *Tetragonopterus ocellifer*. Como caráter diagnóstico entre os gêneros definiu pré-maxilar com duas séries de dentes, suas coroas formando uma “cumeeira” (“ridge”) e o maxilar com dentes ao longo de toda sua borda, e a ausência de espinho pré-dorsal. Nenhum desses caracteres realmente pode ser considerado diagnóstico uma vez que a coroa contínua entre os dentes é uma característica comum em Characidae, assim como a

ausência de espinho pré-dorsal, e a presença de dentes ao longo do maxilar foi um erro de observação por Eigenmann (1903), já que *Hemigrammus ocellifer* possui poucos dentes no maxilar. Atualmente *Holopristis* é considerado sinônimo júnior de *Hemigrammus*.

Géry (1977) dividiu as espécies de *Hemigrammus* em cinco grupos artificiais de acordo com seu padrão de colorido: **(a)** ausência de marcas escuras sobre o corpo, composto por *H. gracilis* (Lütken, 1875), *H. erythrozonus* Durbin, 1909 e *H. mimus* Böhlke, 1955; **(b)** presença apenas de uma ou duas manchas umerais, composto por *H. aereus* Géry, 1959, *H. analis* Durbin, 1909, *H. bellottii* (Steindachner, 1882), *H. cupreus* Durbin, 1918, *H. cylindricus* Durbin, 1909, *H. lunatus* Durbin 1918, *H. microstomus* Durbin 1918, *H. stictus* (Durbin, 1909) (denominado *Hemigrammus* grupo *bellottii*); **(c)** presença apenas de uma mancha caudal, composto por *H. boesemani* Géry, 1959, *H. brevis* Ellis, 1911, *H. hyanuary* Durbin, 1918, *H. levis* Durbin, 1908, *H. marginatus* Ellis, 1911, *H. matei* Eigenmann, 1918, *H. micropterus* Meek, 1907, *H. rhodostomus* Ahl, 1924, *H. rodwayi* Durbin, 1909 e *H. tridens* Eigenmann, 1907 (denominado *Hemigrammus* grupo *tridens*); **(d)** presença de uma ou duas manchas umerais e uma mancha caudal, composto por *H. barrigona* Eigenmann & Henn, 1914, *H. caudovittatus* Ahl, 1923, *H. guyanensis*, *H. iota* Durbin, 1909, *H. luelingi* Géry, 1964, *H. megaceps* Fowler, 1945, *H. melanochorus* Fowler, 1913, *H. ocellifer* (Steindachner, 1882), *H. pretoensis* Géry, 1965, *H. pulcher* Ladiges, 1938, *H. schmardae* (Steindachner, 1882) e *H. vorderwinkleri* Géry, 1963 (denominado *Hemigrammus* grupo *ocellifer*); **(e)** presença de uma mancha na nadadeira dorsal, composto por *H. coeruleus* Durbin, 1908, *H. elegans* (Steindachner, 1882), *H. ulreyi* (Boulenger, 1895) e *H. unilineatus* (Gill, 1858) (denominado *Hemigrammus* grupo *unilineatus*).

O grupo de espécies *Hemigrammus ocellifer* (Figura 1 A-I) como proposto por Géry (1977) não é monofilético, pois agrupa espécies com duas manchas umerais, uma mancha no pedúnculo caudal e frequentemente uma faixa longitudinal. Lima & Sousa (2009) propuseram um grupo *Hemigrammus ocellifer*, possivelmente monofilético, incluindo espécies que partilham duas manchas umerais, uma mancha escura no pedúnculo caudal, margem superior do olho vermelha em vida, e presença de um gancho relativamente grande na porção média dos raios anteriores da nadadeira anal em machos maduros. Esse grupo incluiria *H. ocellifer* (Steindachner, 1882), *H. neptunus* Zarske & Géry, 2002, *H. guyanensis* Géry, 1959, *H. pulcher* Ladiges, 1938, *H. haraldi* Géry, 1961, *H. luelingi* Géry, 1964 e *H. yinyang* Lima & Sousa, 2009. Lima *et al.* (2016) incluíram mais duas espécies no grupo, *Hemigrammus aguaruna* Lima, Correa & Ota, 2016 e *H. falsus* Meinken, 1958, totalizando 9 espécies. *Hemigrammus ocellifer*, a espécie mais amplamente distribuída do grupo, tem uma grande distribuição na bacia amazônica e ocorre nos rios guianenses (Planquette *et al.*, 1996; Lima *et al.*, 2013). *Hemigrammus neptunus* ocorre na porção sudoeste da bacia amazônica, na bacia do rio Madeira (Lima *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2016) e na bacia do rio Paraguai (Ota *et al.*, 2015). *Hemigrammus guyanensis* ocorre nas bacias guianenses e no leste da Amazônia (Planquette *et al.*, 1996; Lima *et al.*, 2016). *Hemigrammus pulcher*, *H. luelingi*, *H. haraldi* e *H. aguaruna* são restritos à porção oeste da bacia amazônica, enquanto *H. yinyang* é conhecido apenas de uma porção da bacia do alto rio Negro no Brasil e Colômbia e *H. falsus* aparentemente é restrito ao Suriname, embora sua diagnose em relação a *H. guyanensis* não seja clara (Lima & Sousa, 2009; Lima *et al.*, 2016).



<https://www.thinkfish.co.uk/fish/head-tail-light-tetra.html>
H. ocellifer



<https://br.pinterest.com/pin/490470215652134238/>
H. pulcher



www.fishbase.se/summary/51143
H. luelingi



<https://aqua-aquapress.com/volume-15>
H. yinyang



Foto H. Bleher
H. aguaruna



<https://www.fishbase.se/FieldGuide/>
H. falsus



www.fishbase.se/photos
H. neptunus



www.fishbase.se/photos
H. guyanensis



Foto Herbert R. Axerold
H. haraldi

Figura 1 – Espécies do grupo *Hemigrammus ocellifer*.

Géry (1961) ilustrou os ganchos presentes em machos maduros de *Hemigrammus pulcher pulcher* (= *H. pulcher*), comparando com aqueles presentes em *Hemigrammus pulcher haraldi* (= *H. haraldi*) (Figura 2). Lima & Souza (2009) propõe o grupo *Hemigrammus ocellifer* como monofilético baseado na presença compartilhada de arranjo de ganchos na nadadeira anal de machos. Esses autores discutem sobre a presença desses ganchos em outras espécies de *Hemigrammus* e nos gêneros *Parapristella* Géry, 1964 e *Petitella* Géry & Boutière, 1964 (Figura 3). Foi hipotetizado por esses autores que a associação entre ganchos na nadadeira anal e tecido denso presumivelmente secretório, encontrado em todas as espécies de *Hemigrammus*, *Parapristella*, *Petitella* e *Hyphessobrycon* que apresentam ganchos, seria um mecanismo para facilitar a ruptura das membranas celulares e provocar, com consequência, a liberação das secreções celulares.

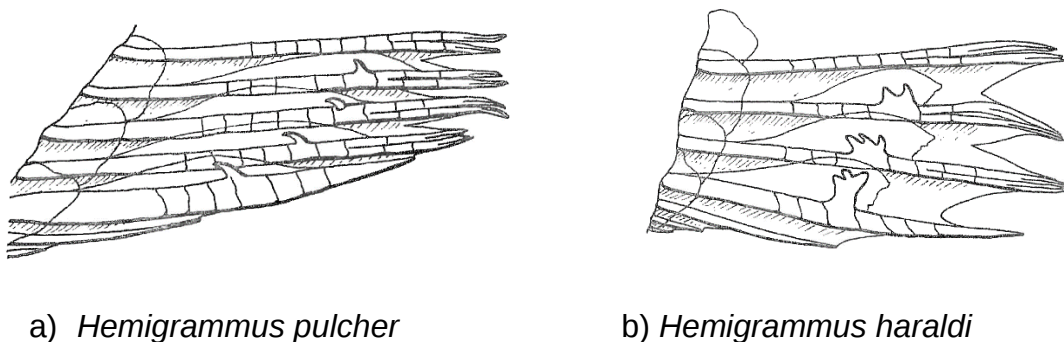


Figura 2 – Comparação dos ganchos entre *Hemigrammus pulcher* e *H. haraldi* (extraído de Géry, 1961).

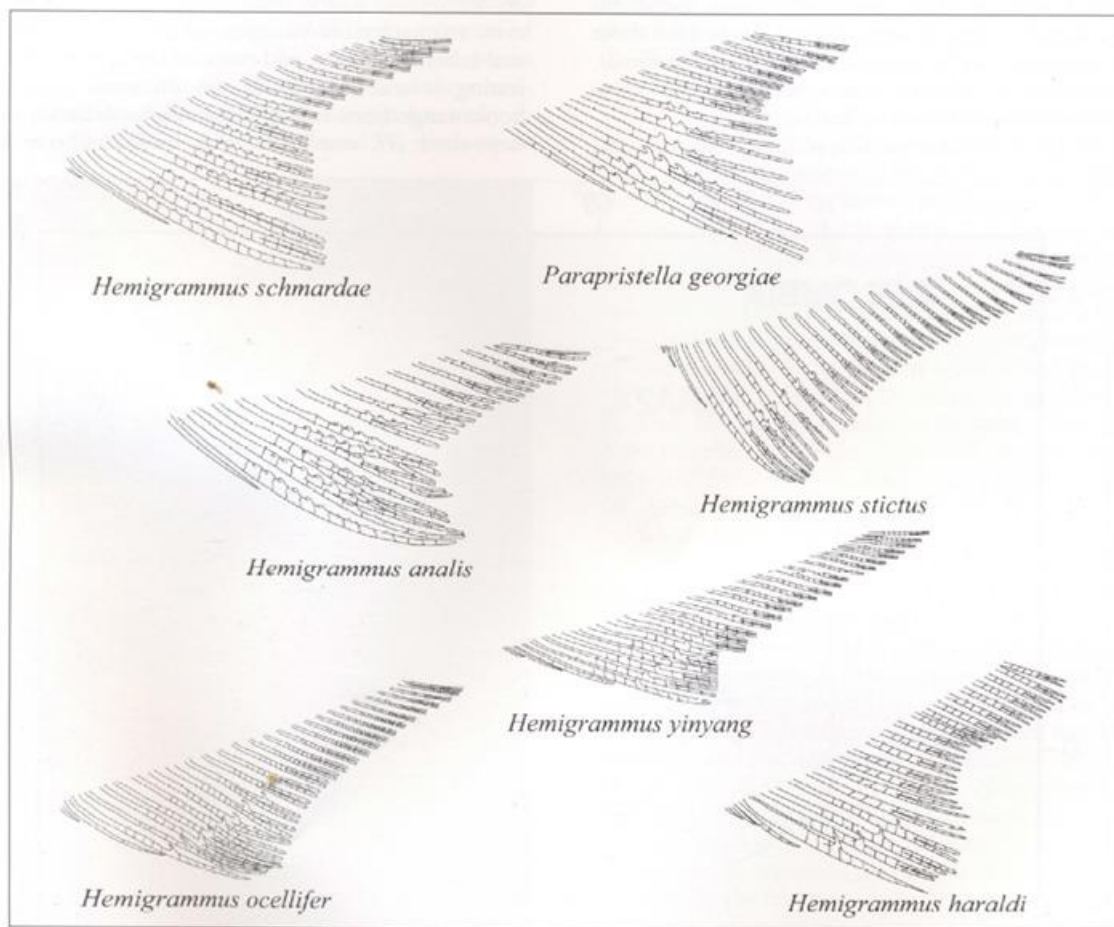


Figura 3 – Ganchos da nadadeira anal de espécies de *Hemigrammus* e de *Parapristella georgiae* [extraído de Lima & Sousa, (2009)].

O arranjo e a morfologia dos ganchos são uma fonte de dados pouco explorada para estudos padrões filogenéticos devido a relativa escassez de espécimens maduros sexualmente, uma fonte potencialmente relevante de informação para estudos filogenéticos baseados em morfologia (Lima & Souza, 2009).

Considerando que marcadores morfológicos, são marcadores genéticos visíveis ou um fenótipo que de alguma forma seja analisável, para o qual os alelos em *loci* individuais segregam de uma maneira mendeliana (Turchetto-Zolet & Zanella, 2017).

Uma das formas de resolver o problema do entendimento das relações entre espécies é a utilização de marcadores moleculares em especial os de DNA. que podem ser usados em estudos filogenéticos, filogeográficos, delimitação de espécies, mapeamento genético, diagnósticos de doenças genéticas, testes de paternidade e para quem investiga as relações entre genótipo e fenótipo, entres outros ramos da biologia. (Turchetto-Zolet & Zanella, 2017).

1.2 MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores moleculares proporcionaram ferramentas importantes para discriminar alelos, que podem ou não revelar diferenças fenotípicas. Mesmo que os alelos detectados no nível do DNA não causem necessariamente variações fenotípicas, eles podem estar ligados a tais fenômenos (Turchetto-Zolet & Zanella, 2017).

Com o sequenciamento de nova geração (NGS – *Next Generation Sequencing*) aumentou consideravelmente a escala das análises genômicas, permitindo o sequenciamento e genotipagem de milhares regiões dos genomas em um único passo, gerando um grande volume de dados biológicos (*high throughput sequencing* -HTS). Essas tecnologias de sequenciamento têm sido aplicadas na identificação de marcadores moleculares como microssatélites, polimorfismos de mutações pontuais (SNPs), elementos ultraconservados do DNA (UCEs), que são utilizados para genômica de populações, delimitação de espécies, na reconstrução filogenética e filogeográfica (Christoff, 2017, Faircloth *et al.* 2012)

1.2.1 Elementos Ultraconservados (UCEs)

Os elementos ultraconservados (*ultraconserved elements*, UCEs) são regiões dos genomas altamente conservadas e compartilhadas por táxons evolutivamente distantes. Os UCEs foram primeiramente descritos por Bejerano *et al.* (2004), que encontraram cerca de 481 segmentos maiores de 200 pb que eram absolutamente (100%) conservados em regiões ortólogas de humanos, ratos e camundongos. Quase todos esses segmentos também são conservados nos genomas de frango e cachorro, com uma média de 95 e 99% de identidade, respectivamente. Estudos posteriores mostraram que os UCEs também estão presentes em diversos outros organismos, como outros vertebrados, insetos e fungos (Siepel *et al.* 2005; Faircloth *et al.* 2012).

O papel dos UCEs no genoma ainda não está esclarecido (Dermitzakis *et al.* 2005), embora os UCEs tenham sido associados com regulação gênica ou desenvolvimento (Sandelin *et al.* 2004; Woolfe *et al.* 2004) e se tem assumido que os UCEs são importantes pela sua natureza extremamente conservada entre grupos muito distantes filogeneticamente. Suas sequências conservadas permitem uma fácil identificação e alinhamento entre genomas e a variabilidade nas sequências que flanqueiam cada UCE sugerindo que eles podem ter um sinal de história evolutiva em diversas escalas de tempo, dependendo da distância da região central dos UCEs (Faircloth *et al.* 2012).

Nos últimos anos, a importância e relevância das filogenias moleculares no entendimento das relações filogenéticas em peixes aumentou enormemente (e.g., Near *et al.*, 2012; Betancur *et al.*, 2013), com vários tipos de marcadores moleculares. Os UCEs são uma classe de marcadores moleculares usados em estudos filogenéticos através do enriquecimento de bibliotecas genômicas contendo centenas

ou milhares de *loci*, utilizando sequenciamento de nova geração (Faircloth *et al.* 2012). Como as sequências de UCEs são altamente conservadas elas são utilizadas para o anelamento de sondas (probes), a partir das quais as sequências flanqueadoras dos UCEs são lidas (Pennisi, 2013). Devido ao fato de estes elementos ultraconservados estarem distribuídos por todo o genoma, eles podem ser tratados como *loci* independente em análises filogenéticas e são particularmente valiosos em métodos de elaboração de árvores filogenéticas, demonstrando o parentesco entre espécies (Faircloth *et al.* 2012), ampliando de maneira importante o nível de resolução, quando há um aumento no número de *loci*.

