

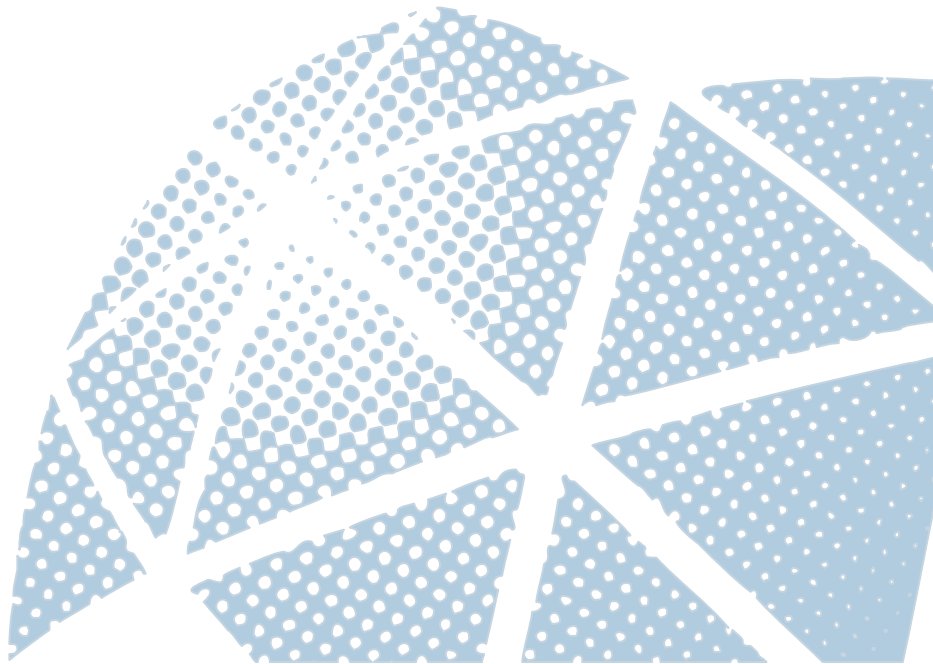
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

CAMILA DA SILVA DE SOUZA

**Biodiversidade dos Loricariidae (Teleostei:
Siluriformes) das bacias costeiras do Sudeste e Sul
do Brasil**



BOTUCATU

2017

Camila da Silva de Souza

**Biodiversidade dos Loricariidae (Teleostei: Siluriformes)
das bacias costeiras do Sudeste e Sul do Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) - Instituto de Biociências, UNESP, campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia).

Orientador: Prof. Dr. Claudio de Oliveira

Botucatu-SP

2017

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

Souza, Camila da Silva de.

Biodiversidade dos Loricariidae (Teleostei:
Siluriformes) das bacias costeiras do Sudeste e Sul do
Brasil / Camila da Silva de Souza. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Claudio de Oliveira

Coorientador: Guilherme José da Costa Silva

Capes: 20400004

1. Bagre (Peixe) - Distribuição geográfica. 2. Habitat
(Ecologia). 3. Identificação. 4. Biodiversidade.

Palavras-chave: Drenagens costeiras; GMYC; Identificação
molecular; Loricariidae.

Ao meu velho eterno pescador, avô Pedro.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a vida e permitir trilhar esse caminho.

Aos meu pais, Valdomiro e Silvana, por todo amor, educação e alicerce. Minha eterna gratidão.

A todos os meus familiares, em especial aos meus primos e amigos David, Diego e Talita, por todos os momentos de cumplicidade e motivação.

Aos meus velhos amigos de infância, Fabinho, Felipe, Kelvy, Josi, Jéssica e Juninho, por toda amizade e exemplo do que tudo que se constrói com amor e verdade, permanecem.

As minhas amigas que encontrei na graduação Aline, Carolina, Laura e Milene, por todos os incontáveis momentos e principalmente por toda ajuda e motivação ao longo da vida acadêmica e pessoal, isso foi essencial para não desistir e chegar até aqui.

A todos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, em especial Bruno, Cristiane, Daniela, Fabio, Yuldi, Gabriel, Luz, Silvana e Renato, por todos os momentos de descontração, incentivo e ajuda na execução desse trabalho.

Ao Dr. Guilherme J. Costa Silva, pela coorientação e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti pelo exemplo e inspiração de pesquisador e pessoa.

Ao Prof. Dr. Claudio Oliveira por toda oportunidade, incentivo, orientação e contribuição para minha formação acadêmica e pessoal.

À comissão examinadora, por terem aceito o convite e poder colaborar para o enriquecimento desse trabalho e meu crescimento profissional.

A todos os funcionários do Instituto de Biociências que através dos seus trabalhos contribuem para que esse e muitos outros aconteçam.

E a todas as outras pessoas com as quais eu tive a oportunidade de viver e aprender tudo o que me trouxe até aqui.

O meu muito obrigada!

O rio e o oceano

“Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano, ele treme de medo.

Olha para trás, para toda a jornada, os cumes, as montanhas, o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre.

Mas, não há outra maneira.

O rio não pode voltar.

Ninguém pode voltar.

Voltar é impossível na existência.

Você pode apenas ir em frente.

O rio precisa se arriscar e entrar no oceano.

E somente quando ele entra no oceano é que o medo desaparece, porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano.

Mas tornar-se oceano.

Por um lado é desaparecimento e por outro lado é renascimento.

Assim somos nós.

Voltar é impossível na existência.

Só podemos ir em frente e arriscar.

Coragem! Avance firme e torne-se oceano! ”

OSHO

SUMÁRIO

1. Introdução	10
1.1 Bacia do Leste	10
1.2 Família Loricariidae	13
2. Objetivos	14
3. Metodologia	14
3.1 Material	14
3.2 Métodos	15
4. Resultados	17
5. Discussão	32
6. Conclusão	37
7. Referências	38
8. Apêndice A.	45
9. Apêndice B.	55
10. Anexo A: Genetic and morphological analyses implying that <i>Schizolecis guntheri</i> (Siluriformes: Loricariidae) constitutes a cryptic species	56

Resumo

SOUZA, C.S. **Biodiversidade dos Loricariidae (Teleostei: Siluriformes) das bacias costeiras do Sudeste e Sul do Brasil**. 2017. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

Os rios costeiros da região Sul e Sudeste do Brasil fazem parte do complexo hidrográfico da bacia do Leste, que abriga diferentes drenagens isoladas atualmente, entre as quais destacam-se, na região Sul e Sudeste as do Paraíba do Sul, Ribeira de Iguape, Itajaí e Jacuí. A grande área de distribuição e variedade de habitats ao longo dessas drenagens têm influência direta na diversidade de espécies e no seu alto nível de endemismo. No entanto, essa região vem sofrendo intensa exploração e perda de habitats por ações antrópicas. Trabalhos de zoneamento dessa região vêm sendo realizados com o intuito de fornecer melhores dados para a sua preservação. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo identificar unidades taxonômicas operacionais (OTUs) da família Loricariidae e delimitar ecorregiões através de seus padrões de distribuição. Foram analisadas 499 sequências parciais do gene mitocondrial Citocromo c Oxidase subunidade I (COI), representantes de 47 espécies de Loricariidae e encontradas 58 OTUs distribuídas ao longo de 31 drenagens da região costeira Sul e Sudeste do Brasil, revelando uma diversidade genética antes não reconhecida para alguns grupos. As 31 drenagens, com base na Análise de Parcimônia de Endemismo (PAE), foram divididas em cinco grupos, caracterizando áreas propícias à delimitação de ecorregiões. As drenagens Jacuí, Ribeira de Iguape e Paraíba do Sul, apresentaram faunas bastante exclusivas em relação a padrões morfológicos e genéticos, sendo imprescindíveis para preservação. Os eventos de capturas de cabeceiras e paleoclimáticos que levaram à regressões e transgressões marinhas são em grande parte responsáveis pela distribuição da família Loricariidae ao longo das drenagens.

Palavras-chave: DNA *barcoding*, identificação molecular, GMYC.

Abstract

SOUZA, C.S. **Biodiversity of Loricariidae (Teleostei: Siluriformes) from coastal basins of Southeastern and Southern Brazil**. 2017. 74 f. Thesis (Master) – Institute of Biosciences of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

The coastal drainages of Southern and Southeastern Brazil are part of the Eastern basin, currently composed by different drainages. The large distribution area and variety of habitats along these drainages have a direct influence on the species diversity and their high level of endemism. However, this region has been suffered intense exploration and loss of habitat due to anthropic actions. The present study aimed to identify Operational Taxonomic Units (OTUs) of the Loricariidae and to delimit ecoregions through their distribution patterns. A total of 499 partial sequences of the mitochondrial COI gene were analyzed, belonging to 47 Loricariidae species. 58 OTUs were delimited along 31 drainages of Southeastern and Southern coastal revealing a previously unrecognized genetic diversity for some groups. The 31 drainages based on Parsimony Analysis of Endemicity (PAE), were divided in five groups, characterizing areas that are favorable to the delimitation of ecoregions. The Jacuí, Ribeira de Iguape and Paraíba do Sul rivers presented fairly exclusive faunas in relation to morphological and genetic patterns, being essential for preservation. The stream capture and paleoclimatic events are largely responsible for the distribution of the Loricariidae along the drainages.