O primeiro estudo de UCEs com peixes foi realizado com 30 espécies de Actinopterygii, sendo sequenciados cerca de 500 *loci* e as filogenias obtidas mostram nós altamente resolvidos em todos níveis (recentes e antigos). Os resultados suportaram as relações entre *Amia* e *Lepisosteus* (Holostei) e revelaram que os Elopomorpha e depois os Osteoglossomorpha são as primeiras linhagens a divergir entre as linhagens dos teleósteos (Faircloth *et al.* 2013). Mateussi *et al.* (2020) estudando a família Serrasalminidae sequenciaram 1553 *loci* de UCEs, corroborando a monofilia da família. McGee *et al.* (2016) utilizaram UCEs para realizar uma análise filogenética que resultou em uma árvore filogenética bem suportada de 56 espécies de ciclídeos africanos, demonstrando uma associação entre o modo de alimentação e a evolução das mandíbulas de diferentes linhagens. Ochoa *et al.* (2020) utilizaram UCEs para avaliar as relações filogenéticas de Trichomycteridae e demonstraram o status monofilético da subfamília Trichomycterinae.

Os estudos com UCEs veem crescendo devido ao alto custo-benefício em função do tempo e ao baixo custo, dada a grande quantidade de dados gerados, que permitiram que sejam utilizados como marcadores em estudos filogenéticos, e

com isso, permita a elaboração de hipóteses filogenéticas para peixes neotropicais.

1.2.2 Polimorfismo de nucleotídeos únicos (SNPs)

Os marcadores SNPs (Polimorfismos de Nucleotídeo Único - SNPs - do inglês (*Single Nucleotide Polymorphisms*) são originados de mutações pontuais no DNA (Turchetto-Zolet *et al.*, 2017; Caetano, 2009). Possui um modelo de evolução simples baseado em transições e transversões (Brookes, 1999; Mاتيoli *et al.*, 2012). Quando a frequência do alelo menos comum é maior ou igual a 1%, ele apresenta uma baixa taxa de mutação, sendo que assim os SNPs constituem bons indicadores para estudos evolutivos (Brookes, 1999; Garvin *et al.*, 2010; Mاتيoli *et al.*, 2012).

Os SNPs estão presentes em regiões codificadoras (éxons) e não codificadoras (íntrons e regiões intergênicas). São *loci* nucleares anônimos selecionados aleatoriamente, os quais são provenientes, na maioria das vezes, de regiões não codificadoras do genoma (Thomson *et al.*, 2010).

Os marcadores SNPs representam a terceira geração de marcadores moleculares e são empregados com sucesso em diversos estudos (Turchetto-Zolet *et al.*, 2017). Pelo seu alto rendimento, fácil transferência entre laboratórios e baixo erro de genotipagem, se torna um excelente marcador de para resolução de complexos de espécies em peixes (Mérot *et al.*, 2022), filogenética (Thomson *et al.*, 2008), filogeografia (Lee & Edwards, 2008), genômica populacional (Kongsstovi *et al.*, 2022), filogenômica (Unmack *et al.*, 2022), ecologia (Thomas & Klaper, 2004;) e conservação (Begossi *et al.*, 2021). Estudos realizados com SNPs estão sendo muito utilizados para a delimitação e resolução de complexo de espécies e filogeografia, como o nesse estudo.

1.2.3 Delimitação molecular das espécies com SNPs

A delimitação de espécies (ou seja, o processo pelo qual os limites entre espécies são identificadas e novas espécies são descobertas; (Rannala, 2015) é uma questão fundamental na biologia, e sua mecânica contém aspectos tanto teórico quanto aplicado (Carstens *et al.*, 2013). Outra definição de delimitação de espécies diz que são processos que determinam quais grupos de organismos individuais constituem diferentes populações de uma única espécie e quais constituem espécies diferentes (Rannala, 2015).

São várias as definições de espécies e a falta de consenso neste campo coloca um sério dilema para os taxonomistas que delimitam espécies (Sites & Marshall, 2003). A especiação é um processo (potencialmente prolongado), isso complica as análises filogenéticas e abordagens de linhagem para delimitação de espécies, sendo que são necessários métodos para acomodar essa complexidade ao decidir quais linhagens são espécies em oposição à estrutura dentro das espécies (George *et al.*, 2018; Sukumaran & Knowles, 2017). Estudos de divergência média para um locus único (Hebert *et al.*, 2004) são propensos a grande variação introduzida pelos processos aleatórios de coalescência e acumulação de mutações (Ross *et al.*, 2008), como delimitação morfológica de espécies ou DNA barcorde (COI mitocondrial). Novos métodos para delimitação de espécies estão sendo desenvolvido e comparados (Wiens, 2007).

Considerando os dados de sequência de DNA pode-se dividir os métodos em duas categorias: (1) métodos heurísticos, que não é derivado de um modelo estatístico formal da estrutura genética da população. Os métodos heurísticos geralmente são computacionalmente eficientes, mas os resultados podem ser difíceis de interpretar e

podem ter propriedades estatísticas ruins; (2) métodos paramétricos, que são baseados em um modelo probabilístico explícito de divergência populacional e evolução das sequências genéticas, que maximiza a verossimilhança ou probabilidade Bayesiana (Rannala & Yang, 2020).

As vantagens dos SNPs é que eles podem ser desenvolvidos, genotipados e analisados, juntamente com seu baixo custo e níveis baixos de homoplasia, tornando uma escolha de marcador ideal para o limite das espécies (Shaffer & Thomson, 2007).

Shaffer & Thomson (2007) descreveram uma abordagem para gerar SNPs usando recursos genômicos e utilizaram essa abordagem como um estudo de caso envolvendo tartarugas. Eles também descreveram alguns dos métodos que podem ser usados para aplicar dados com SNPs em outras espécies. Hosegood *et al* (2020), estudaram a delimitação das espécies de arraias mantas e Olave & Mayer (2020) estudaram um complexo e radiação de espécies de ciclídeos.

A presença de populações amplamente distribuídas geograficamente, como é o caso de *Hemigrammus ocellifer*, podem causar problemas taxonômicos (Lima *et al.*, 2016), como a presença de sinônimos ou espécies crípticas. Como exemplo podemos citar *H. guyanensis* possível sinônimo junior de *H. falsus*. A delimitação de espécies com marcadores SNPs pode ajudar solucionar os problemas taxonômicos desse grupo.

1.2.4 Análise filogeográfica com SNPs

O termo “filogeografia” foi introduzido por Avise & Ellis (1986), definido como o estudo dos princípios e processos que determinam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas (Avise, 2000). O principal objetivo da filogeografia é integrar

os processos micro e macroevolutivos e compreender como os eventos históricos ajudaram a formar a distribuição geográfica atual de genes, populações e espécies (Avice 2000; Cunha & Solé-Cava, 2012).

A alta riqueza de espécies de peixes neotropicais resulta de processos ecológicos e históricos complexos, contínuos através do tempo geológico, porém, pouco é conhecido em relação aos padrões que determinaram a distribuição espacial e temporal das linhagens na diversificação existente na região neotropical (Montoya-Burgos, 2003). Devido a intensa dinâmica de paisagem sul-americana, padrões de distribuição precisam ser abordados e entendidos com base em estudos comparativos abrangentes, que podem ser auxiliadas por abordagens em nível molecular como filogeografias (Ribeiro *et al.*, 2011).

Os peixes obrigatoriamente dulcícolas são excelentes (Myers 1938) modelos para estudos filogeográficos, permitindo estabelecer um nexos causal entre seus padrões de distribuição e os eventos paleohidrológicos como conexão de bacias hidrográficas, introgressões marinhas no continente, isolamentos de drenagens e capturas de cabeceiras entre drenagens adjacentes, os quais refletem mudanças geomorfológicas e climáticas (Lundberg, 1993; Bermingham & Martin, 1998).

Beheregaray (2008) afirma que os estudos filogeográficos de peixes são realizados em sua grande maioria nas regiões temperadas, no hemisfério norte, principalmente nos Estados Unidos e Europa. Além de escassos trabalhos sobre filogeografia de peixes neotropicais, ainda mais raro são os estudos que quantifiquem a variação molecular. Nos últimos anos, são crescentes as aplicações de métodos filogeográficos em diversos clados de peixes neotropicais (Lovejoy *et al.*, 2010). A abordagem filogeográfica, por investigar a variabilidade intraespecífica e a nível específico, ajuda tanto na tarefa de entender processos de especiação, como

entender eventos biogeográficos ligados à expansão de distribuições num horizonte temporal de dezenas de milhares a milhões de anos (Lovejoy *et al.*, 2010).

Estudos filogeográficos realizados em anfíbios, répteis não-aves, aves e mamíferos tem sido uma linha auxiliar importante no entendimento da evolução da biota amazônica e sul-americana como um todo (Antonelli *et al.*, 2010; Aleixo & Rossetti, 2007). Peixes tem um potencial grande e ainda relativamente pouco explorado para auxiliar na interpretação da evolução da biota sul-americana como um todo, e particularmente da bacia amazônica. Muitos estudos filogeográficos de peixes amazônicos abordaram a variação populacional de espécies de grande porte e com importância econômica, focando sobretudo auxiliar no conhecimento da biologia e conservação dessas espécies (e.g., Hrbek *et al.*, 2005; Batista & Alves-Gomes, 2006; Santos *et al.*, 2007; Frederico *et al.*, 2012). Alguns estudos realizados com espécies mais sedentárias de médio a pequeno porte, entretanto, contribuíram para um entendimento de padrões e processos ligados à diversificação de alguns clados e o estabelecimento dos atuais padrões de distribuição de algumas espécies (e.g., Lovejoy & de Araújo, 2000; Willis *et al.*, 2007; Farias & Hrbek, 2008).

O grupo *Hemigrammus ocellifer* distribui-se principalmente nas partes de terras baixas ou planícies da bacia amazônica e nas regiões costeiras das Guianas. Lima & Ribeiro (2011) definem as terras baixas do norte da América do Sul cis-andina como uma grande "província biogeográfica" em termos de ictiofauna, com base em aspectos geomorfológicos e ecológicos importantes: a definição de áreas de planície incluindo as bacias de antepaís relacionadas à cordilheira dos Andes, mas também as bacias intracratônicas do vale do baixo Amazonas e fossas tectônicas como a planície do Bananal e o graben do Tacutu, todos situados tipicamente abaixo de 250 metros acima do nível do mar. Hubert & Renno (2006) sugerem que o estabelecimento das biotas

modernas de peixes de água doce da América do Sul, em especial Characiformes, é o resultado de uma interação entre incursões marinhas, elevação dos paleoarcos e conexões históricas que permitem a dispersão da drenagem cruzada. Já para Lima & Ribeiro (2011) a abordagem para entender a biogeografia histórica da fauna de peixes de água doce na América do Sul é identificar padrões de distribuição de taxa monofiléticos e, em seguida, buscar explicações históricas e/ ou contemporâneas para suas distribuições.

Os SNPs permitem comparações de mais de um *locus*, com o qual, em caso de existir congruência nas histórias filogeográficas e populacionais tratadas, se incrementa a probabilidade de que a história que se obtiver seja da espécie ou grupo populacional e não de um gene (Avice, 2000). Na sua vez, a realização de comparações filogeográficas entre várias espécies ou populações codistribuídas, permitiriam a avaliação da existência de padrões filogeográficos e populacionais concordantes (Avice, 2000, Zink, 2002; Cunha & Solé-Cava, 2012). *Hemigrammus ocellifer* se encaixa nesse contexto e pode ajudar a entender e fornecer mais dados para compreender a biogeografia de peixes das áreas baixas da bacia amazônica.

1.3 JUSTIFICATIVA

Hemigrammus, são relativamente fáceis de coletar e são importantes comercialmente para o aquarismo. Estudos genéticos foram conduzidos com o objetivo de testar a hipótese de que esse grupo é monofilético e para servir e identificar quais espécies são válidas no grupo. A identificação correta desse complexo de espécies e suas histórias evolutivas fornecerão dados que permitirão um

entendimento de padrões e processos ligados à diversificação desse clado e a sua comparação com processos de diversificação de outros clados de peixes neotropicais.

1.4 OBJETIVOS

- 1) Testar a hipótese de que as espécies do grupo *Hemigrammus ocellifer* (*H. ocellifer*, *H. neptunus*, *H. guyanensis*, *H. pulcher*, *H. haraldi*, *H. luelingi*, *H. aguaruna*) constituem um grupo monofilético, utilizando dados moleculares.
- 2) Delimitar molecularmente as espécies.
- 3) Realizar estudos filogeográficos em *Hemigrammus ocellifer* para entender como é a estruturação dessa espécie em sua área de distribuição.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, J.S., Tagliacollo, A.V. & Dagosta, F. 2020. Diversification of Neotropical freshwater fishes; Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. 51:27-53
- Albert, J.S., Petry, P. & Reis, R.E. 2011. Major biogeographic and phylogenetic patterns. Pp. 21-57 In: J.S. Albert. & R.E. Reis. (eds.), Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. University of California Press, Berkeley.
- Albornoz-Garzon, J.G., Méndez-López, A., C. Do Nascimento., Lima F.C.T. 2019. A new species of *Hemigrammus* (Characiformes: Characidae) from western Amazon basin, Colombia. Journal of Fish Biology, 95: 932-939.
- Aleixo, A. & Rossetti, F.D. 2007. Avian gene trees, landscape evolution, and geology: towards a modern synthesis of Amazonian historical biogeography? Journal of Ornithology. 148: 443-453
- Antonelli, A., Quijada-Mascareñas, A., Crawford, A.J., Bates, J.M., Velazco, M.P., Wuster, W. 2010. Molecular studies and phylogeography of Amazonian tetrapods and their relation to geological and climatic models. In Amazonia, Landscape and Species Evolution: A looking into the Past, 1s edition. Blackwell Publishing 12.
- Avice, J.C. 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard

University Press, Cambridge, MA. 228p.

Awise, J. C. & Ellis, D. 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London: Biological Sciences* 312:325–342.

Batista, J.S. & Alves-Gomes, J.A., 2006. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes – Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminar evidence for the first case of homing for an Amazonian migratory catfish. *Genetics and molecular research* 5(4): 723-740

Begossi, A., Salivonchyk, S., Glamuzina, B., Alves-Pereira, A., Batista, C. E. D. A., Priolli, R. H. 2021. Filling gaps: fishing, genetics, and conservation of groupers, especially the comb grouper (badejo) (*Mycteroperca acutirostris*), in SE Brazil (2013-2020). *bioRxiv*. Doi: 10.1101/2021.04.12.439484

Behegaray, L.B. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* 17, 3754–3774.

Bejerano G., Pheasant M., Makunin I., Stephen S., Kent W.J., Mattick J.S., *et al.* 2004. Ultraconserved elements in the human genome. *Science* 304, 1321–1325.

Bermingham, E., & Martin, A.P. 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology*, 7, 499-517.

Betancur-R., R., Broughton R.E., Wiley, E.O., Carpenter, K., López, J.A., Li, C., Holcroft, N.I., Arcila D., Sanciangco, M., Cureton II, J.C., Zhang, F., Buser, Y., Campbell, M.A., Ballesteros, J.A., Roa-Varon, A., Willis, S., Borden, W.C., Rowley, T., Reneau P.C., Hough D.J., Lu G., Grande T., Arratia G., Ortí G. 2013. The tree of life and a new classification of bony fishes. *Plos Currents Tree of Life*, 1 Edition.

Bittencourt, P.S., Machado, V.N., Marshall, B.G., Hrbek, T., Farias, I.P. 2020. Phylogenetic relationships of the neon tetras *Paracheiroduon* spp. (Characiformes: Characidae: Stethaprioninae), including comments on *Petitella georgiae* and *Hemigrammus bleheri*. *Neotropical Ichthyology*, 18(2): e190109 [1-11]

Brookes, A.J. 1999. The essence of SNPs. *Review. Gene* 177-186

Bührnheim, C. M., T. P. Carvalho, L. R. Malabarba., S. H. Weitzman. 2008. A new genus and species of characid fish from the Amazon basin - the recognition of a relictual lineage of characid fishes (Ostariophysi: Cheirodontinae: Cheirodontini). *Neotropical Ichthyology*, 6(4): 663-678.

Caetano, A. R. 2009. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38, 64-71.

Carstens, B. C., Pelletier, T. A., Reid, N. M., Satler, J. D. 2013. How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology*, 22, 4369–4383. <https://doi.org/10.1111/mec.12413>

Christoff, A.P. 2017. Genômica e sequenciamento de nova geração. Capítulo 2 *In*: Turchetto-Zolet, A.C, Turchetto, C., Zanella, C.M., Passaia, G. Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologia e Aplicações. pp 21-50

Cunha, H.A & A.M. Solé-Cava. 2012. Análise filogeográfica. *In*: Mاتيoli, S.R.; Fernandes, F.M.C. Biologia Molecular e Evolução. 2a ed. Holos Editora, Ribeirão Preto, Brasil. 256p

Dermitzakis E.T., Reymond A. & Antonarakis S.E. 2005. Conserved non-genic sequences - an unexpected feature of mammalian genomes. *Nature Reviews Genetics* 6, 151–157.

Eigenmann, H.C. 1903. New genera of South American fresh-water fishes, and new names for some old genera. Washington :Smithsonian Institution, 1862-1972. v.45. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/35631>

Eigenmann, C.H. 1918. The American Characidae. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoölogy at Harvard College*, 43(Part. 2): 103-208, pls. 3, 8-11, 13, 16-29, 33, 78-80, 93, 101.

Eigenmann, C.H. 1917. The American Characidae – I. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoölogy at Harvard College*, 43(Part. 1): 1-102, 16 pls.

Faircloth B.C., McCormack J.E., Crawford N.G., Harvey M.G., Brumfield R.T. Glenn T.C. 2012. Ultraconserved elements anchor thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary timescales. *Systematic Biology* 61, 717–726.

Faircloth B.C., Sorenson L., Santini F., Alfaro M.E. 2013. A Phylogenomic Perspective on the Radiation of Ray-Finned Fishes Based upon Targeted Sequencing of Ultraconserved Elements (UCEs). *PLoS ONE* 8.

Farias, I.P. & T. Hrbek. 2008. Patterns of diversification in the discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichlidae) of the Amazon basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49(1): 32-43.

Flecker, S. A. 1996. Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. *Ecology*, vol.77, n6, 1845-1854.

Frederico, R.G., Farias, I.P., de Araújo, M.L.G., Charvet-Almeida P., Alves- Gomes, J.A. 2012. Phylogeography and conservation genetics of the Amazonian freshwater stingray *Paratrygon aiereba* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Neotropical Ichthyology* 10(1): 71-80.

Fricke, R., Eschmeyer, W. N. & Fong, J. D. 2022. Species by Family/Subfamily (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>).

Garvin, M.R; Saitoh, K & Gharret, J. 2010. Application of single nucleotide polymorphisms to non-model species: a technical review. *Molecular Ecology Resources* 10, 915 – 934.

Georges, A., Gruber, B., Greg B., Pauly, G.B., Duanne W.D., Adams, M. Y., Kilian J.M., Zhang, A., Shaffer X., Peter, B.H., Unmack J. 2018. Genome-wide SNP markers breathe new life into phylogeography and species delimitation for the problematic short-necked turtles (Chelidae: *Emydura*) of eastern Australia. *Molecular Ecology*. 2018;27:5195–5213.

Géry, J., 1977. *Characoids of the World*. T. F. H. Publications, Neptune City, New Jersey, 672p.

Géry, J. 1961. *Hemigrammus pulcher haraldi* a new subspecies of a well-know aquarium tetra. *Tropical Fish Hobbyist*, 10(2): 42-47, 50-51.

Gill, T. 1858. Synopsis of the freshwater fishes of the western portion of the island of Trinidad, W.I. *Annals of the Lyceum of Natural History of New York*, 6(10-13): 363-430.

Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM, 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol*. 2: 312.

Hrbek, T.; Farias, I.P & Crossa, M. 2005. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. *Animal Conservation* 8, 297-308.

Hubert N. & Jean-François Renno, 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, 33 (8), p. 1414-1436.

Hosegood, J., Humble, E., Ogden., R. *et al.* 2020. Phylogenomics and species delimitation for effective conservation of manta and devil rays. *Molecular Ecology*.;29:4783–4796. DOI: 10.1111/mec.15683

Javonillo, R., Malabarba, L.R., Weitzma, S.H., Burns, J.R. 2010. Relationships among major lineages characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 498-511.

Kongsstovu, S., Mikalsen, S. O., í Homrum, E., Jacobsen, J. A., Als, T. D., Gislason, H., & Dahl, H. A. 2022. Atlantic herring (*Clupea harengus*) population structure in the Northeast Atlantic Ocean. *Fisheries Research*, 249, 106231. Doi: 10.1016/j.fishres.2022.106231.

Lee, J. Y. & Edwards, S. V. 2008. Divergence across Australia's Carpentarian barrier: statistical phylogeography of the red-backed fairy wren (*Malurus melanocephalus*). *Evolution; international journal of organic evolution*, v. 62, dez. n. 12, p. 3117-34

Lima, F.C.T., Correa, V. & Ota, P.R. 2016. A new species of *Hemigrammus* Gill 1858 (Characiformes: Characidae) from the western Amazon basin in Peru and Colombia. *aqua, International Journal of Ichthyology*, 22(3): 123-132.

Lima, F.C.T., Pires T.H.S., Ohara, W.M., Jerep, F.C., Carvalho, F.R., Marinho, M.M.F., Zuanon, J. 2013. Characidae. Pp. 212-395 *In*: L.J. Queiroz, G. Torrente-Vilara, W.M. Ohara, T.H.S. Pires, J.A.S. Zuanon & C. Dória (eds.), *Peixes do rio Madeira*. Vol. I. A ictiofauna do rio Madeira. *Dialeto Latin American Documentary*, São Paulo.

Lima, F. C. T. & A. C. Ribeiro. 2011. Continental-scale tectonic controls of biogeography and ecology. Pp. 145-164. *In*: J. S. Albert & R. E. Reis (Eds.). Historical biogeography of neotropical freshwater fishes. University of California press.

Lima, F.C.T & L.M Sousa. 2009. A new species of *Hemigrammus* from the upper rio Negro basin, Brazil, with comments on the presence and arrangement of anal-fin hooks in *Hemigrammus* and related genera (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Aqua, International Journal of Ichthyology*, 15(3): 153-168.

Lima, F.C.T., Malabarba L.R., Buckup, P.A., Silva, J.F.P., Vari R.P., Harold, A. Benine, R.C., Oyakawa, O., Pavanelli, C.S. *et al.* 2003. Genera *Incertae Sedis* In Characidae. Pp. 106-169. *In*: Reis, R.E.; S.O. Kullander & C.J. Ferraris-Jr (Orgs.), Check List of Freshwater Fishes of South and Central America, Edipucrs, Porto Alegre, 729p.

Lovejoy, N.R., Lester., Crampton, G.R.W., Marques, P.L.F., Albert, S.J. 2010. Phylogeny, biogeography, and electric signal evolution of Neotropical knifefishes of the genus *Gymnotus* (Osteichthyes: Gymnotidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, Vol 54. Issue 1, pp 278-290.

Lovejoy, N.R., de Araujo, M.L.G. 2000. Molecular systematics, biogeography and population structure of neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. *Molecular Ecology*, 9: 259-268.

Lundberg, J, G. 1993. African–South American freshwater fish clades and continental drift: problems with a paradigm. *In*: Goldblatt, P. Biological Relationships Between Africa and South America. 156–199. Yale University Press, New Haven, CT.

Mariguela, T. C, Ortí. G, Avelino.G.S, Abe.K.T, Oliveira.C. 2013 Composition and interrelationships of a large Neotropical freshwater fish group, the subfamily Cheirodontinae (Characiformes: Characidae): A case study based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 68, n. 1, p. 23-34 Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/75782>.

Mateussi, N.T.B.; Melo, B.F.; Ota, R.P.; Roxo, F.F.; Ochoa, L.E.; Foresti, F. & Oliveira, C. 2020. Phylogenomics of the Neotropical fish family Serrasalminidae with a novel intrafamilial classification (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 153: 106945

Matioli, S.R; Santos, M.R.S.P.S. 2012. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucleicos. *In*: Matioli, S.R.; Fernandes, F.M.C. *Biologia Molecular e Evolução*. 2a ed. Holos Editora, Ribeirão Preto, Brasil. 256p

McGee, M.D; Faircloth, B.C.; Borstein, S.M., Zheng, J.; Hulsey, C.D.; Wainwright, P.C. & Alfaro, M.E. 2016. Replicated divergence in cichlid radiations mirrors a major vertebrate innovation. *Proceedings of the The Royal Society B.*, 283: 2015413

Mérot, C., Stenløkk, K. S., Venney, C., Laporte, M., Moser, M., Normandeau, E., Bernatchez, L. (2022). Genome assembly, structural variants, and genetic differentiation between Lake Whitefish young species pairs (*Coregonus* sp.) with long and short *reads*. *bioRxiv*. Doi: 10.1101/2022.01.15.476463.

Mirande, J.M. 2019. Morphology, molecules and phylogeny of Characidae (Teleostei, Characiformes). *Cladistics* 35: 282-300.

Mirande, J. M. 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): From characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology*, 8, 385–568.

Montoya-Burgos, J.I. 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology* (2003) 12, 1855–1867.

Myers, S.J. 1938. Fresh-water fishes and west Indian zoogeography. Annual Report of the Board of Regents of the Smithsonian Institution 92 (1938, for the year 1937): 339-364.

Near, T.J., R.I. Eytan, A. Dorburg, K.L. Kuhn, J.A. Moore, M.P. Davis, P.C. Wainwright, M. Friedmann & W. Leo Smith. 2012. Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(34): 13698-13703.

Nelson, J.S., Grande, T.C., Wilson, M.V.H. (2016) *Fishes of the World*. 5th Edition, John Wiley and Sons, Hoboken.
<https://doi.org/10.1002/9781119174844>

Ochoa, L.E.; Datovo, A.; Nascimento, C; Roxo, F.F.; Sabaj, M.H.; Chang, J.; Melo, B.F.; Silva, G.S.C; Foresti, F.; Alfaro, M & Oliveira, C. 2020. Phylogenomic analysis of trichomyterid catfishes (Teleostei: Siluriformes) inferred from ultraconserved elements. *Scientific Reports*, 10: 2697.

Olave, M. & Meyer, A. 2020. Implementing Large Genomic Single Nucleotide Polymorphism Data Sets in Phylogenetic Network Reconstructions: A Case Study of Particularly Rapid Radiations of Cichlid Fish. *Syst. Biol.* 69(5):848–86. DOI:10.1093

Oliveira, C., Avelino, G.S., Abe, K.T., Mariguela. T.C., Benine, R.C., Orti, G., Vari R.P., Castro, R.M.C. 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evol Biol* 11: 275

Ota, R, P., Lima F.C.T. & Pavanelli, C.S. 2015. A new species of *Hemigrammus* Gill, 1858 (Characiformes: Characidae) from the central and western Amazon and rio Paraná-Paraguay basins. *Zootaxa* 3948: 218-23

Pelicice, F.M, Santos, V.M.A, Vitule, J.R.S., Orsi, M.L., Junior, D.P.L., Magalhães, A.L.B., Pompeu, P. S., Petreire Jr, M., Agostinho, A.A. 2017. Neotropical freshwater fishes imperilled by unsustainable policies. *Fish and Fisheries*; 18: 1119 – 1133

Planquette, P., Keith, P., Bail, L.P.V. 1996. Atlas des poissons d'eau douce de Guyane (tome I). Collection du Patrimoine Naturel, vol. 22. IEGB-MNHN, INRA, CSP, Min. Env., Paris. 429pp.

- Pennisi E. 2013. Large-scale gene comparisons boost tree of life studies. *Science* 342: 26-27.
- Ranalla, B. 2015. The art and science of species delimitation. *Current Zoology* 61 (5): 846–853
- Ranalla, B, Yang, Z. 2020. Species Delimitation. Scornavacca, Celine; Delsuc, Frédéric; Galtier, Nicolas. *Phylogenetics in the Genomic Era*, No commercial Publisher. Authors open access book, pp.5.5:1–5.5:18, 2020. hal-02536468
- Reis, R.E., Albert, J.S., Di Darios, F., Mincarones, M.M & Rocha, L.A. 2016. Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of Fish Biology* 89, 12-47.
- Ribeiro, A.C., Lima, F.C.T. & Menezes, N.A.. 2011. Biogeografia dos peixes de água doce da América do Sul. *In* Carvalho, C.J.B & E.A.B Almeida. *Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos*. São Paulo: Editora Roca. 305 p.
- Ross HA, Murugan S, Li WLS, 2008. Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation. *Syst. Biol.* 57: 216–230. Sites JW, Marshall JC, 2003. Delimiting species: A Renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol. Evol.* 18: 462–470.
- Sandelin A., Bailey P., Bruce S., Engström P.G., Klos J.M., Wasserman W.W., *et al.* 2004. Arrays of ultraconserved non-coding regions span the loci of key developmental genes in vertebrate genomes. *BMC Genomics* 5, 1–9.
- Santos, M.C.F.; Ruffino, M.L.; Farias, I.P. 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. *Journal of Fish Biology* 71, 1-12.
- Shaffer, H.B & Thomson, R. 2007. Delimiting species in recent radiations. *Syst. Biol.* 56(6):896–906
- Siepel A., Bejerano G., Pedersen J.S., Hinrichs A.S., Hou M., Rosenbloom K., *et al.* 2005. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Research* 15, 1034–1050.
- Sites, J.W., & J. C. Marshall. 2003. Delimiting species: A Renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol. Evol.* 18:462–470.
- Steindachner, F. 1882. Beiträge zur Kenntniss der Flussfische Südamerikas (IV). *Anzeiger der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Klasse*, 19(9): 175-180.
- Sukumaran, J., & Knowles, L. L. 2017. Multispecies coalescent delimits structure, not species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, 1607–1612. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607921114>
- Thomas, M. A & Klaper, R. 2004. Genomics for the ecological toolbox. *Trends in ecology & evolution*, v. 19, n. 8, p. 439-45

Thomson, R. C.; Wang, I. J.; Johnson, J. R. 2010. Genome-enabled development of DNA markers for ecology, evolution and conservation. *Molecular Ecology*, v. 19, n. 11, p. 2184-95.

Thomson, R. C, Shedlock, A.M, Edwards, S.V, Shaffer, H.B 2008. Developing markers for multilocus phylogenetics in non-model organisms: A test case with turtles. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 49, n. 2, p. 514-25.

Turchetto-Zolet, A.C & Zanella, C.M. 2017. Marcadores genéticos baseados em DNA. Capítulo 1. *In: Turchetto-Zolet, A.C, Turchetto, C., Zanella, C.M., Passaia, G. Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologia e Aplicações.* pp12-20

Turchetto-Zolet, A.C, Turchetto, C, Guzman, F. Silva-Arias, G.A., Ludwig, F;S. Veto, N.M. 2017. Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) metodologias de identificação e aplicações. *In: Turchetto-Zolet, A.C, Turchetto, C., Zanella, C.M., Passaia, G. Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologia e Aplicações.* 132 - 179

Unmack, P. J., Adams, M., Hammer, M. P., Johnson, J. B., Gruber, B., Gilles, A & Georges, A. (2022). Plotting for change: an analytical framework to aid decisions on which lineages are candidate species in phylogenomic species discovery. *Biological Journal of the Linnean Society*, 135(1), 117-137. Doi: 10.1093/biolinnean/blab095.

Weitzman, S.H & Palmer, L. 1997. A new species of *Hyphessobrycon* (Teleostei: Characidae) from the Neblina region of Venezuela and Brazil, with comments on the putative "rosy tetra clade". *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 7: 209–242.

Weitzman, S.H & W. Fink. 1983. Relationships of the neon tetras, a group of South American freshwater fishes (Teleostei, Characidae), with comments on the phylogeny of new world Characiformes. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 150(6): 339-395.

Wiens, J.J. 2007. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Syst. Biol.* 56(6):875–878

Willis, S.C., Nunes, M.S., Montaña, C.G., Farias, I.P., Lovejoy, N.R. 2007. Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44: 291-307.

Woolfe A., Goodson M., Goode D.K., Snell P., McEwen G.K., Vavouri T., *et al.* 2004. Highly Conserved Non-Coding Sequences Are Associated with Vertebrate Development. *PLoS Biology* 3, e7.

Zink, R. M. 2002. Methods in comparative phylogeography, and their application to studying evolution in the north american aridlands. *Integrative and Comparative Biology*, v. 42, n. 5, p. 953-9

MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os materiais e métodos, resultados e discussão estão separados em dois capítulos:

Capítulo 1 - História evolutiva com base na análise de elementos ultraconservados (UCEs)

Capítulo 2 – Estudos de genética populacional com espécies do grupo *Hemigrammus ocellifer* por marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP)

CAPÍTULO 1

História evolutiva com base na análise de elementos ultraconservados (UCEs)

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem de táxons e preparação de biblioteca

Foram obtidos tecidos de sete espécies do grupo *Hemigrammus ocellifer* e 41 espécies de grupo externo de Characidae (Quadro 1). Todos os tecidos dos táxons estavam disponíveis no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da UNESP/Botucatu, os vouchers estão presentes na frente da espécie na árvore filogenética (Figura 1).