Keywords: DNA barcoding, molecular identification, GMYC.

Introdução

1.1. A bacia do Leste

A bacia do Leste abriga diferentes drenagens isoladas atualmente, entre as quais destacam-se Paraguaçu, Contas, Jequitinhonha, Doce, Paraíba do Sul, Ribeira de Iguape, Itajaí e Jacuí, além de diversas pequenas drenagens distribuídas por toda a extensão costeira do Brasil (Ribeiro 2006). O seu surgimento e distribuição, segundo Ribeiro (2006), está relacionado a processos geomorfológicos que tiveram início no Cretáceo e que prevalecem até os dias atuais. Um dos processos geomorfológicos importantes é conhecido como ressurgimento tectônico, que provoca modificações topográficas da região promovendo eventos de capturas de cabeceiras e a modificação do percurso de uma drenagem (Lima & Ribeiro 2011).

Esse evento já foi documentado em algumas regiões de cabeceiras da bacia do Leste onde a altitude é mais elevada (Ribeiro 2006). Por outro lado, em regiões de planícies é comum ocorrer eventos conhecidos como “megaleques aluviais” (Horton e De Celles 2001; Wilkinson et al. 2006), onde o rio se desloca lateralmente a medida que ocorre o acúmulo de sedimentos no leito (Albert & Reis 2011), o que acaba também promovendo a conexão entre drenagens adjacentes nessas regiões de planície.

Assim como processos geomorfológicos estão relacionados a bacia do Leste, processos paleoclimáticos, que influenciam as oscilações do nível do mar, são também apontados como fundamentais para o cenário atual dessa bacia (Buckup 2011). Weitzman et al. (1988) argumentam que em períodos de glaciação, o nível do mar baixa em muitos metros, e com isso grande parte da plataforma continental fica exposta, fazendo com que os rios costeiros se fundem em suas trajetórias para o mar. Por outro lado, em períodos interglaciais com a elevação do nível do mar, há consequente submersão de grande parte da planície litorânea.

A grande área de distribuição e variedade de habitats ao longo da bacia do Leste têm influência direta na diversidade de espécies e no alto nível de endemismo, incluindo mais de 270 espécies de peixes descritas (Menezes et al. 2007), das quais mais de 90% são endêmicas (Bizerril 1994; Menezes et al. 2007). Esse alto endemismo tem sido reconhecido por diversos autores (Bizerril 1994; Ribeiro 2006; Menezes et al. 2007; Abell et al. 2008) e fornecido base

para o reconhecimento de diferentes delimitações de ecorregiões ao longo da extensão costeira do Brasil.

Bizerril (1994) delimitou duas subprovíncias, uma denominada “subprovíncia da costa sudeste” (estendendo desde a foz do Paraíba do Sul até o Estado de Santa Catarina) e outra de “subprovíncia da costa leste” (estendendo da foz do rio São Francisco até o rio Paraíba do Sul), com base na presença ou ausência de certos gêneros de peixes. Costa (1995) utilizou uma estratégia diferente ao comparar hipóteses filogenéticas de diferentes gêneros da família Rivulidae, propondo a subdivisão da região costeira de modo semelhante à de Bizerril (1994), com a adição de uma terceira subprovíncia que engloba as drenagens litorâneas do Uruguai e Rio Grande do Sul até a divisa com Santa Catarina, próximo à foz do rio Tramandaí. Além disso, ao realizar essa análise comparativa, Costa (1995) teve a oportunidade de estimar o relacionamento entre a própria malha hidrográfica da região, contando assim não somente a história dos grupos de peixes estudados, como também parte do histórico de relacionamento entre as drenagens que compõem a bacia do Leste.

Mais recentemente, Abell et al. (2008), baseando-se nos padrões de endemismo de peixes de água doce, realizaram um trabalho mais abrangente e detalhado que culminou em uma subdivisão da bacia do Leste em sete ecorregiões: Nordeste da Mata Atlântica, Paraíba do Sul, Fluminense, Ribeira de Iguape, Sudeste da Mata Atlântica, Tramandai-Mampituba e Lagoa dos Patos. Thomaz et al. (2015), usando informações batimétricas e topográficas, inferiu 12 paleodrenagens ao longo da região costeira desde o estado do Rio Grande do Sul ao Rio de Janeiro e propôs o uso das paleodrenagens para delimitação de ecorregiões, que demonstraram ser responsáveis pelo padrão genético entre as populações de *Hollandichthys multifasciatus*.

No entanto vale ressaltar que Abell et al. (2008), Costa (1995) e Bizerril (1994) basearam a delimitação das ecorregiões na distribuição de grupos taxonômicos supra-específicos, podendo assim, ter subestimado grande parte da diversidade biológica presente na região. Thomaz et al. (2015) usaram apenas uma espécie no seu estudo sendo necessária a inclusão de outros grupos taxonômicos para verificação de correspondência do padrão sugerido.

Awise (2000) menciona que, para a identificação refinada de ecorregiões, ideais para a preservação da ictiofauna, seria necessária a realização do zoneamento com base na identificação de unidades evolutivas independentes (UEI) ou unidades taxonômicas operacionais (OTUs), que muitas vezes podem não ser distinguíveis morfológicamente e que podem ser consideradas como espécies crípticas (Bickford et al. 2007).

Organismos como insetos, anfíbios e peixes que se comunicam por sinais através de meios não visuais (por exemplo, som, vibração, feromônios ou sinais elétricos), são talvez os mais prováveis de abrigar espécies crípticas (i.e. duas ou mais espécies identificados como única espécie nominal devido as suas características morfológicas serem indistinguíveis [(Mayr 1942)], porque as mudanças nos sinais transmitidos nessas modalidades não precisam envolver necessariamente alterações morfológicas visíveis (Bickford et al. 2007). Portanto, é provável que o verdadeiro número de espécies biológicas seja significativamente maior do que a contagem atual, visto que as definições das espécies são estabelecidas quase que exclusivamente por argumentos morfológicos (Lee et al. 2014). Desse modo, a identificação das UEI é de grande importância para a preservação da biodiversidade, visto que esse tipo de abordagem leva em consideração o quanto um grupo é significativo do ponto de vista evolutivo e biológico, independentemente de sua categoria taxonômica e de suas modificações morfológicas (Avice 2000).

Atualmente estão sendo desenvolvidos diferentes métodos de identificação de UEI e dentre eles, os que envolvem análises de identificação molecular como o projeto global do DNA *barcode* (Hebert et al. 2003). Esse projeto visa padronizar a identificação molecular da diversidade biológica animal, através do uso de um fragmento de ~650pb do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase subunidade I (COI), possibilitando a difusão do conhecimento e permitindo análises comparativas entre os diferentes grupos de organismos.

Estudos usando a metodologia DNA *barcode* foram conduzidos em diferentes bacias brasileiras, tal como bacia do rio São Francisco (Carvalho et al. 2011), rio Paraíba do Sul (Pereira et al. 2011), rio Paraná (Pereira et al. 2013), rio Ribeira de Iguape (Henriques et al. 2015), rio Mucuri (Gomes et al. 2015), revelando uma diversidade antes não reconhecida e se mostrando resolutiva para questões taxonômicas para essas bacias e em estudos de diferentes grupos de peixes neotropicais, Characidae (Pereira et al. 2011), Lebiasinidae (Benzaquem et al. 2015), Loricariidae (Costa-Silva et al. 2015), Serrasalminidae (Mateussi et al. 2016) e Curimatidae (Melo et al. 2016).

Com o ganho de popularidade da técnica do DNA *barcode*, têm sido desenvolvidas várias análises de identificação de UEI utilizando-se de um único *locus*, visando a diminuição da subjetividade da delimitação de UEI. Dentre essas análises destaca-se a de *General Mixed Yule Coalecent Model* (GMYC) (Fontaneto et al. 2007; Pons et al. 2006), que é baseada no método de verossimilhança e árvores ultramétricas que possuam múltiplas espécies e populações. Essa análise tem demonstrado grande eficiência em diferentes estudos de peixes neotropicais de água

doce e aumentado a confiabilidade na delimitação de UEI (Roxo et al. 2015; Rossini et al. 2016; Shimabukuro-Dias et al. 2016).

1.2. Família Loricariidae

Loricariidae, com 936 espécies válidas (Eschmeyer e Fong, 2017) é a maior família em número de espécies entre os Siluriformes e também uma das maiores famílias da ictiofauna mundial (Nelson 2006). Ela é dividida em seis subfamílias: Delturinae, Lithogeneinae, Loricariinae, Hypoptopomatinae, Hypostominae e Rhinelepineae mais *Pseudancistrus genisetiger* em *incertae sedis* (Lujan et al. 2015). Diferentemente da maioria das outras famílias, as espécies de Loricariidae apresentam o corpo coberto por placas ósseas e a boca modificada em um disco de sucção (Armbruster 2004), sendo que essas especializações possibilitam que algumas das espécies da família possuam grandes distribuições, muito embora ocupando preferencialmente um ambiente particular (Menezes et al. 2007; Chiachio et al. 2008).