Quadro 1 – Táxons utilizados para a biblioteca genômica

GRUPO <i>Hemigrammus ocellifer</i>
<i>H. aguaruna</i> Lima, Correa & Ota, 2016
<i>H. guyanensis</i> Géry, 1959
<i>H. haraldi</i> Géry, 1961
<i>H. luelingi</i> Géry, 1964
<i>H. neptunus</i> Zarske & Géry, 2002
<i>H. ocellifer</i> (Steindachner, 1882)
<i>H. pulcher</i> Ladiges, 1938
GRUPO EXTERNO
<i>Hemigrammus</i>
<i>H. analis</i> Durbin, 1909
<i>H. ataktos</i> Marinho, Dagosta & Birindelli, 2014
<i>H. barrigonae</i> Eigenmann & Henn, 1914
<i>H. bellotti</i> (Steindachner, 1882)
<i>H. bleheri</i> Géry & Mahnert, 1986
<i>H. boesemani</i> Géry, 1959
<i>H. cf. melanochorus</i> Fowler, 1913
<i>H. diagonalis</i> Medonça & Wosiacki, 2011
<i>H. erythrozonus</i> Durbin, 1909
<i>H. hyanuary</i> Durbin, 1918
<i>H. levis</i> Durbin, 1908
<i>H. lunatus</i> Durbin, 1918
<i>H. machadoi</i> Ota, Lima & Pavanelli, 2014
<i>H. marginatus</i> Ellis, 1911
<i>H. microstomus</i> Durbin, 1918
<i>H. ora</i> Zarske, Le Bail & Géry, 2006
<i>H. pretoensis</i> Géry, 1965
<i>H. rodway</i> Durbin, 1909
<i>H. schmardae</i> (Steindachner, 1882)
<i>H. stictus</i> (Durbin, 1909)

<i>H. ulreyi</i> (Boulenger, 1895)
<i>H. unilineatus</i> (Gill, 1858)
<i>H. vorderwinkleri</i> Géry, 1963
<i>Astyanax bimaculatus</i> (Linnaeus, 1758)
<i>Astyanax jordani</i> (Hubbs & Innes, 1936)
<i>Axeroldia lindeae</i> Géry, 1973
<i>Bario steindachneri</i> (Eigenmann, 1893)
<i>Bryconella pallidifrons</i> (Fowler, 1946)
<i>Hyphessobrycon bayelyi</i> Lima, Bastos, Rapp Py-Daniel & Ota 2022
<i>Hyphessobrycon compressus</i> (Meek, 1904)
<i>Hyphessobrycon eques</i> (Steindachner, 1882)
<i>Hyphessobrycon heterorhabdus</i> (Ulrey, 1894)
<i>Jupiaba anteroides</i> (Géry, 1965)
<i>Jupiaba polylepis</i> (Gunther, 1864)
<i>Jupiaba poranga</i> Zanata, 1907
<i>Moenkhausia oligolepis</i> (Gunther, 1864)
<i>Moenkhausia xinguensis</i> (Steindachner, 1882)
<i>Paracheirodon axelrodi</i> (Schultz 1956)
<i>Parapristella aubynei</i> (Eigenmann, 1909)
<i>Parapristella georgiae</i> Géry, 1964
<i>Charax leticiae</i> Lucena, 1987

2.1.1 Extração e sequenciamento de DNA

O DNA foi extraído de músculos, brânquias ou tecidos de nadadeiras com DNeasy Kit de tecido (Qiagen Inc.) seguindo as instruções do fabricante. Então, 2 µl de cada DNA genômico foi quantificado usando fluorometria (Qubit, Life Technologies) para preparar as bibliotecas usando uma concentração entre 10 e 40 ng/µl. As bibliotecas de DNA e o sequenciamento foram realizados na Arbor Biosciences (AB; arborbiosci.com; Ann Arbor, MI, EUA). O DNA genômico inteiro (40 ng/µl) foi primeiro cortado com um instrumento QSonica Q800R e selecionado para comprimentos modais de aproximadamente 500 nt usando uma limpeza de esferas SPRI de etapa dupla para preparar as bibliotecas.

Bibliotecas de DNA foram preparadas para os 7 táxons do grupo interno e 41 táxons do grupo externo, modificando o protocolo de preparação de biblioteca Nextera

(Epicentre Biotechnologies) para enriquecimento de alvo baseado em solução seguindo Faircloth *et al.* (2012) e o número de ciclos de PCR seguindo a recomendação de Faircloth *et al.* (2013). A equipe da AB usou o protocolo de preparação da biblioteca Nextera de transposição *in vitro* seguido por PCR para cortar o DNA e anexar adaptadores de sequenciamento (Adey *et al.*, 2010). O kit Epicenter Nextera foi usado posteriormente para preparar bibliotecas mediadas por transposase com tamanhos de inserção médios de 100 pb (IC 95%: 45 pb) seguindo Adey *et al.* (2010). As bibliotecas foram enriquecidas usando um novo conjunto de sondas desenvolvido para peixes ostariofíseos que captura dados de sequência para 2.708 *loci* UCE (Faircloth *et al.*, 2020). Em seguida, o DNA foi convertido em bibliotecas de sequenciamento Illumina com uma versão ligeiramente modificada do NEBNext(R) Ultra (TM) DNA Library Prep Kit for Illumina(R). Após a ligação dos primers de sequenciamento, as bibliotecas foram amplificadas usando KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems) por seis ciclos usando o perfil térmico recomendado pelo fabricante e primers indexados P5 e P7 duplos (Kircher *et al.*, 2012). Após purificação com esferas SPRI, as bibliotecas foram quantificadas com o kit Quant-iT(TM) Picogreen (R) dsDNA Assay (ThermoFisher). A equipe da AB então enriqueceu pools compreendendo 100 ng de cada uma das oito bibliotecas (800 ng no total) usando o sistema MYbaits(R) Target Enrichment (MYcroarray) seguindo a versão 3.0 do manual. O sequenciamento foi realizado em duas pistas de 100 bp de extremidade emparelhada Illumina HiSeq usando química v4.

2.1.2 Processamento de dados de sequência

Após o sequenciamento foram removidos os adaptadores e as sequências de baixa qualidade, contendo bases ambíguas, foram removidas usando o pipeline de

software Illumiprocessor (Faircloth *et al* 2013; <https://github.com/faircloth-lab/illumiprocessor>). Após o corte, os assembled Illumina foram lidos em contigs espécie por espécie usando o programa Velvet (Zerbino & Birney, 2008) no VelvetOptimiser (<https://github.com/VictorianBioinformatics-Consortium/VelvetOptimiser>). Após a montagem, foi usado um programa Python personalizado ([match contigs to probes.py](#)), disponível em PHYLUCE (Faircloth, 2016), integrando LASTZ (Harris, 2007) para alinhar contigs específicos de espécies ao nosso conjunto probe-UCE. Durante o alinhamento, o último programa cria uma base de dados relacional de correspondências para loci UCE por táxon. Em seguida, usamos o programa `get_match_counts.py` (também em PHYLUCE) para consultar o banco de dados e gerar arquivos FASTA para loci UCE que foram identificados em todos os táxons. Um programa Python personalizado ([seqcap_align_2.py](#)) foi então usado para alinhar contigs usando o algoritmo de alinhamento MUSCLE (Edgar, 2004) e para realizar o corte de borda cortando bordas mal alinhadas de cada alinhamento UCE (Faircloth, 2016).

2.1.3 Análise Filogenética

Uma análise de máxima verossimilhança (ML) foi realizada com matrizes contendo 50%, 75% e 90% de dados para todos os exemplares (Tabela 1). As árvores filogenéticas foram enraizadas no clado *Charax leticiae*. Para análises de ML, os dados foram particionados para explicar a variação nas taxas e padrões de evolução entre sites usando PartitionUCE (Tagliacollo & Lanfear, 2018) e os modelos de substituição estimados com cluster em PartitionFinder v2 (Lanfear *et al.*, 2014, 2016) até RAxML v8.0 (Stamatakis, 2006). A análise de bootstrapping a posteriori foi

conduzido até a convergência de réplicas de bootstrap usando o autoMRE função em RAxML (Pattengale *et al.*, 2010; Stamatakis, 2014).

Tabela 1 - Distintas matrizes analisadas com base em diferentes esquemas de partições de dados e cortes de dados de sequência de RAxML

Matriz	Total de pares de base
50%	1820
75%	1328
90%	463

2.2 RESULTADOS

O sequenciamento e a filtragem de dados produziram um corte inicial de matriz alinhada compreendendo 2.443 *loci* UCE para 48 espécimes (7 espécies do grupo *Hemigrammus ocellifer* e 41 táxons externos). O total da matriz incluiu 29.098.927 caracteres, dos quais 23.958.546 são nucleotídeos. O comprimento médio dos *locus*, após o alinhamento e corte, foi de 336,09 nucleotídeos (intervalo: 100 – 1.433). A matriz com alinhamento completo utilizada foi de 75% completos, com 1.328 UCEs e 526.503pb, gerando uma árvore com nós, em sua maioria, com 100% de bootstrap. (Figura 01).

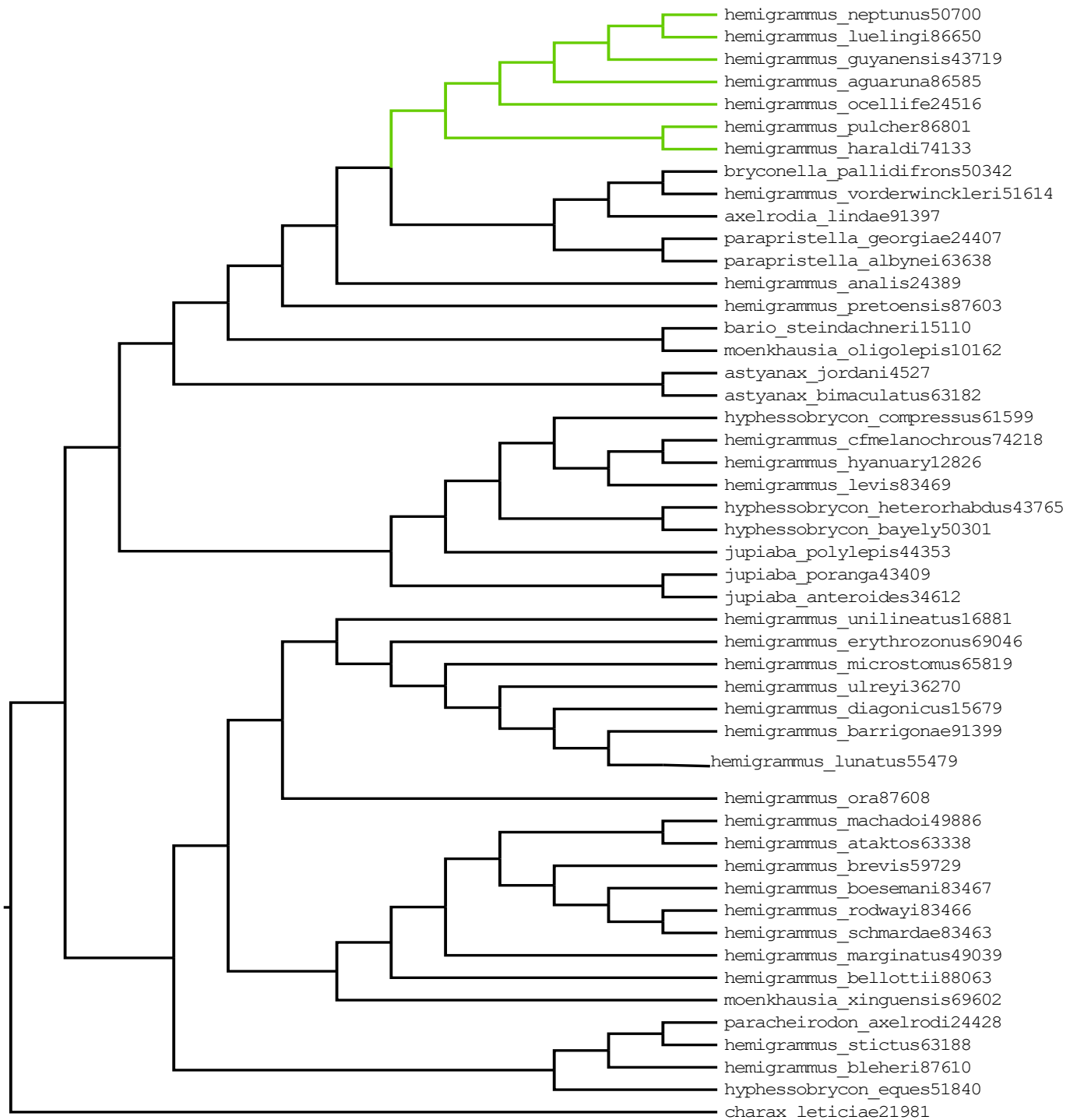


Figura 1 - Árvore filogenética de máxima probabilidade (RAxML) mostrando o grupo de espécies de *Hemigrammus ocellifer* (em verde) e dos grupos externos dentro da família Characidae

Todas as espécies do grupo *Hemigrammus ocellifer* formaram um clado monofilético. Um clado é formado pelas espécies irmãs *H. neptunus* e *H. luelingi*,

divergindo delas *H. guyanensis*, *H. aguaruna* e *H. ocellifer*. O clado irmão é formado pelas espécies irmãs *H. pulcher* e *H. haraldi*.

O clado-irmão do grupo *Hemigrammus ocellifer* é formado pelas duas espécies do gênero *Parapristella*, *Axelrodia lindeae*, *Hemigrammus vorderwinkleri*, e *Bryconella pallidifrons*.

A árvore filogenética apresenta dois grandes clados, sendo que um estão o grupo do *Hemigrammus ocellifer* e no outro está a espécie tipo do gênero (= *Hemigrammus unileniatus*), portanto, formando cada grupo-irmão bem distante entre eles. Isso indica que o grupo *H. ocellifer*, não pertence ao gênero *Hemigrammus*.

2.3 DISCUSSÃO

As publicações taxonômicas/sistemáticas abordando o gênero *Hemigrammus* são majoritariamente descrições de novas espécies, ou trabalhos de filogenia que tratam da família Characidae ou da ordem Characiformes, e que incluem algumas espécies do gênero. Pouco se sabe sobre as relações filogenéticas de *Hemigrammus*, seja entre suas espécies, ou entre elas e outros gêneros de Characidae, porém, diversos autores corroboram a hipótese de que *Hemigrammus* não seja um grupo natural (Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Mirande, 2010, 2019), o que indica que provavelmente muitas espécies hoje alocadas em *Hemigrammus* sejam mais relacionadas filogeneticamente a outros gêneros de Characidae. Pela primeira vez Lima & Souza (2009) e Lima *et al.* (2016), propõe possivelmente um grupo monofilético (sem testes filogenéticos) dentro do gênero *Hemigrammus* que são as espécies do grupo *H. ocellifer*, composto por nove espécies, o que foi aqui confirmado pelos dados genéticos de sete dessas espécies utilizando dos UCEs.

Mirande (2010) propõe o clado *Hemigrammus* composto por *Bario*, *Deuterodon*, *Hasemania*, *Hemigrammus*, *Hyphessobrycon*, *Moenkhausia*, *Myxiops?*, *Paracheirodon*, *Petitella?*, *Pristella*, *Probolodus*, e *Thayeria*, sendo que a única sinapormofia para este clado é um processo ósseo dorsal no rinosfenoide, que separa os nervos oftálmicos orientados anteriormente; este caráter, por sua vez é muito homoplástico. Posteriormente, Mirande (2019) aloca *Hemigrammus* na subfamília Stethaprioninae, da tribo Stethaprionini que também inclui um clado chamado *Hemigrammus* onde estão gêneros como *Moenkhausia*, *Aphyodite* e *Hemigrammus* (especificamente, *H. unilineatus*, *H. ulreyi* e *H. rodwayi*). Na mesma subfamília o autor propõe a tribo Gymnocharacini onde *Hemigrammus* cf. *lunatus* (= *Hemigrammus changae*) forma com o grupo-irmão de *H. pulcher*, *H. haraldi* e *H. aguaruna* (estes últimos sendo espécies irmãs) uma tricotomia e o clado irmão seria constituído por *Deuterodon potaroensis*, *Jupiaba polylepis* e *Jupiaba anteroides*. Na árvore filogenética aqui apresentada, *Jupiaba poranga*, *J. polylepis* e *J. anteroides* não são recuperadas como clado irmão do grupo de espécies *H. ocellifer*. Nela *H. haraldi* e *H. pulcher* são espécies irmãs o que concorda com Géry (1977) que considerou *H. haraldi* como uma subespécie (*Hemigrammus pulcher haraldi*) de *H. pulcher*.

Hemigrammus falsus Meiken foi proposta como um sinônimo júnior de *H. ocellifer* por Frankel (2002), baseado em experimentos de cruzamento que examinaram a herança da pigmentação no pedúnculo caudal: “O peixe-farol (*Hemigrammus ocellifer*) exibe dois fenótipos associados com manchas na base da nadadeira caudal (*H. ocellifer ocellifer*) ou faltando (*H. ocellifer falsus*). Zarske (2015), entretanto, revalidou *H. falsus*, apontando que a verdadeira distinção entre *H. ocellifer* e *H. falsus* é a presença neste último a de uma faixa escura estreita longitudinal médio-lateral estendendo-se imediatamente atrás da segunda mancha umeral para a

mancha do pedúnculo caudal, que está ausente em *H. ocellifer*. Para Lima *et al.* (2016) a presença de uma estreita faixa médio-lateral conectada a mancha no pedúnculo caudal em *H. falsus* de fato diferencia esta espécie de *H. ocellifer*, que não apresenta uma faixa longitudinal diferente de um escuro muito fino na linha ao longo do septo médio lateral, porém, não a diagnostica de *H. guyanensis* e *H. neptunus*, já que ambas as espécies também apresentam uma faixa escura médio-lateral conectada à mancha do pedúnculo caudal. Aparentemente, a faixa escura médio-lateral em *H. falsus* é mais larga do que aquele presente em *H. guyanensis* e *H. neptunus* (F.C.T. Lima & R.P. Ota, dados não publicados). Entretanto, é possível que *H. guyanensis* seja um sinônimo júnior de *H. falsus* (Lima *et al.*, 2016), apesar dessa hipótese não ter sido testada neste trabalho. *Hemigrammus luelingi* é recuperada como espécie irmã de *H. neptunus*, embora morfologicamente seja uma das espécies mais distintas do grupo, tanto no colorido como na morfologia da região oral (F.C.T. Lima & R.P. Ota, dados não publicados).

Devido a essa dificuldade morfológica em separar *H. neptunus*, *H. guyanensis* e *H. falsus* seria de esperar que as três primeiras espécies fossem mais aparentadas na árvore filogenética de UCEs, o que, contudo, não se confirmou, sugerindo que as similaridades morfológicas podem ser as homoplasias, hipótese essa que precisa ser testada em estudos futuros.

Na descrição de *H. aguaruna* (Lima *et al.*, 2016), esta espécie é apontada como mais próxima de *H. yinyang*. *Hemigrammus aguaruna* pode ser prontamente distinguida das demais congêneres do grupo de espécies *H. ocellifer*, com exceção de *H. yinyang*, por apresentar uma segunda mancha umeral muito conspícua, intensamente escura, aproximadamente oval e horizontalmente alongada (vs. segunda mancha umeral menos desenvolvida que a primeira mancha umeral,

verticalmente alongada e muito estreita). Infelizmente, não foi possível obter amostras de *H. yinyang* para a presente análise.

Como pode ser depreendido, ainda existem várias incertezas taxonômicas em relação às espécies do grupo *Hemigrammus ocellifer*, mas um estudo taxonômico amplo envolvendo as espécies do grupo está sendo atualmente desenvolvido por F.C.T Lima e R.P. Ota (comunicação pessoal).

2.3.1 HOLOPRISTIS Eigenmann, 1903

Espécie tipo – *Tetragonopterus ocellifer* Steindachner, 1882

Como caracteres diagnósticos para *Holopristis* foi definido o pré-maxilar com duas séries de dentes, suas coroas formando uma “cumeeira” (“ridge”) e o maxilar com dentes ao longo de toda sua borda, e a ausência de espinho pré-dorsal (Eigenmann, 1903). Nenhum desses caracteres realmente pode ser considerado diagnóstico uma vez que a coroa contínua entre os dentes é uma característica comum em Characidae, assim como a ausência de espinho pré-dorsal, e a presença de dentes ao longo do maxilar foi um erro de observação por Eigenmann (1903), já que *Hemigrammus ocellifer* possui poucos dentes no maxilar. Atualmente *Holopristis* é considerado sinônimo júnior de *Hemigrammus*.

O gênero *Hemigrammus* não é monofilético, porém Lima & Sousa (2009) e Lima *et al.* (2016) propõem que o grupo de espécies *Hemigrammus ocellifer* como monofilético. As nossas análises de genômica com elementos ultraconservados com 1.328 UCEs e 526.503pb, gerando uma árvore filogenética com nós em sua maioria com 100% de bootstrap, confirmam o monofiletismo deste grupo.

Morfologicamente o grupo pode ser definido pela presença da combinação de duas manchas umerais, uma mancha no pedúnculo caudal, margem superior do olho vermelha em espécimes vivos, e uma distinta morfologia dos ganchos da nadadeira anal em machos maduros, onde um único gancho de tamanho médio por raio da nadadeira anal está presente ao longo da parte anterior dos raios (Lima & Souza, 2009; Lima *et al.*, 2016). A morfologia e arranjo dos ganchos das nadadeiras anais no grupo podem ser divididos em dois tipos: 1) o primeiro, apresentado por *H. aguaruna*, *H. guyanensis*, *H. neptunus*, *H. ocellifer* e *H. yinyang*, onde os ganchos são de tamanho médio e se estendem do último raio não ramificado ao quarto ao sétimo raio ramificados da nadadeira anal; 2) enquanto o segundo, presente em *H. haraldi*, *H. luelingi* e *H. pulcher*, os ganchos são relativamente grandes e reduzidos em número, estendendo-se desde o último raio não ramificado até no máximo o terceiro raio ramificado da nadadeira anal (Lima & Sousa 2009).

A subfamília Stethaprioninae inclui alguns dos mais diversos e problemáticos gêneros da família Characidae (*Astyanax*, *Hemigrammus*, *Hyphessobrycon* e *Moenkhausia*) sendo necessário mudanças nomenclaturais e a definição de vários novos gêneros para se tornarem monofiléticos (Mirande, 2019). Como o grupo de espécies de *Hemigrammus ocellifer* com dados morfológicos e genômicos definem o grupo como monofilético, aqui sendo proposto que estas espécies sejam transferidas para o gênero *Holopristis*, atualmente considerado como um sinônimo júnior de *Hemigrammus*, que seria, portanto, revalidado. Além disso, o grupo *H. ocellifer* não está relacionado com a espécie tipo de *Hemigrammus* que é *H. unilineatus*.

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gênero *Hemigrammus* não é monofilético. Com o uso de dados genômicos, os elementos ultraconservados UCEs e o uso de dados morfológicos presentes na literatura como de padrões coloridos e os arranjos ganchos da nadadeira anal de machos maduros, podemos corroborar um grupo monofilético dentro desse gênero, representado pelas espécies do grupo *Hemigrammus ocellifer*. O presente estudo sugere a revalidação do gênero *Holopristis* para alocar essas espécies, e com isso auxiliar na elucidação das relações filogenéticas e da classificação da família Characidae.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adey, A., Morrison H.G., A., Xun, X.u., Kitzman, J.O., Turner, E.H., Stackhouse, B., MacKenzie, A.P., Caruccio, N.C., Zhang, X., Shendure, J., 2010. Rapid, low-input, low-bias construction of shotgun fragment libraries by high-density in vitro transposition. *Genome Biol.* 11 (12), R119. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-12-r119>.

Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nuc. Acid. Res.* 32 (5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.

Eigenmann, H.C. 1903. New genera of South American fresh-water fishes, and new names for some old genera. Washington :Smithsonian Institution, 1862-1972. v.45. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/35631>

Faircloth, B.C., Alda, F., Hoekzma, K., Burns, M.D., Oliveira, C., Albert, J.S., Melo, B.F., Ochoa, L.E., Roxo, F.F., Chakrabarty, P., Sidlauskas, B.L., Alfaro, M.E., 2020. A target enrichment bait set for studying relationships among ostariophysan fishes. *Copeia* 108, 47–60. <https://doi.org/10.1643/CG-18-139>.

Faircloth, B.C., 2016. PHYLUCE is a software package for the analysis of conserved genomic loci. *Bioinformatics* 32 (5), 786–788. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv646>.

Faircloth, B.C., Sorenson, L., Santini, F., Alfaro, M.E., Moreau, C.S., 2013. A phylogenomic perspective on the radiation of ray-finned fishes based upon targeted sequencing of ultraconserved elements (UCEs). *PLoS ONE* 8 (6), e65923.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065923>

Faircloth, B.C., McCormack, J.E., Crawford, N.G., Harvey, M.G., Brumfield, R.T., Glenn, T.C., 2012. Ultraconserved elements anchor thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary timescales. *Syst. Biol.* 61, 717–726. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys004>.

Frankel, J.S. 2002. Caudal spotting in the beacon fish (*Hemigrammus ocellifer*, Characidae). – *Journal of Heredity*, 93(4): 285 – 286.

Géry, J. 1977. Characoids of the world. T.F.H. Publications, Neptune City, 677 pp.

Harris, R., 2007. Improved Pairwise Alignment of Genomic DNA. The Pennsylvania State University. Ph.D. thesis.

Javonillo, R., Malabarba L.R., Weitzman, S.H., Burns, J.R. 2010. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 498-511.

Kircher, M., Sawyer, S., Meyer, M., 2012. Double indexing overcomes inaccuracies in multiplex sequencing on the Illumina platform. *Nucleic Acids Res.* 40 (1), e3 <https://doi.org/10.1093/nar/gkr771>.

Lanfear, R., Frandsen, P.B., Wright, A.M., Senfeld, T., Calcott, B., 2016. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 34, 772–773

Lanfear, R., Calcott, B., Kainer, D., Mayer, C., Stamatakis, A., 2014. Selecting optimal partitioning schemes for phylogenomic datasets. *BMC Evol. Biol.* 14 (1), 82. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-82>.

Lima, F.C.T., Correa, V. & Ota, P.R. 2016. A new species of *Hemigrammus* Gill 1858 (Characiformes: Characidae) from the western Amazon basin in Peru and Colombia. *aqua, International Journal of Ichthyology*, 22(3): 123-132

Lima, F.C.T & L.M Sousa. 2009. A new species of *Hemigrammus* from the upper rio Negro basin, Brazil, with comments on the presence and arrangement of anal-fin hooks in *Hemigrammus* and related genera (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Aqua, International Journal of Ichthyology*, 15(3): 153-168.

Mirande, J.M. 2019. Morphology, molecules and phylogeny of Characidae (Teleostei, Characiformes). *Cladistics* 35: 282-300.

Mirande, J.M. 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology*, 8(3): 385-568.

Oliveira, C., Avelino, G.S., Abe, K.T., Mariguela, T.C., Benine, R.C., Orti, G., Vari, R.P., Castro, R.M.C. 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evol Biol* 11: 275

Pattengale, N.D., Alipour, M., Bininda-Emonds, O.R.P., Moret, B.M.E., Stamatakis, A.,

2010. How many bootstrap replicates are necessary? J. Comput. Biol. 17 (3), 337–354. <https://doi.org/10.1089/cmb.2009.0179>.

Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics 30, 1312–1313. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033.

Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics 22, 2688–2690. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446>.

Tagliacollo, V.A., Lanfear, R., 2018. Estimating improved partitioning schemes for ultraconserved elements. Mol. Biol. Evol. 35, 1798–1811. doi: 10.1093/molbev/msy069.

Zarske, A. 2015. *Hemigrammus rubrostriatus* spec. nov. - ein neuer Salmmler aus Kolumbien und Revalidierung von *Hemigrammus falsus* Meinken, 1958 (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). *Vertebrate Zoology* 65: 3-14.

Zerbino, D.R., Birney, E., 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. Genome Res. 18 (5), 821–829. <https://doi.org/10.1101/gr.074492.107>.

Capítulo 2

Estudos de genética populacional com espécies do grupo *Hemigrammus ocellifer* por marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extração de DNA

Para o desenvolvimento da biblioteca genômica de SNPs, o DNA genômico foi extraído do tecido muscular, com o *Kit Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, EUA). As concentrações de DNA das amostras foram quantificadas no *Qubit 4.0 Fluorometer* (Invitrogen), com o *Qubit™ dsDNA BR Assay Kit*, após essa etapa de quantificação, cada amostra foi padronizada para uma concentração final de 200ng/μl (Peterson *et al.*, 2012), com volume final de 34 μl e resultando em 5,8 ng/μl.

3.1.2 Construção da biblioteca *ddRAD* para SNPs

A técnica de sequenciamento de DNA associado ao sítio de restrição de dupla digestão (*ddRAD* - double digestion Restriction Associated DNA sequencing) é muito utilizado para sequenciar um conjunto de marcadores de todo o genoma com uma representação reduzida, sendo os SNPs um dos marcadores mais utilizados (Turchetto-Zolet *et al.*, 2017).

Foram realizadas a construção das bibliotecas genômicas utilizando o protocolo *ddRADSeq* adaptado por Campos *et al.* (2017), seguindo as diretrizes de Peterson *et al.* (2012), desenvolvido no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBGP). Para a construção da biblioteca genômica foram utilizados 56 indivíduos do gênero *Hemigrammus*, sendo representantes das espécies *Hemigrammus ocellifer* (n=38), *H. neptunus* (n=05), *H. guyanensis* (n=01), *H. aguaruna* (n=04), *H. haraldi* (n=06) e *H. luelingi* (n=02).

3.1.3 Digestão enzimática

A preparação das bibliotecas genômicas reduzidas iniciou com a reação de dupla digestão enzimática (*Double digest*), utilizamos um total de 34 µl de DNA (5,8 ng/µl), 1 µl de cada enzima *EcoRI* (20U/µl – corte raro) e *MspI* (10U/µl – corte frequente) (Peterson *et al.*, 2012), 4µl TANGO *buffer* (*Cut Smart*), em um volume final de 40µl, o material foi digerido por três horas em temperatura a 37°C.

As amostras do material digerido foram purificadas por *beads* (esferas) utilizando o kit de Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, USA), de acordo com o protocolo do fabricante, eliminando fragmentos de tamanhos menores que 100 pares de bases. Depois da purificação do DNA digerido, as amostras foram quantificadas novamente no *Qubit*, em seguida realizamos a ligação dos adaptadores.

3.1.4 Ligação de adaptadores

Os adaptadores P1 (2,0 mM) e P2 (5,0 mM) foram ligados aos fragmentos digeridos na reação de ligação, com o volume final de 40µl, com 2,0µl de adaptador específico de cada uma das enzimas, 4µl de T4 Ligase Buffer 1X (Promega), 0,5µl da enzima T4 Ligase (Promega), e 31,5µl do material digerido. Em seguida, as amostras ligadas aos adaptadores foram incubadas a uma temperatura a 23°C em 30 min, 65°C a 10 min, 63°C a 90 s, diminuindo gradativamente a temperatura a cada 2°C em 90 s, até atingir a temperatura de 23°C. Posteriormente, as amostras da reação de ligação dos adaptadores foram purificadas pelas *beads*.

3.1.5 Indexação

Para reação de indexação, foram inseridas em cada amostra a sequência de complemento Nextera® Index Primers (Illumina, San Diego EUA) H5 e H7 (Nextera DNA CD Indexes), nos incertos ligados aos adaptadores. A reação de indexação constituiu de 15µl do produto de ligação, 5µl de cada index H5 e H7, 25µl de Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific), a fim de obter um volume final de 50µl. Para a correta identificação das amostras, foi utilizada uma combinação única de index, com os respectivos *barcode*.

A reação de PCR para indexação foi realizada de acordo com as seguintes condições de ciclo: 72°C por 3 min, após, duas etapas de desnaturação a 95°C por 30 s, seguindo-se 16 ciclos a 95°C por 30 s, um passo de anelamento a 55°C por 30 s, um passo de extensão a 72°C por 30 s e a extensão final a 72°C por 5 min. Após a reação de PCR de indexação os *amplicons* foram purificados com as *beads*.

3.1.6 Construção do *Pool* e *Size selection*

As amostras purificadas foram quantificadas no *Qubit*, em seguida as mesmas foram padronizadas a uma concentração de 10ng/µl, todas amostras foram mescladas em um *pool*, purificado com *beads* e novamente quantificados. Depois foi realizado um *size selection*, escolhendo os fragmentos do tamanho de interesse (300-500 *pb*). A realização do *size selection* o volume total obtido (+/- 40µl), foi inserido no gel de agarose a 1%, corado com o intercalante SYBRTM Safe DNA Gel Stain (Invitrogen), tendo como peso molecular o 1kb *DNA Ladder*. Ao final, realizamos o *size selection* (corte) na região do gel de agarose entre 300-500 *pb*.