Dentre as 85 espécies da família Loricariidae que ocupam a bacia do Leste, 53 são de distribuição restrita e 32 de ampla dispersão (Menezes et al. 2007). A grande maioria das espécies são de riachos de água clara e lótica, com substrato rochoso ou com vegetação submersa. Nesse tipo de ambiente os Loricariidae, como por exemplo as espécies dos gêneros *Neoplecostomus* e *Harttia*, possuem o hábito de ficar aderidos a esses substratos (Oyakawa 1993; Roxo et al. 2012). Por outro lado, existem espécies que são encontradas em rios com fundo de lama ou arenoso (como as espécies do gênero *Loricariichthys*), e nesses casos o aparato bucal é mais utilizado para o forrageio à procura de alimentos do que propriamente para a fixação ao substrato (Covain & Fisch-Muller 2007).

Apesar desses dados ecológicos, cabe ressaltar que para cerca de 25% das espécies de Loricariidae da bacia do Leste não existem informações quanto à sua ecologia e cerca de 40% de suas espécies tem o status de conservação desconhecido (Menezes et al. 2007). Algumas espécies como, *Hemiancistrus megalopteryx*, *Hemipsilichthys gobio*, *Pogonopoma parnahybae* encontram-se seriamente em perigo de extinção e *Delturus parnahybae* e *Otothyris juquiae* criticamente em perigo (ICMBIO, 2014). Somado a isso, levando-se em conta que a caracterização do status de conservação das espécies foi baseada principalmente na distribuição geográfica de morfoespécies, que não apresenta o refinamento ideal para programas de preservação (Avice 2000), o nível de ameaça das espécies da família Loricariidae e de toda

fauna aquática da bacia do Leste e principalmente nas regiões costeiras Sul e Sudeste, pode ser muito mais grave, uma vez que essas regiões são as mais urbanizadas e exploradas do país.

Nesse sentido, como a família Loricariidae possui um grande número de espécies na região da bacia do Leste e sendo essas diversas quanto à preferência de habitats e às suas distribuições, um estudo da distribuição das UEI dessa família pode fornecer argumentos para a delimitação de ecorregiões baseadas nas distribuições de padrões genéticos, o que pode ser de grande valia para um melhor manejo das espécies, com a identificação de regiões com elevado número de padrões genéticos exclusivos e consequentemente prioritárias para preservação.

2. Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo identificar unidades taxonômicas operacionais (OTUs) da família Loricariidae, delimitar o relacionamento recente entre as drenagens costeiras da região Sudeste e Sul, assim como estabelecer uma nova proposição de ecorregiões desse complexo hidrográfico, utilizando as espécies da família Loricariidae ocupantes dessas drenagens como modelo.

3. Metodologia

3.1 Material

Foram analisados 499 exemplares representantes de 14 gêneros e 47 espécies de Loricariidae ao longo de 31 drenagens costeiras da região Sul e Sudeste do Brasil (Apêndice A) (Figura 1). Os vouchers e tecidos foram obtidos a partir de exemplares depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP), São Paulo, Brasil. Os exemplares foram identificados a nível de espécie, seguindo chaves taxonômicas ou com a ajuda de especialistas.



Figura 1. Mapa das drenagens estudadas na região Sul e Sudeste do Brasil. Os rios estão assinalados do estado do Espírito Santo a Rio Grande do Sul.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

O DNA total foi extraído de tecidos preservados em etanol utilizando o protocolo de Ivanova et al. (2007). As sequências parciais do gene mitocondrial COI, foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os primers: Fish F1 e Fish R1 (Ward et al. 2005) e COI L6252-Asn e H7271-COXI (Melo et al. 2011). As amplificações foram realizadas em um volume total de 12.5 μ L com 1.25 μ L de 10X tampão (10 mM Tris-HCl+15 mM MgCl₂), 0.5 μ L dNTPs (200 nM de cada), 0.5 μ L de cada primer (5 mM), 0.05 μ L Platinum® Taq Polymerase (Invitrogen), 1 μ L DNA genômico (12 ng) e 8.7 μ L de ddH₂O. Os parâmetros da PCR constituíram de desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C, 32 ciclos de desnaturação por 1 minuto a 94°C, anelamento por 1 minuto a 52°C, extensão por 2 minutos a 72°C e extensão final de 72°C por 8 min. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1% e purificados utilizando o ExoSap-IT® (USB Corporation, Cleveland, USA). As reações de sequenciamento foram realizadas com o “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems, Austin, USA), purificadas pelo método de

Acetato/EDTA/etanol e analisados em um sequenciador de DNA automático, modelo ABI 3130-Genetic Analyzer (Applied Biosystems, California, USA).

3.2.2 Análises dos dados

As sequências consensos foram obtidas usando o programa Geneious 7.1.4 (<http://www.geneious.com>; Kearse et al. 2012) e alinhadas pelo algoritmo Muscle (Edgar et al. 2004), implementado no programa Geneious 7.1.4 sob os parâmetros default. Os erros do alinhamento foram observados a olho nu e corrigidos manualmente no mesmo programa. O índice de saturação de substituição (ISS) descrito por (Xia 2009) foi estimado no programa Dambe 5.3.38 (Xia 2001).

Para avaliar a diversidade genética das espécies e também para identificar possíveis complexos de espécies, foi utilizada a análise de *General Mixed Yule Coalescent* (GMYC; Pons et al. 2006). Uma árvore ultramétrica não calibrada no Beast v1.8.2 (Drummond & Rambaut 2007), foi obtida com o modelo de substituição nucleotídica GTR+I+G, selecionado pelo programa Mega 6.0 sob os critérios de AICc e relógio *Relaxed Clock Lognormal*. Foi utilizado o modelo de especiação *birth-death* e iniciada a pesquisa com uma árvore de distância obtida pelo modelo de UPGMA e em seguida com o modelo de *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) com 50 milhões de gerações. Uma árvore foi amostrada a cada 5.000 gerações e realizado o burn-in de 10% das árvores geradas no programa TreeAnnotator v1.8.2 (Drummond & Rambaut 2007). A árvore com a maior probabilidade foi selecionada para análise de GMYC realizada com o pacote ‘splits’ (*Species Limits by Threshold Statistics*; <http://r-forge.r-project.org/projects/splits>) usando o programa R v.3.0.0 (R Development Core Team 2013). Após a identificação das OTUs pela análise de GMYC, calculou-se a variação genética dentro e entre as OTUs utilizando o modelo de Kimura-2-parâmetros (K2P) no software MEGA v.6.06 (Tamura et al. 2013), e também foi calculado a divergência entre espécies nominais não discriminadas pela análise de GMYC em uma única OTU.

Análise de parcimônia de endemismo (PAE)

Para essa análise, as 31 drenagens estudadas foram tratadas como táxons e as 58 OTUs encontradas pela análise de GMYC foram tratadas como caracteres. A presença de uma determinada OTU em uma drenagem foi considerada como apomorfia enquanto a ausência como plesiomorfia. A construção da matriz foi realizada no programa Winclada (Nixon 2002)

e essa foi analisada por parcimônia no programa TNT (Goloboff et al. 2008) com a busca Heurística de TBR com os parâmetros *default*.

4. Resultados

No total 405 sequências do gene COI foram obtidas para representantes da família Loricariidae (19- *Ancistrus multispinis*, 14- *Harttia*, 43- *Hisonotus*, 30- *Hypostomus*, 7- *Isbrueckerichthys*, 90- *Kronichthys*, 7- *Loricariichthys castaneus*, 40- *Neoplecostomus*, 9- *Pareiorhina*, 26- *Pareiorhaphis*, 25- *Parotocinclus maculicauda*, 11- *Pseudotothyris ignota* e 84- *Rineloricaria*), sendo que 9 sequências do gênero *Pareiorhina* foram obtidas de dados publicados (Pereira et al. 2011). A matriz obtida possui 532 pb, sendo que 327 pb são conservadas e 205 pb são variáveis. A frequência nucleotídica foi de 25% de timina, 17% de citosina, 29.1% de adenina e 28.9% de guanina. A divergência média total foi de 16% ($\pm 1.3\%$). Os dados não apresentaram saturação considerando que o índice de Iss não indicou nenhuma saturação em transições e transversões tanto em topologias assimétricas (Iss.cAsym) e simétricas (Iss.cSym) (Apêndice B). A análise de GMYC delimitou 53 OTUs, e para esse capítulo também adicionamos parte dos resultados de *Schizolecis guntheri* (Anexo A), totalizando então 58 OTUs delimitadas pela análise de GMYC para 44 espécies nominais descritas e três em descrição.

Pseudotothyris

Foram analisadas 11 sequências de *Pseudotothyris* (*P. ignota* e *P. obtusa*) delimitando duas OTUs (OTU_PO e OTU_PI) (Fig. 2). Essas OTUs foram coletadas em três drenagens: Baía de Paranaguá, Baía de Guaratuba e rio Cubatão (Fig. 1). Os valores de divergência genética entre as OTUs foram de 0.9%(±0.4%) e dentro da OTUs foi de 0 para OTU PO e 0.1%(±0.1%) para PI.