Realizamos as etapas de purificação do gel com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EUA), seguindo instruções do fabricante, em seguida, foi realizada a última quantificação no Qubit. Logo após foi realizada uma PCR em tempo real (qPCR), desta forma, foi possível determinar a concentração da biblioteca para o sequenciamento. A biblioteca foi normalizada e desnaturada, sendo sequenciada com leituras de extremidade única de 150 *pb* (*single end*) na plataforma NGS Illumina Nextseq550 no Laboratório de Pesquisa em Análise Genéticas no Instituto de Biotecnologia (IBTEC – UNESP, campus Botucatu/SP).

3.1.7 Análise de Bioinformática

Após o sequenciamento da biblioteca, foram extraídas as sequências de leitura bruta (*reads-raw data*) utilizando a plataforma Illumina. A acurácia da qualidade das *reads* foram obtidas, pelo programa FastQC (Andrews, 2018). Os resultados que combina todas as amostras do FastQC foram aplicados pelo programa MultiQC (<https://github.com/ewels/MultiQC>).

Após a etapa de verificação de qualidade das sequências, foram realizadas algumas filtrações usando o software Trimmomatic versão 0.36 (Bolger *et al.*, 2014) com base nos seguintes critérios: (I) remoção de pares de base (pb) com a presença de adaptadores; (II) remoção de *reads* que apresentaram qualidade inferior de QScore = 20 (*Phred QScore*); sequências com presença de sítios enzimáticos (digestão *in silico*) foram removidas conforme Driller *et al.* (2020). O comprimento de sequência mais conservadora no final das etapas de filtração foi padronizado em 143 pb (Suplementar 1).

As espécies do gênero *Hemigrammus* não apresentam um genoma de referência nos bancos de dados públicos, portanto, realizamos a montagem do catálogo de marcadores, com amostras que apresentaram maior número de *reads*, em seguida, iniciamos o rastreamento de SNPs utilizando a pipeline *de novo* do STACKS v. 2.1 (Catchen *et al.*, 2013).

Para detecção de SNP, rodamos o pipeline *denovo* (denovo.pl) disponível no STACKS com os seguintes parâmetros: $m = 3$ (controla o número de *reads* idênticas necessárias para indicar um possível alelo), $M = 4$ (controla o número de incompatibilidades permitidas entre os alelos de um indivíduo heterozigoto) conforme o conjunto de dados.

O índice de referência foi feito pelo programa Bowtie2 (v2.2.4), utilizando a pipeline Ref_map implementada no STACKS, com cada amostra alinhada. Após o alinhamento, para a seleção de SNPs foi utilizando a pipeline do STACKS *populations*. Foram utilizados SNPs que genotiparam pelo menos 75% dos indivíduos de cada população, paralelamente, foram aplicados um filtro para eliminar os SNPs que apresentaram valor de MAF (Minor allele frequency) $< 0,05$.

3.1.8 Inferência filogenômica

A análise de máxima verossimilhança (ML) foi realizada através do RaxML v8.2 (Stamatakis 2014) com o modelo GTR GAMMA, e a análise posterior do bootstrap foi realizada com a função autoMRE em RAXML e a árvore ML de melhor ajuste foi reconciliada com a réplica bootstrap. A filogenia obtida foi visualizada e editada no FigTree v1.4.3. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Usamos um algoritmo Neighbour-Net (Bryant & Moulton, 2004) baseado em distâncias p não corrigidas implementadas em SplitsTree 4.13.1 (Huson & Bryant 2006) e desenhadas usando o algoritmo de ângulo igual. A edição final da imagem foi realizada no software Paint.NET.

3.1.9 Genômica populacional

Examinamos o número de clusters existentes entre amostras do gênero *Hemigrammus* usando análise Bayesiana usando o software STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000), a estimativa do valor de k foi com $k=1$ a $k=7$, com 500.000 MCMC; burn-in de 10%, sendo 10 corridas independentes por K e realizado por um modelo de mistura e as frequências assumidas foram correlacionadas. A identificação do número de clusters genéticos (k) foi realizada pelo método Puechmaille (Puechmaille, 2016), utilizando o Structure Selector (Li & Liu, 2018). Em seguida, analisamos as diferenças genéticas usando valores de F_{ST} par a par calculados em ARLEQUIN v.3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010).

Por fim, para melhor acurácia dos resultados, realizamos análises específicas de genética de populações em 38 amostras identificadas morfologicamente como *H. ocellifer*, estimando o F_{ST} pareado entre as diferentes regiões. O grupo denominado *H. ocellifer* 1, foi coletado em Porto Velho/RO (1), Rio Branco/AC (2), Itaituba/PA (3), Loreto/Peru (4), Tabatinga/AM (5), Presidente Figueiredo/ AM (6), Alvarães/AM (7), Oiapoque/AP (8). As amostras do grupo *H. ocellifer* 2, foram coletadas em Cruzeiro do Sul/AC (9), São Gabriel da Cachoeira/AM (10), Ferreira Gomes/AP (11) (Fig. 01).

A árvore de RaxML evidenciou seis grupos delimitados e um singleton, totalizando sete delimitações que podem ser reconhecidos na Figura 02A. O singleton é o único espécime de *H. guyanensis* (voucher 18242), coletado no Suriname.

Os indivíduos das espécies *H. neptunus*, *H. aguaruna*, *H. haraldi* e *H. luelingi*, foram previamente identificados morfologicamente e formaram os respectivos grupos nas análises genéticas (Fig. 02A). Contudo, o indivíduo do voucher 92098 proveniente do Peru, foi identificado morfologicamente como *H. pulcher*, porém após as análises genéticas o indivíduo foi agrupado com *H. haraldi*.

Os 38 espécimes de *H. ocellifer* analisados neste estudo, foi dividido em dois grupos na RaxML, no qual foram nomeados de *H. ocellifer* 1 e *H. ocellifer* 2. No grupo *H. ocellifer* 1, encontramos 29 amostras, distribuídas em diferentes regiões do Brasil, em Rondônia (n=05), Acre (n=05), Pará (n=04), Amazonas (n=09), Amapá (n=04), e amostras provenientes do Peru, na região de Loreto (n=02) (Fig. 02A). No grupo *H. ocellifer* 2, foi formado por 09 amostras provenientes do Brasil, distribuídas nas regiões do Acre (n=01), Amazonas (n=04) e Amapá (n=04) (Fig. 02A).

Para uma melhor compreensão e distribuição dos clados obtidos da RaxML, foram realizadas análises bayesianas de similaridade genética no programa STRUCTURE e com base nos dados de agrupamentos (K=1-7), identificou que a maior probabilidade de clusters foi de k=6, segundo as estimativas dos métodos de Puchmaille (Fig. 02B, Material Suplementar 2).

Nas imagens de k=6 e k=7 obtidas do STRUCTURE, é possível observar o compartilhamento de alelos ancestrais entre as espécies de *H. ocellifer* 1 provenientes do Amapá com espécimes de *H. neptunus*, de Rondônia entre os espécimes de *H.*

aguaruna e *H. haraldi*, e por fim, um compartilhamento de alelos ancestrais entre *H. ocellifer 2* e *H. luelingi*.

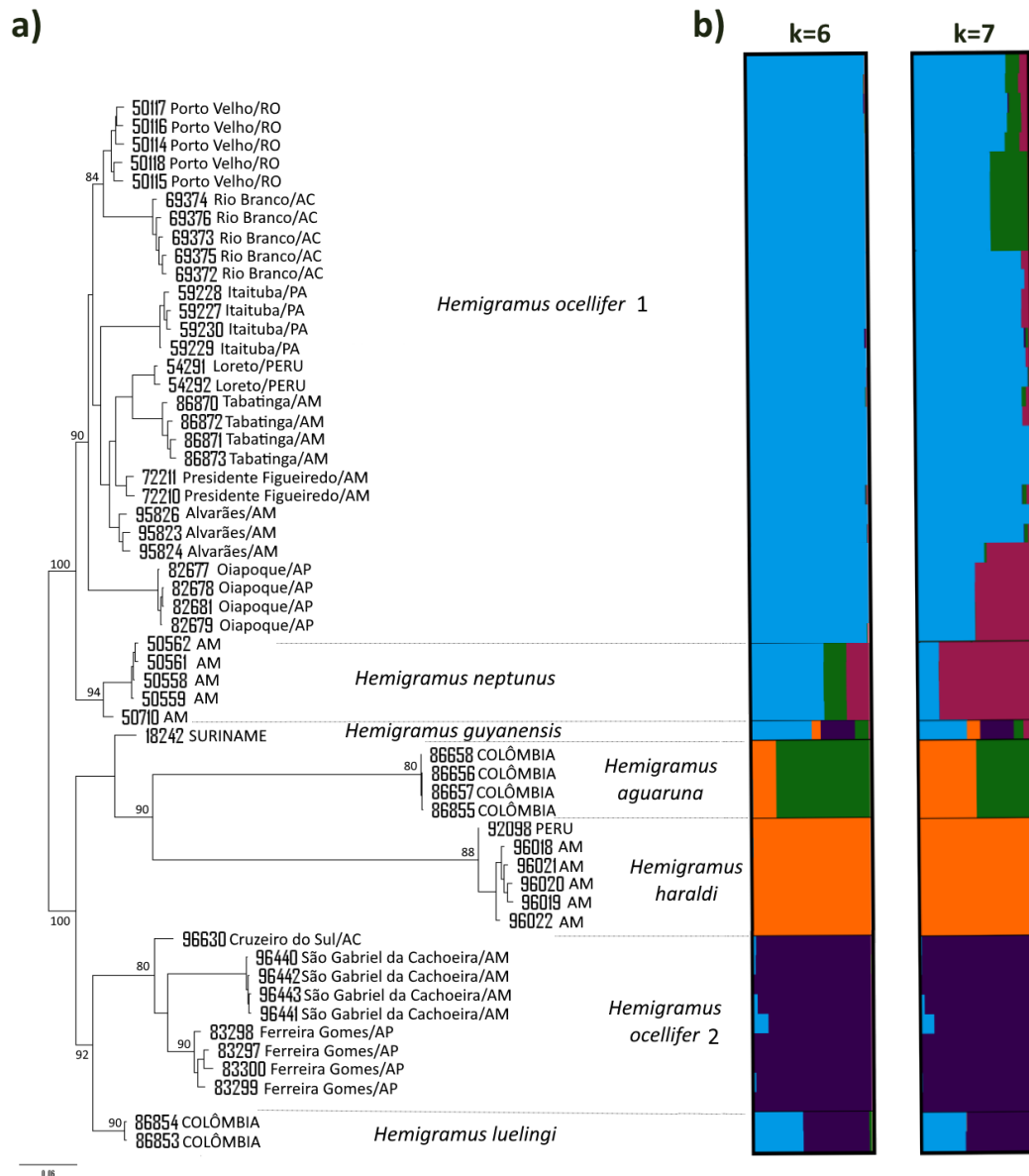


Fig. 02. Análises genômicas de sequências ddRAD alinhadas de *Hemigrammus* (n=56 amostras) utilizando 5.431 SNPs. (A) Filogenia de máxima verossimilhança (RAxML); (B) Análise Bayesiana de similaridade genética realizada nos resultados do STRUCTURE ($k=6$, $k=7$).

Uma segunda abordagem filogenômica também foi utilizada neste estudo, a análise de rede com base nos 5.431 SNPs revelou sete grupos principais (Fig. 03), no qual evidenciou os mesmos agrupamentos que a RaxML. Neste resultado, é possível

observar que *H. ocellifer* 1 apresenta haplótipos mais relacionado com *H. neptunus*, *H. ocellifer* 2 mais relacionado com *H. luelingi*, assim como *H. aguaruna* e *H. haraldi*, respectivamente. Estes resultados representam o compartilhamento de alelos ancestrais, como já identificado pela análise bayesiana do STRUCTURE.

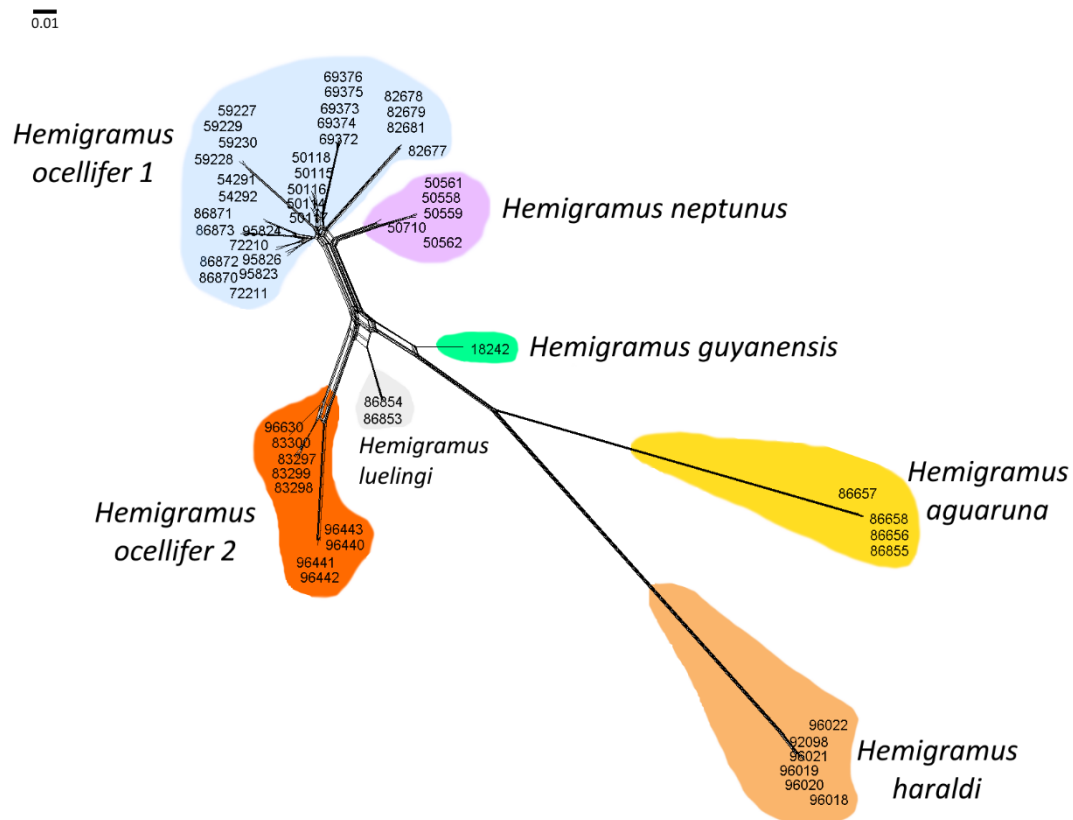


Fig. 03. Rede de haplótipos (Neighbour-Net) em espécies do gênero *Hemigrammus* (n=56 amostras) utilizando 5.431 SNPs.

Para avaliar o índice de diferenciação genética entre os sete grupos detectados nas análises de RaxML e na rede, foram calculados os valores de F_{ST} par-a-par. Altos índices de diferenciação genética entre os grupos do gênero foram detectados (Fig. 04, Material Suplementar 3). Os maiores valores identificados, foram entre *H. guyanensis* e *H. aguaruna* ($F_{ST}=0.9718$) e entre *H. aguaruna* e *H. luelingi* ($F_{ST}=0.9710$), respectivamente. Os menores valores detectados, foram entre *H.*

ocellifer 1 e *H. neptunus* ($F_{ST}=0.3645$), e entre *H. ocellifer* 1 e *H. guyanensis* ($F_{ST}=0.4732$).