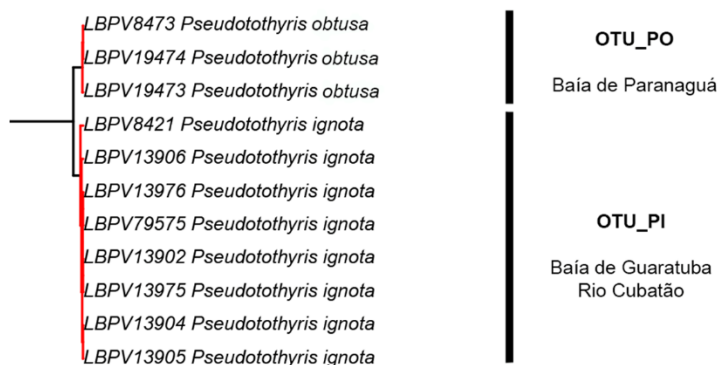


Figura 2. Detalhe do ramo da árvore Bayesiana gerada na análise de GMYC com as OTUs encontradas em *Pseudotothyris*. Diferentes indivíduos que compartilham um mesmo ramo vermelho fazem parte de uma mesma OTU.

Parotocinclus maculicauda

Foram analisadas 25 sequências de *Parotocinclus maculicauda* delimitando duas OTUs (OTU_PM1 e OTU_PM2) (Fig. 3). Essas OTUs foram coletadas em três drenagens: rio Ribeira de Iguape, rio Itapocu e rio Itajaí (Fig. 1). Os valores de divergência genética entre as OTUs foram de 0.5%(±0.2%) e dentro da OTUs foi de 0.2%(±0.1%) para OTU_PM1 e 0.3%(±0.2%) para OTU_PM2.

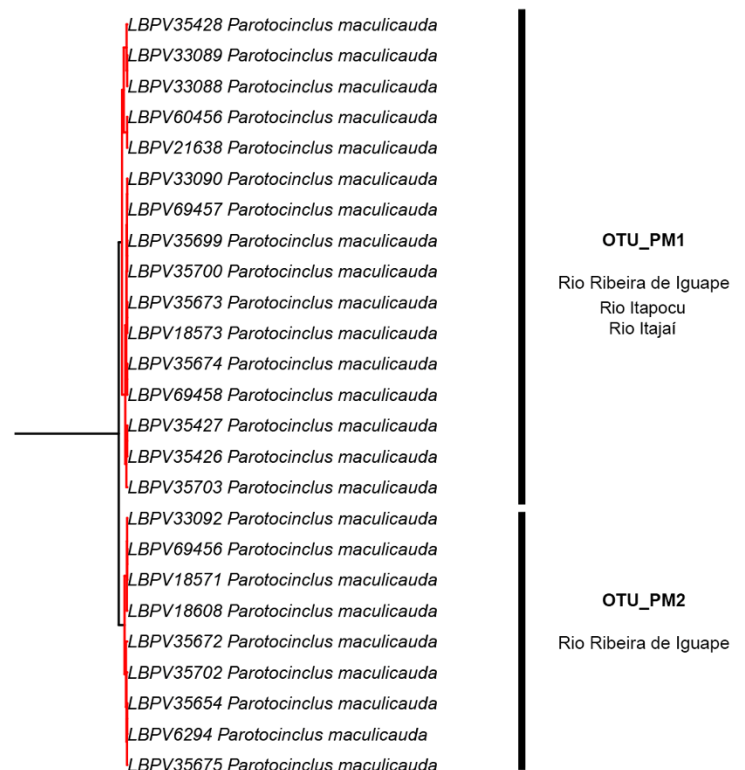


Figura 3. Detalhe do ramo da árvore Bayesiana gerada na análise de GMYC com as OTUs encontradas no gênero *Parotocinclus*. Diferentes indivíduos que compartilham um mesmo ramo vermelho fazem parte de uma mesma OTU.

Hisonotus

Foram analisadas 43 sequências de *Hisonotus* (*H. notatus*, *H. leucofrenatus*, *H. prata*, *H. armatus*, *H. taimensis*, *H. carreiro* e *H. nigricauda*), delimitando oito OTUs (OTU_HN, OTU_HL1, OTU_HL2, OTU_HP, OTU_LA, OTU_HT, OTU_HC e OTU_HNG) (Fig. 4). Essas OTUs foram coletadas em dez drenagens: rio Macaé, rio Ribeira de Iguape, Baía de Paranaguá, rio Cubatão, rio Itapocu, rio Maquiné, rio Jacuí, rio Palmares, Arroio Corrientes e Arroio Chuí (Fig. 1). A divergência genética entre as OTUs foi entre 1.5%(±0.5%) a 11.7%(±1.5%), enquanto a divergência genética interna foi de 0 a 0.3%(±0.2%) (Tabela 1). Foi calculado a divergência genética entre *H. armatus* e *H. leucofrenatus*, delimitada em um única

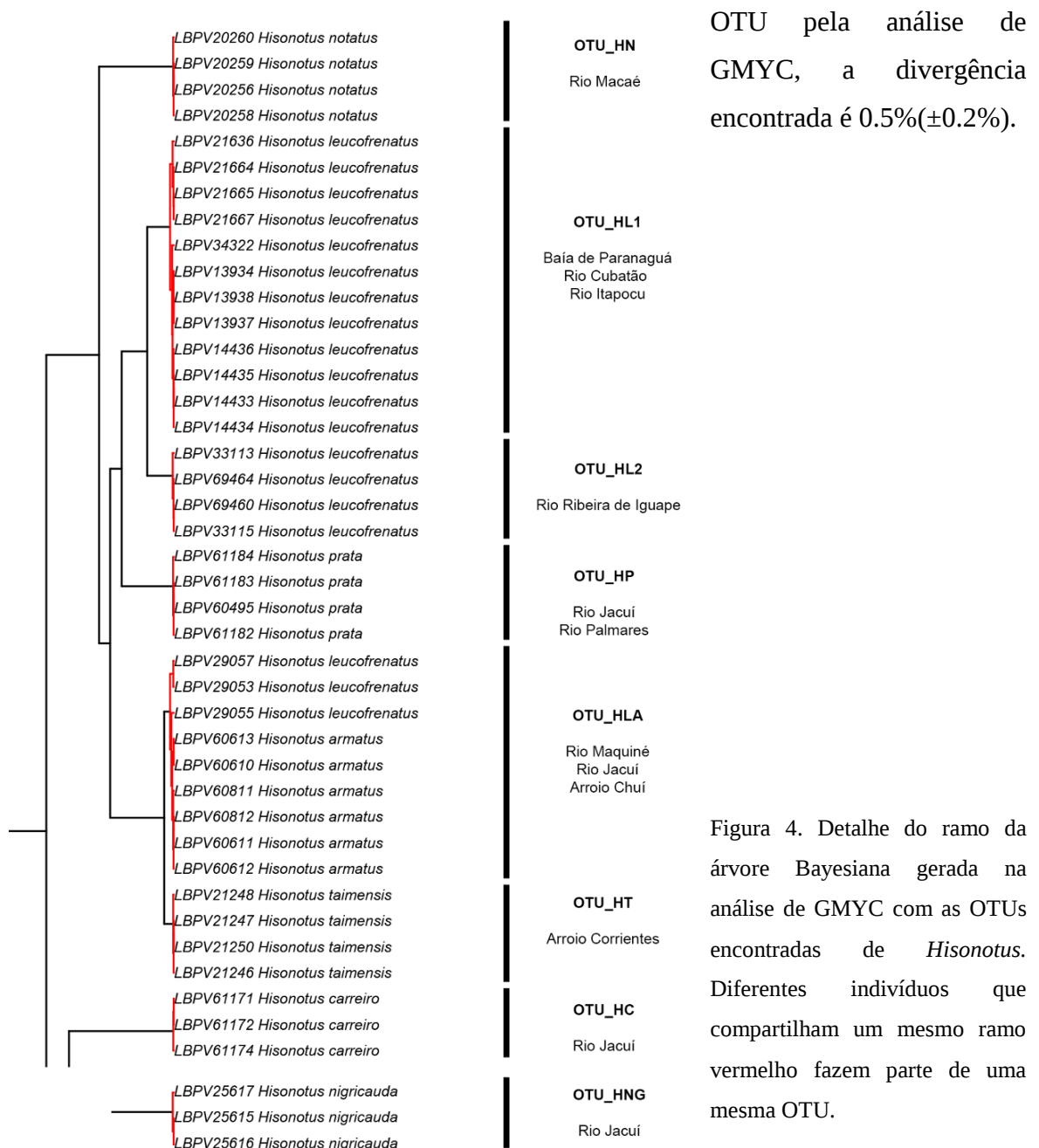


Tabela 1: Os valores estão apresentados em porcentagem. Em vermelho estão as divergências dentro de cada OTU.

	OTU_HN	OTU_HL1	OTU_HL2	OTU_HP	OTU_HLA	OTU_HT	OTU_HC	OTU_HNG
OTU_HN	0 ±0							
OTU_HL1	7.6 ±1.3	0 ±0						
OTU_HL2	7.4 ±1.3	3.3 ±0.8	0 ±0					
OTU_HP	6.6 ±1.2	4.7 ±1.0	6.2 ±1.2	0 ±0				
OTU_HLA	7.0 ±1.1	5.8 ±1.0	6.3 ±1.1	6.8 ±1.1	0.3 ±0.2			
OTU_HT	8.3 ±1.3	6.5 ±1.1	7.1 ±1.2	7.6 ±1.2	1.5 ±0.5	0 ±0		
OTU_HC	8.3 ±1.4	8.7 ±1.4	9.1 ±1.4	8.6 ±1.4	8.0 ±1.3	9.3 ±1.4	0.1 ±0.1	
OTU_HNG	10.8 ±1.5	10.9 ±1.5	10.5 ±1.5	9.7 ±1.5	11.7 ±1.6	11.6 ±1.6	11.0 ±1.5	0.2 ±0.1

Ancistrus multispinis

Foram analisadas 19 sequências de *Ancistrus multispinis* delimitando três OTUs (OTU_AM1, OTU_AM2 e OTU_AM3) (Fig. 5). Essas OTUs foram coletadas em três drenagens: rio Paraíba do Sul, rio Ribeira de Iguape e rio Jacuí (Fig. 1). A divergência entre as OTUs foi entre 1.8%(±0.7%) a 4.0%(±1.1%), enquanto a divergência genética interna foi de 0 a 0.1%(±0.1%) (Tabela 2).

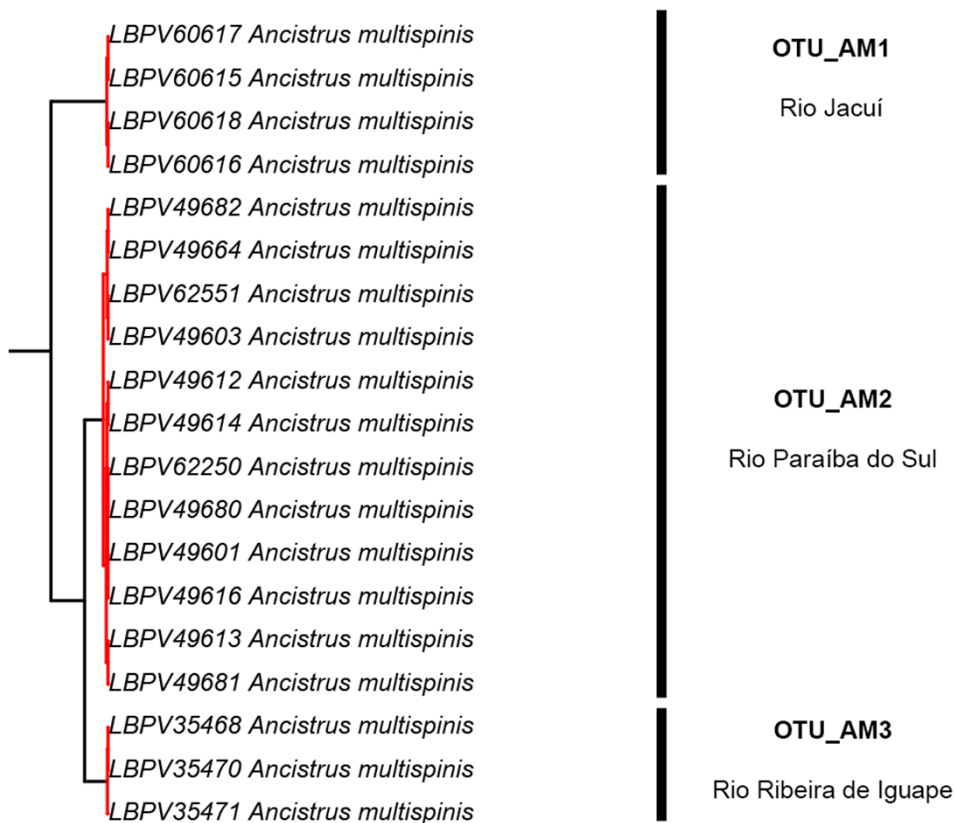


Figura 5. Detalhe do ramo da árvore Bayesiana gerada na análise de GMYC com as OTUs encontradas da espécie *Ancistrus multispinis*. Diferentes indivíduos que compartilham um mesmo ramo vermelho fazem parte de uma mesma OTU.

Tabela 2: Os valores estão apresentados em porcentagem. Em vermelho estão as divergências dentro de cada OTU.

	OTU_AM1	OTU_AM2	OTU_AM3
OTU_AM1	0 ±0		
OTU_AM2	3.3 ±0.9	0.1 ±0	
OTU_AM3	4.0 ±1.0	1.8 ±0.7	0 ±0

Hypostomus

Foram analisadas 30 sequências de *Hypostomus* (*H. tapijara*, *H. auroguttatus*, *H. ancistroides*, *H. affinis* e *H. commersoni*), delimitando quatro OTUs (OTU_HPJ, OTU_HAG, OTU_HAC e OTU_HFC) (Fig. 6). Essas OTUs foram coletadas em quatro drenagens: rio Paraíba do Sul, rio Ribeira de Iguapé, rio Maquiné e rio Jacuí (Fig. 1). Os valores de divergência genética entre as OTUs foram de 1.0%(±0.4%) a 5.5%(±0.1), e dentro das OTUs variou de 0 a 1.1%(±0.1%) (Tabela 3). Foi calculado a divergência genética entre *H. affinis* e *H. commersoni*, delimitada em uma única OTU pela análise de GMYC, a divergência encontrada é 0.7%(±0.3%).

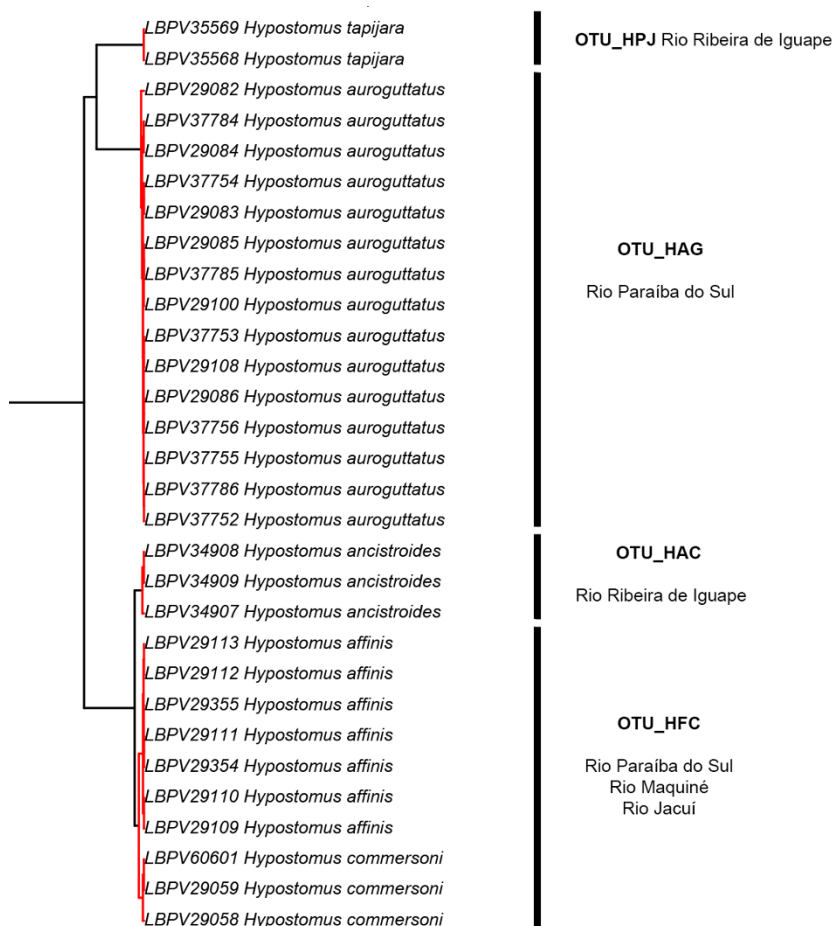


Figura 6. Detalhe do ramo da árvore Bayesiana gerada na análise de GMYC com as OTUs encontradas no gênero *Hypostomus*. Diferentes indivíduos que compartilham um mesmo ramo vermelho fazem parte de uma mesma OTU.

Tabela 3: Os valores estão apresentados em porcentagem. Em vermelho estão as divergências dentro de cada OTU.

	OTU_HPJ	OTU_HAG	OTU_HAC	OTU_HFC
OTU_HPJ	0 ±0			
OTU_HAG	4.6 ±1.0	0.1 ±0		
OTU_HAC	4.6 ±0.9	4.9 ±0.9	0.1 ±0.1	
OTU_HFC	5.0 ±0.1	5.5 ±0.1	1.0 ±0.4	0.3 ±0.2

Harttia

Foram analisadas 14 sequências de *Harttia* (*H. carvalhoi*, *H. kronei* e *H. loricariformis*) delimitando três OTUs (OTU_HKN, OTU_HCL e OTU_HLM) (Fig.7). Essas OTUs foram coletadas em duas drenagens: rio Paraíba do Sul e rio Ribeira de Iguape (Fig. 1). Os valores de divergência genética entre as OTUs foram de 11.2%(±1.5%) a 13.4%(±1.7), e dentro das OTUs variou de 0 a 0.1%(±0.1%) (Tabela 4).