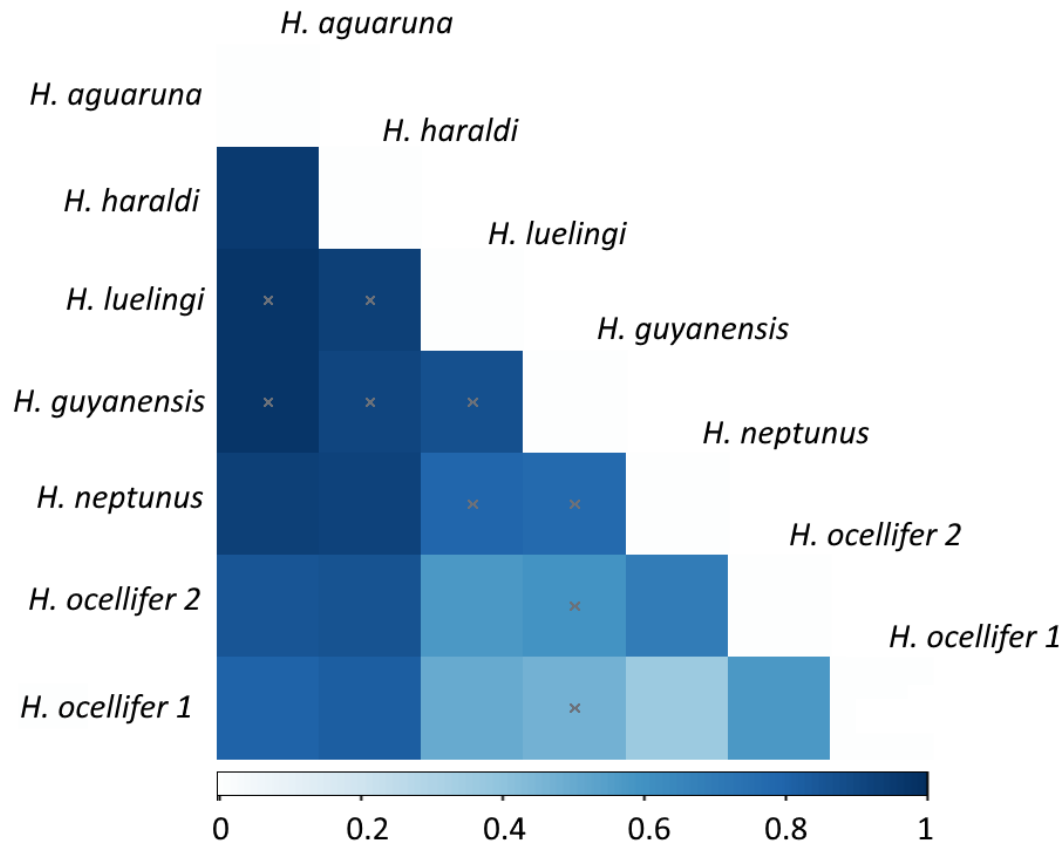


Fig. 04. Mapa de calor representando matrizes de distância F_{ST} par-a-par em 56 espécimes do gênero *Hemigrammus*, com 5.431 SNPs. Valores de p não significativo $>0,05$ representado por x.

3.2.2 *Hemigrammus ocellifer*

Em todas as análises realizadas neste estudo, os espécimes de *H. ocellifer*, revelaram dois grupos distintos, com um alto índice de F_{ST} par-a-par (0.5751), além disso, é possível observar a presença de subclados relacionados com a área geográfica amostrada, evidenciados pela RaxML, por tal motivo, realizamos uma investigação populacional para verificar os níveis de diferenciação genética entre os indivíduos de cada região amostrada, por meio do índice genético F_{ST} .

Os resultados de diferenciação genética resultaram em altos valores de F_{ST} entre todos os grupos, sendo o maior valor entre espécimes do grupo *H. ocellifer* 1 do Oiapoque/Amapá e do grupo *H. ocellifer* 2 de São Gabriel da Cachoeira/Amazonas ($F_{ST}=0.9434$), e o menor valor de F_{ST} entre indivíduos do grupo *H. ocellifer* 1 do Amazonas, nas regiões de Presidente Figueiredo e Alvarães ($F_{ST}=0.2716$) (Fig. 05, Material Suplementar 4).

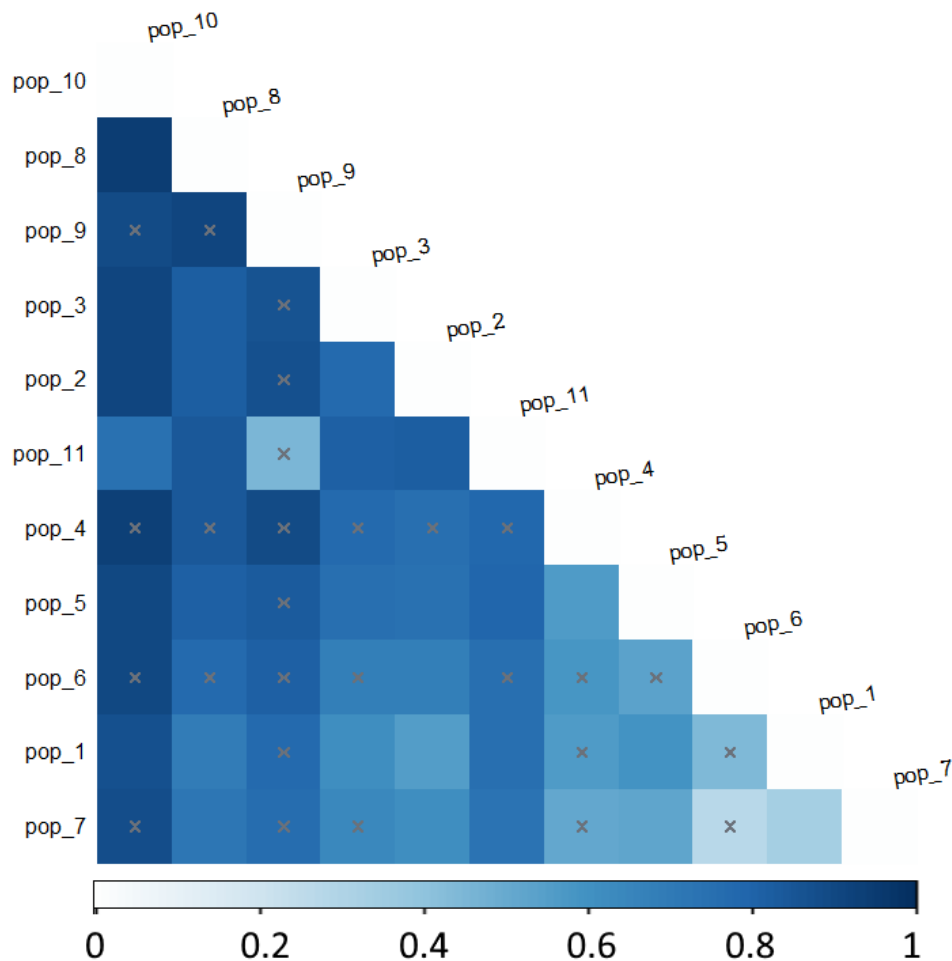


Fig. 05. Mapa de calor representando matrizes de distância F_{ST} par-a-par, com 5.431 SNPs, entre indivíduos morfologicamente identificados como *Hemigrammus ocellifer* ($n=38$ amostras), de acordo com o local de amostragem. Valor de p não significativo $>0,05$ representado por x. Grupo *H. ocellifer* 1= Porto Velho/RO (1), Rio Branco/AC (2), Itaituba/PA (3), Loreto/Peru (4), Tabatinga/AM (5), Presidente Figueiredo/AM (6), Alvarães/AM (7), Oiapoque/AP (8). Grupo *H. ocellifer* 2= Cruzeiro do Sul/AC (9), São Gabriel da Cachoeira/AM (10), Ferreira Gomes/AP (11).

3.3 DISCUSSÃO

Este estudo apresenta a uma investigação inicial sobre as espécies do gênero *Hemigrammus*, com os resultados obtidos através dos marcadores SNPs foi possível detectar evidências de seis espécies analisadas, sendo *Hemigrammus neptunus*, *H. gyanensis*, *H. aguaruna*, *H. haraldi*, *H. luelingi* e *H. ocellifer*. e ainda, os espécimes amostrados de *H. ocellifer*, revelaram dois distintos grupos em todas as análises, assim apresentando evidências de um complexo de espécie.

Há nove espécies definidas morfológicamente do grupo *Hemigrammus ocellifer* (sensu Lima *et al.* 2016). No presente estudo, foram definidos geneticamente sete grupos com a análise de RAxML e Structure (Bayesiana), com altas diferenças genéticas reveladas pelo índice F_{ST} .

Não foram incluídas neste estudo as espécies *H. yinyang*, que é restrita à bacia do rio Uaupés (bacia do alto Rio Negro) e *H. falsus*, que é aparentemente um sinônimo sênior de *H. gyanensis* (Lima & Sousa, 2009; Lima *et al.*, 2016). Nem *H. pulcher* pode ser considerada incluída, já que a delimitação de espécies considerou como *H. haraldi*. *Hemigrammus yinyang* é morfológicamente mais similar à *H. aguaruna* (Lima *et al.*, 2016), e por isso possivelmente mais proximamente relacionada à essa espécie do que com as demais do grupo *Hemigrammus ocellifer*, porém isso é somente uma hipótese que não foi testada. É presumível que numa futura análise genética essas duas espécies irão constituir um agrupamento genético adicional.

Nas análises genéticas estatísticas o índice F_{ST} mostra que *H. neptunus*, *H. gyanensis*, *H. aguaruna*, e *H. haraldi* são unidades genéticas independentes, concordando com taxonomia baseada na morfologia. A exceção fica por conta do

único indivíduo de *H. pulcher* não ser considerado uma espécie válida, discordando da morfologia.

Neste estudo, as espécies que são muito parecidas morfologicamente são *H. neptunus* e *H. guyanensis*, sendo que a primeira possui uma mancha escura em forma tridente no final do pedúnculo caudal que a diferencia da última (Zarske & Géry, 2002). Os arranjos de ganchos entre as duas espécies são iguais, onde os ganchos são de tamanho médio e se estendem do último não ramificado ao quarto ao sétimo raio ramificado da nadadeira anal (Lima & Sousa 2009). As análises genéticas diferem essas duas espécies tanto nas estatísticas e no índice F_{ST} 0.7725 corroborando que são duas espécies distintas. Porém, é necessário maior estudos em relação a essas espécies já que somente um indivíduo de *H. guyanensis* foi analisado e não foram analisados indivíduos da bacia do rio Paraguai de *H. neptunus*.

O indivíduo LBP 92098 foi identificado morfologicamente como *H. pulcher*, mas geneticamente esse exemplar concorda com *H. haraldi*. Essas espécies, embora similares morfologicamente, diferem no padrão de colorido e tamanho máximo (F.C.T. Lima e R.P. Ota, dados não publicados), sendo bem conhecidas no meio aquarista. Além disso, essas espécies ocupam habitats diferentes, sendo que *H. pulcher* vive em igarapés e rios (riachos de terra firme) e *H. haraldi* em lagos de rios de água branca (F.C.T. Lima, comunicação pessoal).

Um fator limitante em nossas análises foi que só dispúnhamos de tecido de um exemplar de *H. pulcher*, sendo necessário maior amostragem dessa espécie para poder ter certeza sobre sua identificação. Uma característica que distingue essas espécies das demais do grupo *Hemigrammus ocellifer* são os ganchos nas nadadeiras anais (Géry, 1961; Lima & Sousa 2009). Por outro lado, pode estar ocorrendo trocas

de alelos entre essas espécies segundo os resultados obtidos no programa STRUCTURE, o que pode influenciar esse resultado.

Hemigrammus luelingi é considerado dentro do grupo *Hemigrammus ocellifer* a espécie mais distinta morfológicamente (F.C.T. Lima e R.P. Ota, dados não publicados). Entretanto, geneticamente essa espécie é muito próxima de *Hemigrammus ocellifer* 1 e *H. ocellifer* 2, compartilhando alelos com essas populações, sendo corroborado pela rede de haplótipos estando como sendo muito próximo a esses dois clados. Porém, é uma espécie bem diferenciada dessas duas segundo o índice F_{ST} com *H. ocellifer* 1 (0.5063) e *H. ocellifer* 2 (0.5780).

Hemigrammus ocellifer não apresenta nenhuma diferença morfológica identificada até o momento entre as populações analisadas. Nem de outras populações analisadas de outros locais de ocorrência da espécie, que se estende desde a Guiana, Suriname e Guiana Francesa e pelas partes baixas da bacia amazônica, desde o baixo Amazonas até a Amazônia ocidental no Equador, Peru e Colômbia (F.C. T. Lima e R.P. Ota, dados não publicados). Nos resultados genéticos da árvore de distância e do STRUCTURE fica claro a presença de dois grupos genéticos que apresentam pouco compartilhamento de alelos. *Hemigrammus ocellifer* 1 compartilha mais alelos com outras espécies. A rede haplotípica confirma esses resultados.

Do ponto de vista biogeográfico, os dois clados de *Hemigrammus ocellifer* compreendem populações em muitos casos geograficamente distantes, o que torna a compreensão de sua biogeografia uma questão desafiadora. Por exemplo, em dois extremos da distribuição da espécie, Amapá e Acre, há populações de ambos os clados, com populações de *Hemigrammus ocellifer* 1 no Oiapoque (AP) e Rio Branco(AC), e *Hemigrammus ocellifer* 2 no Araguari (AP) e Cruzeiro do Sul (AC). Essa

distribuição pode ser causada pela heterogeneidade de ambientes amazônicos, incluindo a arquitetura dendrítica das redes de drenagem fluvial, o papel perene da captação fluvial dinâmica na fragmentação e fusão de ecossistemas fluviais através tempo e espaço, além desses serem bem antigos (Albert *et al*, 2018; Cracraft *et al*, 2020). Grandes rios amazônicos e matas de várzea podem ser barreiras para vários organismos aquáticos e terrestres, e são importantes na homogeneização genética. Já rios de pequeno porte como igarapés de terra firme podem facilitar a diferenciação entre populações. A maioria dos grupos dos organismos amazônicos carecem de dados genéticos com resolução para discernir as relações entre processos (por exemplo, especiação e extinção) em escalas biogeográficas e processos microevolutivos (por exemplo, seleção, migração e deriva) operando em escalas populacionais (Smith *et al*, 2017; Dagosta & de Pinna, 2017).

Os resultados deste estudo, evidenciam que *H. ocellifer* é um complexo de espécies que ainda precisam de maior investigação, como coletas regionais e focais.

Entretanto, a princípio, este complexo poderia ser influenciado por uma barreira fluvial, segundo a qual os rios podem servir como barreiras à dispersão gerando divergência ecológica (Claramunt *et al*, 2012). A hipótese de captura do rio postula que rearranjos na rede fluvial (ou seja, mudanças nas conexões fluviais devido a capturas e avulsões) que ocorrem em locais espaciais e temporais apropriados podem impulsionar a diversificação, aumentando as oportunidades de especiação e dispersão, reduzindo assim a probabilidade de extinção (Albert *et al*., 2018).

Se as barreiras fluviais estruturam populações, então os rearranjos do curso do rio poderiam estimular diversificação promovendo isolamento episódico e contato secundário. Nesses casos, espera-se que as populações não sejam apenas estruturadas através das barreiras fluvial, mas também mostram evidências de graus

de fluxo gênico ou simpatria entre populações diferenciadas (Dagosta & de Pinna, 2017; Albert *et al*, 2018). Esse é o caso de *H. ocellifer*, que habita preferencialmente rios de terra firme e que podem ter populações isoladas nesses igarapés e terem processos de diferenciação genética em suas populações.

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies do grupo *Hemigrammus ocellifer* representam sete grupos genéticos, sendo que muitos desses trocam alelos entre si, podendo haver fluxo gênico. São reportadas nove espécies para esse grupo, sendo que das 6 espécies analisadas no presente estudo, com evidências de um complexo de espécie em *H. ocellifer*. Essa espécie vive especialmente em igarapés de terra firme, sendo que esses podem ser um fator de divergência entre as populações. São necessários mais estudos com maior número de populações de algumas espécies pouco representadas no presente estudo e com a espécie *H. yinyang*. A filogeografia do grupo em especial de *H. ocellifer* deve ser feito em diversas escalas, principalmente regional, para que se tenha um resultado mais robusto.

3.5 REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, J. S., Craig J., M, Tagliacollo V. A., Petry, P. 2018. Upland and lowland fishes: A test of the river capture hypothesis. *Mountains Clim. Biodiver.*, 273–294
- Andrews S. 2018. FastQC -A quality control tool for high throughput sequence data.
- Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30(15): 2114–2120. Doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.