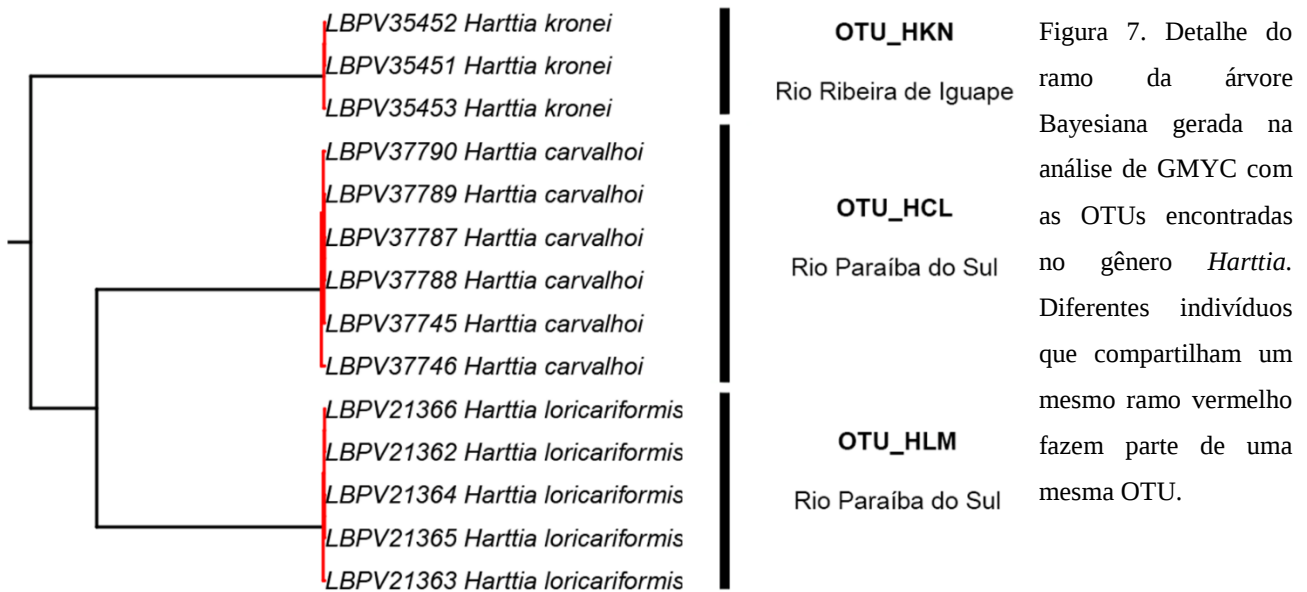


Tabela 4: Os valores estão apresentados em porcentagem. Em vermelho estão as divergências dentro de cada OTU.

	OTU_HKN	OTU_HCL	OTU_HLM
OTU_HKN	0 ±0		
OTU_HCL	13.1 ±1.7	0.1 ±0.1	
OTU_HLM	11.2 ±1.5	13.4 ± 1.7	0 ±0

Isbrueckerichthys

Foram analisadas 7 sequências do gênero *Isbrueckerichthys* (*I. alipionis*, *I. duseni* e *I. epakmos*) delimitando três OTUs (OTU_IS1, OTU_IS2 e OTU_IS3) (Fig. 8). Essas OTUs foram coletadas na drenagem do rio Ribeira de Iguape (Fig. 1). Os valores de divergência genética entre as OTUs foram de 2.7%(±0.8%) a 3.6%(±0.8), e dentro das OTUs foram de 0 (Tabela 5).



Figura 8. Detalhe do ramo da árvore Bayesiana gerada na análise de GMYC com as OTUs encontradas do gênero *Isbrueckerichthys*. Diferentes indivíduos que compartilham um mesmo ramo vermelho fazem parte de uma mesma OTU.

Tabela 5: Os valores estão apresentados em porcentagem. Em vermelho estão as divergências dentro de cada OTU. Não foi possível ser estimado o valor dentro da OTU IS1 devido a presença de uma única amostra.

	OTU_IS1	OTU_IS2	OTU_IS3
OTU_IS1	-		
OTU_IS2	1.7 ±0.6	0 ±0	
OTU_IS3	2.7 ±0.7	3.6 ±0.8	0 ±0

Rineloricaria

Foram analisadas 66 sequências de *Rineloricaria* (*R. sp n1*, *R. aequalicuspis*, *R. lima*, *R. sp n2*, *R. strigilata*, *R. malabarbai*, *R. kronei*, *R. langei*, *R. jaraguensi*, *R. nigricauda*, *R. longicauda* e *R. cadeae*), delimitando onze OTUs (OTU_R1, OTU_R2, OTU_R3, OTU_R4, OTU_R5, OTU_R6, OTU_R7, OTU_R8, OTU_R9, OTU_R10 e OTU_R11) (Fig. 9). Essas OTUs foram coletadas em doze drenagens: rio Itanhaém, rio Cubatão, rio Itajaí, rio Jacuí, rio Maquiné, rio Palmares, Arroio Corrientes, Arroio Chui, rio Itapocu, Baía de Paranaguá, rio Ribeira de Iguape e rio Paraíba do Sul (Fig. 1). Os valores de divergência genética entre as

OTUs foram de 1.1%(±0.5%) a 9.1%(±1.7), e dentro das OTUs variou de 0 a 1.2%(± 0.4%) (Tabela 6). Foi calculado a divergência genética entre *R. Kronei* e *R.langei*, delimitada em uma única OTU pela análise de GMYC, a divergência encontrada é 0.1%(± 0.1%).

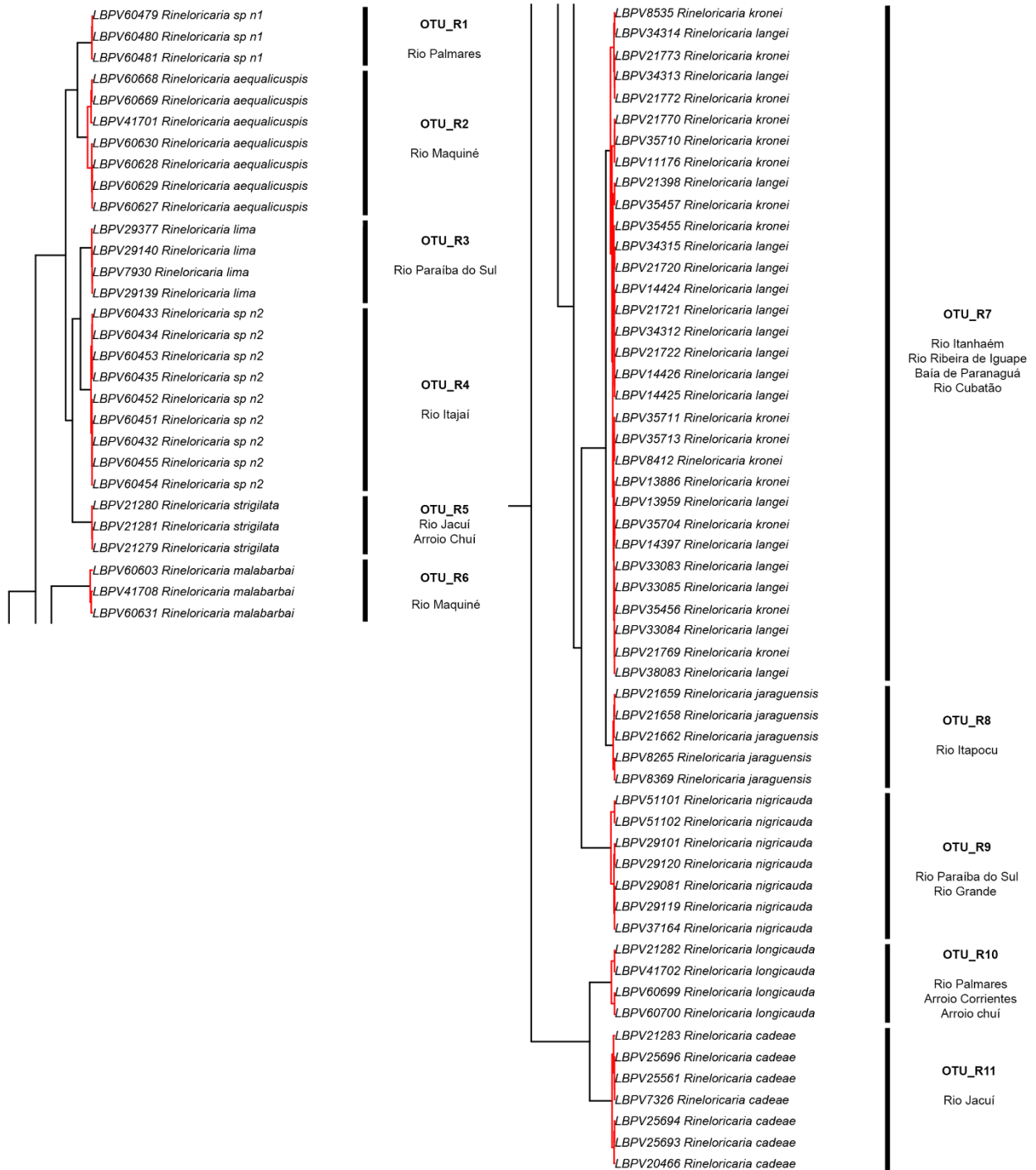


Figura 9. Detalhe do ramo da árvore Bayesiana gerada na análise de GMYC com as OTUs encontradas do gênero *Rineloricaria*. Diferentes indivíduos que compartilham um mesmo ramo vermelho fazem parte de uma mesma OTU.

Tabela 6: Os valores estão apresentados em porcentagem. Em vermelho estão as divergências dentro de cada OTU.

	OTU R1	OTU R2	OTU R3	OTU R4	OTU R5	OTU R6	OTU R7	OTU R8	OTU R9	OTU R10	OTU R11
OTU R1	0 ±0										
OTU R2	2.0 ±0.7	0.6 ±0.3									
OTU R3	2.5 ±0.7	3.4 ±0.8	1.2 ±0.4								
OTU R4	2.9 ±0.9	4.4 ±1.0	2.5 ±0.7	0.1 ±0.1							
OTU R5	3.3 ±0.9	3.8 ±1.0	2.5 ±0.7	4.2 ±1.0	0 ±0						
OTU R6	4.5 ±1.1	6.1 ±1.2	6.5 ±1.2	6.5 ±1.3	7.0 ±1.4	0.2 ±0.2					
OTU R7	5.5 ±1.2	6.5 ±1.3	6.0 ±1.2	6.3 ±1.3	6.8 ±1.3	4.2 ±1.0	0.1 ±0.1				
OTU R8	5.6 ±1.2	6.7 ±1.3	6.6 ±1.2	5.4 ±1.1	7.0 ±1.3	4.4 ±1.1	1.1 ±0.5	0.3 ±0.2			
OTU R9	4.8 ±1.1	5.9 ±1.2	6.9 ±1.3	6.1 ±1.3	7.7 ±1.5	3.6 ±1.0	4.8 ±1.1	4.3 ±1.0	0.2 ±0.2		
OTU R10	7.4 ±1.4	7.9 ±1.4	8.5 ±1.5	8.3 ±1.5	9.1 ±1.7	7.0 ±1.3	9.1 ±1.5	8.7 ±1.5	8.1 ±1.4	0.3 ±0.2	
OTU R11	7.0 ±1.4	7.6 ±1.4	7.5 ±1.4	8.2 ±1.3	8.4 ±1.5	6.3 ±1.3	8.1 ±1.4	7.2 ±1.3	7.6 ±1.4	2.9 ±0.9	0.1 ±0.1

Pareiorhina

Foram analisadas 9 sequências do gênero *Pareiorhina* (*P. brachyrhyncha* e *P. rudolphi*) delimitando duas OTUs (OTU_PB e OTU_PR) (Fig. 10). Essas OTUs foram coletadas na drenagem do rio Paraíba do Sul (Fig. 1). Os valores de divergência genética entre as OTUs foram de 10.3%(±1.5) e dentro da OTUs foi de 0 para OTU_PB e 0.1%(±0.1) para OTU_PR.

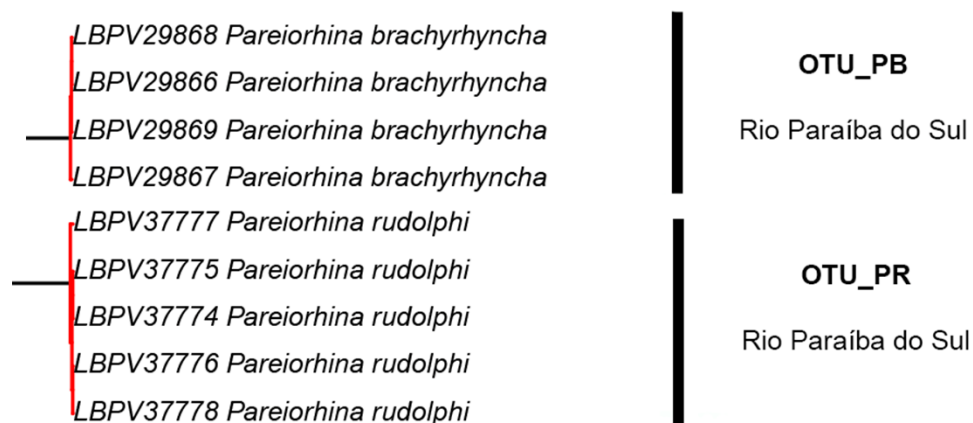


Figura 10. Detalhe do ramo da árvore Bayesiana gerada na análise de GMYC com as OTUs encontradas do gênero *Pareiorhina*. Diferentes indivíduos que compartilham um mesmo ramo vermelho fazem parte de uma mesma OTU.

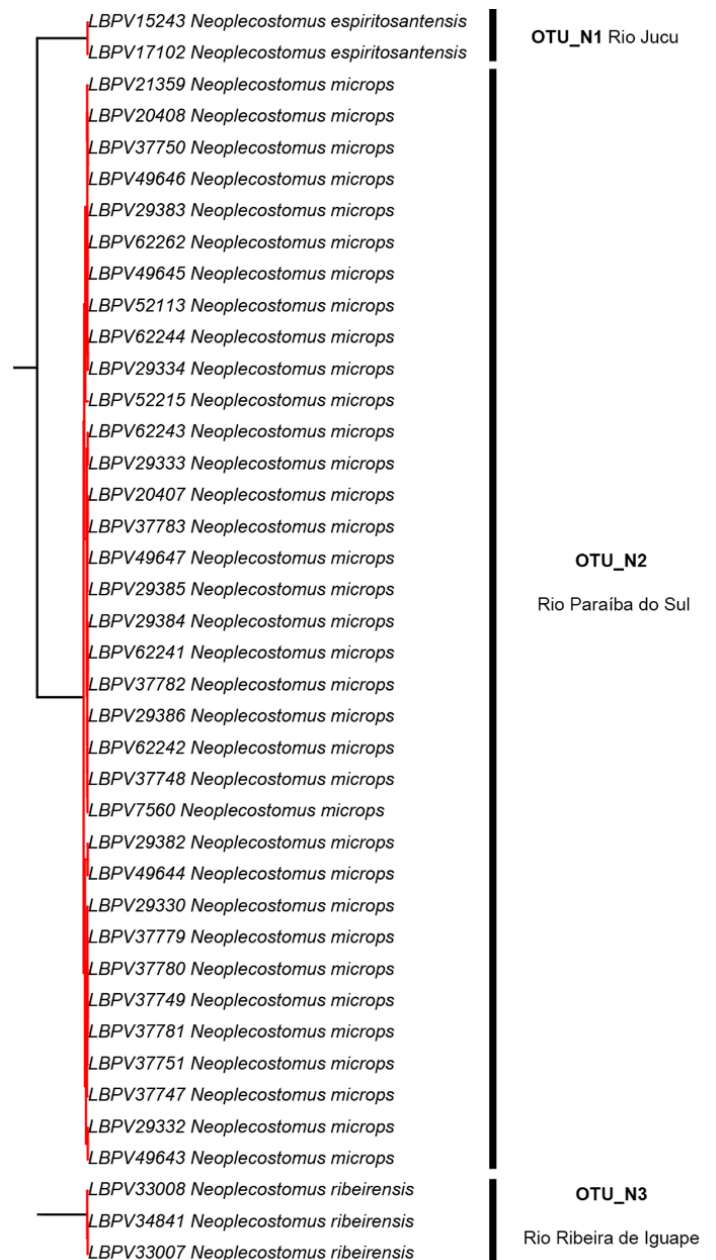
Neoplecostomus

Foram analisadas 40 sequências do gênero *Neoplecostomus* (*N. microps*, *N. espiritosantensis* e *N. ribeirensis*) delimitando três OTUs (OTU_N1, OTU_N2 e OTU_N3) (Fig. 11). Essas OTUs foram coletadas em três drenagens: rio Jucu, rio Paraíba do Sul e rio Ribeira de Iguape (Fig. 1). Os valores de divergência genética entre as OTUs foram de 4.4%(±0.9%) a 10.9%(±1.6), e dentro das OTUs variou de 0 a 0.1%(± 0.1%) (Tabela 7).

Figura 11. Detalhe do ramo da árvore Bayesiana gerada na análise de GMYC com as OTUs encontradas do gênero *Neoplecostomus*. Diferentes indivíduos que compartilham um mesmo ramo vermelho fazem parte de uma mesma OTU.

Tabela 7: Os valores estão apresentados em porcentagem. Em vermelho estão as divergências dentro de cada OTU.

	OTU_N1	OTU_N2	OTU_N3
OTU_N1	-		
OTU_N2	4.4 ±0.9	0.1±0.1	
OTU_N3	10.9 ±1.6	10.9 ±1.5	0 ±0



Kronichthys

Foram analisadas 90 sequências de *Kronichthys* (*K. sp. n.*, *K. lacerta*, *K. subteres* e *K. heylandi*), delimitado seis OTUs (OTU_K1, OTU_K2, OTU_K3, OTU_K4, OTU_K5, OTU_K6 e OTU_K7) (Fig. 12). Essas OTUs foram coletadas em treze diferentes drenagens: Baía de Guaratuba, Baía de Paranaguá, rio Ribeira de Iguape, rio Itanhaém, rio Guaraú, rio Boiçucanga, rio Guaratuba, rio Una, rio Guaxinduba, rio Juqueriquere, rio Mococa, rio Mambucaba e Baía de Parati (Fig. 1). Os valores de divergência genética entre as OTUs foram de 0.9%(±0.4%) a 4.3%(±0.9), e dentro das OTUs variou de 0 a 0.2%(± 0.1%) (Tabela 8).