- Bryant, D., & V. Moulton. 2004. "Neighbor-Net: An Agglomerative Method for the Construction of Phylogenetic Networks." *Molecular Biology and Evolution* 21 (2): 255–65. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh018>.
- Campos, M., Conn, J. E., Alonso, D. P., Vinetz, J. M., Emerson, K. J., Ribolla, P. E. 2017. Microgeographical structure in the major Neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using microsatellites and SNP markers. *Parasit Vectors*;10:76. Doi: 10.1186/s13071-017-2014-y.
- Catchen, J., Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Amores, A., Cresko, W. A. 2013. Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Mol. Ecol.* 22 3124–3140. Doi: 10.1111/mec.12354.
- Claramunt, S., E. P. Derryberry, J. V., Remsen Jr., R. T. Brumfield. 2012. High dispersal ability inhibits speciation in a continental radiation of passerine birds. *Proc. Biol. Sci.* **279**, 1567–1574.
- Cracraft, J., C. Camila Ribas, F. M. d'Horta, J. Bates, R. P. Almeida, A. Aleixo, J. P. Boubli, K. E. Campbell, F. W. Cruz, M. Ferreira, S. C. Fritz, C. H. Grohmann, E. M. Latrubesse, L. G. Lohmann, L. J. Musher, A. Nogueira, A. O. Sawakuchi, P. Baker, 2020. The origin and evolution of Amazonian species diversity. In: *Neotropical Diversification: Patterns and Processes*, V. Rull, A. C. Carnaval, Eds. (Springer International Publishing,), pp. 225–244.
- Dagosta, F.C.P., de Pinna, M. 2017. Biogeography of Amazonian fishes: deconstructing river basins as biogeographic units. *Neotropical Ichthyology*, 15 (3).
- Driller, M., Vilaca, S. T, Arantes, L. S., Carrasco-Valenzuela, T, Heeger, F., Chevallier D & Mazzon,i C. J. 2020. Optimization of ddRAD-like data leads to high quality sets of reduced representation single copy orthologs (R2SCOs) in a sea turtle multi-species analysis. *bioRxiv*. Doi: 10.1101/2020.04.03.024331. I.
- Excoffier L & Lischer H. E. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Géry, J. 1961. *Hemigrammus pulcher haraldi* a new subspecies of a well-known tetra. *Tropical Fish Hobbyist*, 10(2): 42-47, 50-51.
- Huson DH, Bryant D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 23: 254–267. DOI:[10.1093/molbev/msj030](https://doi.org/10.1093/molbev/msj030)
- Li Yu-Long & Liu Jin-Xian. 2018. Structure Selector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular ecology resources*, v. 18, n. 1, p. 176-177. Doi: 10.1111/1755-0998.12719.
- Lima, F.C.T., Correa, V. & Ota, R.P.. 2016. A new species of *Hemigrammus* Gill, 1858 (Characiformes: Characidae) from the western Amazon basin in Peru and Colombia. *aqua, International Journal of Ichthyology* 22(3): 123-132.
- Lima, F.C.T. & Sousa, L.S. 2009. A new species of *Hemigrammus* from the upper rio Negro basin, Brazil, with comments on the presence and arrangement of fin hooks in the genus (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Aqua, International Journal of Ichthyology*, 15 (3): 153-168.

- Peterson, B. K., Weber, J. N., Kay, E. H., Fisher, H. S., Hoekstra, H. E. 2012. Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS One*, 7 (2012), p. e37135. Doi:10.1371/journal.pone.0037135.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Puechmaille., S. J. 2016. The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: subsampling and new estimators alleviate the problem. *Molecular ecology resources*, 16(3), 608-627. Doi: doi.org/10.1111/1755-0998.12512.
- Smith, B. T., Seeholzer G. F., Harvey, M. G., A., Cuervo M., Brumfield, R. T. A. 2017. Latitudinal phylogeographic diversity gradient in birds. *PLoS Biol.* 15, e2001073.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 30, 1312–131. Doi:10.1093/bioinformatics/btu033.
- Turchetto-Zolet, A.C, Turchetto, C, Guzman, F. Silva-Arias, G.A., Ludwig, F;S. Veto, N.M 2017. Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) metodologias de identificação e aplicações. *In: Turchetto-Zolet, A.C, Turchetto, C., Zanella, C.M., Passaia, G. Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologia e Aplicações.* 132–179
- Zarske, A., & Géry, J. 2002. *Hemigrammus neptunus* sp.n. – eine neue Salmier-Art (Teleostei, Characiformes, Characidae) aus dem Einzugsgebiet des Río Manuripi in Bolivien (Departamento Pando). *Zoologischen Abhandlungen*, 52: 23–34.

3.6 MATERIAL SUPLEMENTAR

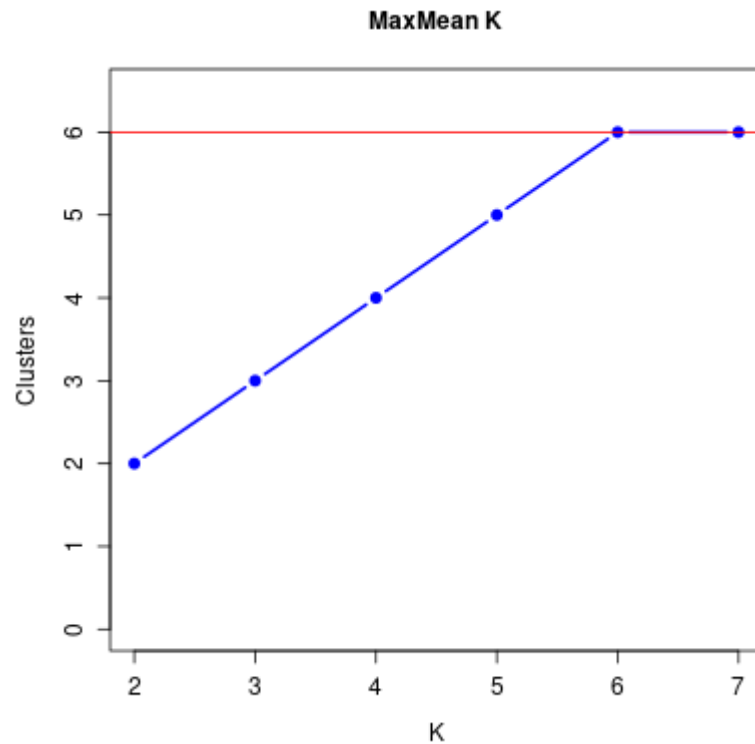
Suplementar 1. Sumário do sequenciamento *ddRAD* e processamento das sequências dos indivíduos do gênero *Hemigrammus*.

Gênero	Espécie	Voucher	Local	Raw Date	HEADCROP5/Quality20	Non-Digested	143pb
Hemigrammus	luelingi	86851	Leticia/CO	5.693.963	5.679.545	5.523.347	4.917.730
Hemigrammus	ocellifer	50117	Porto Velho/RO	5.470.549	5.432.395	5.337.721	4.327.825
Hemigrammus	ocellifer	82677	Oiapoque/AP	3.550.036	3.531.416	3.470.135	2.953.252
Hemigrammus	ocellifer	83299	Ferreira Gomes/AP	3.446.416	3.433.811	3.364.840	2.679.246
Hemigrammus	ocellifer	82681	Oiapoque/AP	3.218.118	3.202.301	3.131.710	2.745.818
Hemigrammus	ocellifer	59229	Itaituba/PA	3.191.023	3.181.956	3.127.857	2.360.581
Hemigrammus	ocellifer	82679	Oiapoque/AP	3.126.432	3.119.725	3.063.478	2.583.702
Hemigrammus	ocellifer	83298	Ferreira Gomes/AP	3.067.452	3.043.642	2.981.843	2.609.072
Hemigrammus	ocellifer	54293	Nauta/Loreto	2.977.152	2.951.679	2.901.315	1.926.729
Hemigrammus	ocellifer	54291	Nauta/Loreto	2.968.412	2.937.951	2.890.245	2.177.708
Hemigrammus	luelingi	86855	Leticia/CO	2.950.818	2.928.493	2.859.641	2.555.507
Hemigrammus	ocellifer	69373	Rio Branco/AC	2.926.551	2.917.195	2.858.248	2.094.370
Hemigrammus	ocellifer	82678	Oiapoque/AP	2.900.939	2.885.027	2.814.028	2.509.164
Hemigrammus	ocellifer	54292	Nauta/Loreto	2.883.559	2.844.725	2.797.104	1.946.398
Hemigrammus	ocellifer	59227	Itaituba/PA	2.870.424	2.856.068	2.810.751	2.169.937
Hemigrammus	ocellifer	69372	Rio Branco/AC	2.797.890	2.785.436	2.729.235	2.083.185
Hemigrammus	ocellifer	59230	Itaituba/PA	2.743.643	2.725.341	2.679.419	2.077.831
Hemigrammus	ocellifer	69374	Rio Branco/AC	2.472.710	2.460.924	2.412.448	1.752.271
Gênero	Espécie	Voucher	Local	Raw Date	HEADCROP5/Quality20	Non-Digested	143pb

Hemigrammus	ocellifer	96443	São Gabriel da Cachoeira/AM	2.444.431	2.423.879	2.265.721	1.987.734
Hemigrammus	ocellifer	59228	Itaituba/PA	2.381.054	2.374.111	2.281.076	1.583.892
Hemigrammus	ocellifer	72211	Presidente Figueiredo/AM	2.345.395	2.334.198	2.294.756	1.983.592
Hemigrammus	ocellifer	50114	Porto Velho/RO	2.332.550	2.317.541	2.271.614	1.935.117
Hemigrammus	ocellifer	72210	Presidente Figueiredo/AM	2.328.953	2.317.451	2.278.487	1.890.055
Hemigrammus	aguaruna	86656	Leticia/CO	2.320.927	2.300.278	2.253.394	1.882.708
Hemigrammus	ocellifer	83300	Ferreira Gomes/AP	2.319.048	2.308.476	2.263.374	1.982.059
Hemigrammus	ocellifer	96630	Cruzeiro do Sul/AC	2.256.723	2.231.804	2.122.318	1.871.041
Hemigrammus	ocellifer	50116	Porto Velho/RO	2.238.693	2.235.205	2.195.869	1.814.536
Hemigrammus	ocellifer	95824	Alvarães/AM	2.048.514	2.037.876	1.998.286	1.744.956
Hemigrammus	aguaruna	86658	Leticia/CO	2.045.506	2.022.438	1.985.461	1.651.959
Hemigrammus	guyanensis	50710	Amazonas/Madeira	2.038.059	2.026.059	1.974.153	1.725.173
Hemigrammus	haraldi	96020	Atalaia do Norte/AM	1.981.873	1.970.730	1.923.814	1.756.903
Hemigrammus	luelingi	86854	Leticia/CO	1.894.424	1.880.285	1.834.978	1.628.830
Hemigrammus	ocellifer	69375	Rio Branco/AC	1.883.264	1.870.131	1.827.005	1.435.831
Hemigrammus	ocellifer	69376	Rio Branco/AC	1.878.663	1.864.616	1.824.622	1.438.095
Hemigrammus	ocellifer	96441	São Gabriel da Cachoeira/AM	1.798.528	1.792.566	1.734.950	1.519.332
Hemigrammus	neptunus	50561	Amazonas/Madeira	1.793.134	1.774.346	1.725.733	1.534.257
Hemigrammus	ocellifer	86873	Tabatinga/AM	1.789.061	1.779.291	1.740.502	1.521.179
Hemigrammus	pulcher	92098	Maynas/Loreto	1.786.947	1.776.674	1.721.023	1.551.433
Hemigrammus	haraldi	96021	Atalaia do Norte/AM	1.786.326	1.777.229	1.641.089	1.522.637
Hemigrammus	haraldi	96018	Atalaia do Norte/AM	1.784.165	1.776.104	1.713.714	1.205.419

Gênero	Espécie	Voucher	Local	Raw Date	HEADCROP5/Quality20	Non-Digested	143pb
Hemigrammus	ocellifer	50115	Porto Velho/RO	1.740.443	1.725.168	1.695.533	1.408.392
Hemigrammus	ocellifer	96440	São Gabriel da Cachoeira/AM	1.740.208	1.732.230	1.693.090	1.487.818
Hemigrammus	haraldi	96019	Atalaia do Norte/AM	1.736.615	1.724.729	1.678.280	1.485.094
Hemigrammus	ocellifer	83297	Ferreira Gomes/AP	1.677.566	1.662.725	1.631.622	1.444.310
Hemigrammus	ocellifer	86871	Tabatinga/AM	1.635.932	1.628.105	1.592.946	1.374.576
Hemigrammus	haraldi	96022	Atalaia do Norte/AM	1.613.839	1.604.527	1.527.068	1.367.082
Hemigrammus	aguaruna	86657	Leticia/CO	1.611.552	1.592.785	1.432.428	1.319.037
Hemigrammus	ocellifer	82680	Oiapoque/AP	1.562.735	1.553.408	1.522.486	1.278.352
Hemigrammus	ocellifer	96442	São Gabriel da Cachoeira/AM	1.560.358	1.551.941	1.478.984	1.321.312
Hemigrammus	ocellifer	50118	Porto Velho/RO	1.560.318	1.559.193	1.523.057	1.223.042
Hemigrammus	ocellifer	95826	Alvarães/AM	1.559.409	1.551.284	1.412.993	1.205.419
Hemigrammus	guyanensis	18242	Suriname	1.531.329	1.519.884	1.470.835	1.255.442
Hemigrammus	neptunus	50562	Amazonas/Madeira	1.492.620	1.481.458	1.345.666	1.257.794
Hemigrammus	ocellifer	86870	Tabatinga/AM	1.489.557	1.481.439	1.454.449	1.251.909
Hemigrammus	neptunus	50558	Amazonas/Madeira	1.414.690	1.396.862	1.233.405	1.117.346
Hemigrammus	ocellifer	86872	Tabatinga/AM	1.258.379	1.251.097	1.224.641	1.050.612
Hemigrammus	ocellifer	95823	Alvarães/AM	1.163.721	1.107.425	1.079.382	953.179
Hemigrammus	neptunus	50559	Amazonas/Madeira	1.091.990	1.084.693	1.045.409	962.131
Hemigrammus	luelingi	86853	Leticia/CO	974.247	967.281	907.238	817.866

Suplementar 3 Número ótimo de clusters identificados para o gênero *Hemigrammus* (k=6), utilizando 5.431 SNPs, pelo método Puechmaille (Maxmean), visualizados no STRUCTURE.



Suplementar.4 Estimativa de valores de F_{ST} par a par de espécies do gênero *Hemigrammus*, usando 5,431 SNPs. * P-value not significant >0.05. *H. ocellifer* 1 (Hoc 1), *H. neptunus* (Hne), *H. guyanensis* (Hgu), *H. aguaruna* (Hag), *H. haraldi* (Hha), *H. ocellifer* 2 (Hoc2), *H. luelingi* (Hlu).

	1 - Hoc 1	2 - Hne	3 - Hgu	4 – Hag	5 -Hha	6 - Hoc2	7 – Hlu
1	-						
2	0.3645	-					
3	*0.4732	*0.7725	-				
4	0.8087	0.9369	*0.9718	-			
5	0.8274	0.9249	*0.9192	0.9560	-		
6	0.5751	0.6971	*0.5940	0.8569	0.8684	-	
7	0.5063	*0.7901	*0.8762	*0.9710	*0.9347	0.5780	-

Suplementar 5 Estimativa de par a par dos valores de F_{ST} identificados morfologicamente como *Hemigrammus ocellifer* (n=38 amostras), utilizando 5.431 SNPs, de acordo com o local de amostragem. * Valor P não significativo >0.05. Group *H. ocellifer* 1= Porto Velho/RO (1), Rio Branco/AC (2), Itaituba/PA (3), Loreto/Peru (4), Tabatinga/AM (5), Presidente Figueiredo/AM (6), Alvarães/AM (7), Oiapoque/AP (8). Group *H. ocellifer* 2= Cruzeiro do Sul/AC (9), São Gabriel da Cachoeira/AM (10), Ferreira Gomes/AP (11).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	-										
2	0.5518	-									
3	0.6117	0.7713	-								
4	*0.5672	*0.7592	*0.7733	-							
5	0.5966	0.7434	0.7508	0.5694	-						
6	*0.4478	0.6830	*0.6852	*0.5883	*0.5362	-					
7	0.3331	0.6186	*0.6409	*0.5167	0.5255	*0.2716	-				
8	0.6900	0.8296	0.8283	*0.8451	0.8128	*0.7792	0.7217	-			
9	*0.7735	*0.8722	*0.867	*0.8941	*0.8356	*0.8141	*0.7615	*0.9146	-		
10	0.8722	0.9192	0.9184	*0.9351	0.9050	*0.9084	*0.8800	0.9434	*0.8967	-	
11	0.7535	0.8209	0.8181	*0.7846	0.7904	*0.7514	0.7374	0.8482	*0.4536	0.7470	-