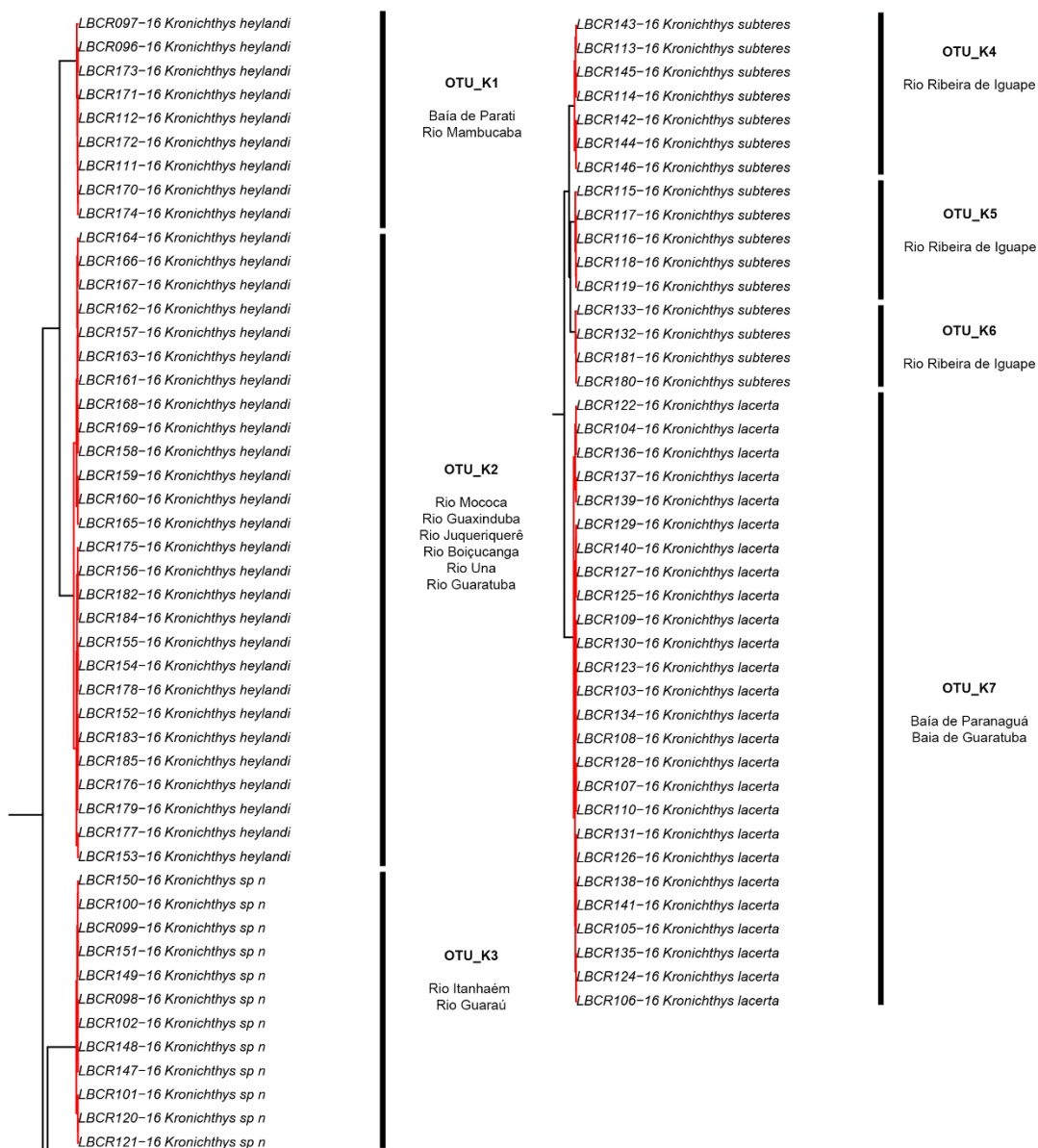


Figura 12. Detalhe do ramo da árvore Bayesiana gerada na análise de GMYC com as OTUs encontradas do gênero *Kronichthys*. Diferentes indivíduos que compartilham um mesmo ramo vermelho fazem parte de uma mesma OTU.

Tabela 8: Os valores estão apresentados em porcentagem. Em vermelho estão as divergências dentro de cada OTU.

	OTU_K1	OTU_K2	OTU_K3	OTU_K4	OTU_K5	OTU_K6	OTU_K7
OTU_K1	0 ±0						
OTU_K2	2.8 ±0.7	0.2 ±0.1					
OTU_K3	4.1 ±0.9	3.6 ±0.8	0 ±0				
OTU_K4	3.7 ±0.9	3.5 ±0.8	3.9 ±0.9	0.1 ±0.1			
OTU_K5	3.6 ±0.9	3.7 ±0.8	3.9 ±0.9	0.9 ±0.4	0 ±0		
OTU_K6	4.1 ±0.9	4.1 ±0.1	4.3 ±0.9	0.9 ±0.4	1.3 ±0.5	0 ±0	
OTU_K7	3.6 ±0.9	3.7 ±0.8	3.4 ±0.8	0.9 ±0.4	1.3 ±0.5	1.3 ±0.5	0 ±0

Pareiorhaphis

Foram analisadas 26 sequências do gênero *Pareiorhaphis* (*P. azygolechis* e *P. splendens*) delimitando três OTUs (OTU_PA, OTU_PS1 e OTU_PS2) (Fig. 13). Essas OTUs foram coletadas em cinco drenagens: rio Cubatão, Baía de Guaratuba, Baía de Paranaguá, rio Itapocu e rio Itajaí (Fig. 1). Os valores de divergência genética entre as OTUs foram de 1.5%(±0.6%) a 6.5%(±1.2), e dentro das OTUs variou de 0 a 0.4%(± 0.2%) (Tabela 9).

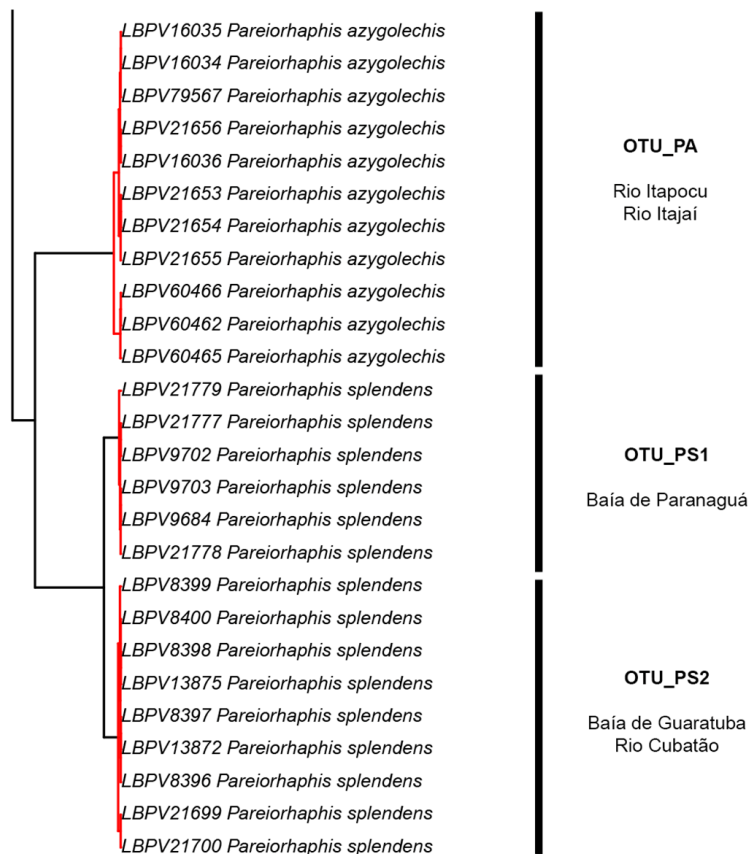


Figura 13. Detalhe do ramo da árvore Bayesiana gerada na análise de GMYC com as OTUs encontradas do gênero *Pareiorhaphis*. Diferentes indivíduos que compartilham um mesmo ramo vermelho fazem parte de uma mesma OTU.

Tabela 9: Os valores estão apresentados em porcentagem. Em vermelho estão as divergências dentro de cada OTU.

	OTU_PA	OTU_PS1	OTU_PS2
OTU_PA	0.4 ±0.2		
OTU_PS1	6.3 ±1.1	0.1 ±0.1	
OTU_PS2	6.5 ±1.2	1.5 ±0.6	0 ±0

Loricariichthys castaneus

Foram analisadas 7 sequências de *Loricariichthys castaneus* delimitando duas OTUs (OTU_LC1 E OTU_LC2) (Fig. 14). Essas OTUs foram coletadas em duas diferentes drenagens: rio Ribeira de Iguape e rio Paraíba do Sul (Fig. 1). Os valores de divergência genética entre as OTUs foram de 2.3%(±0.6) e dentro da OTUs foi de 0.4%(±0.2) para OTU LC1 e 0.7%(±0.3) para LC2.

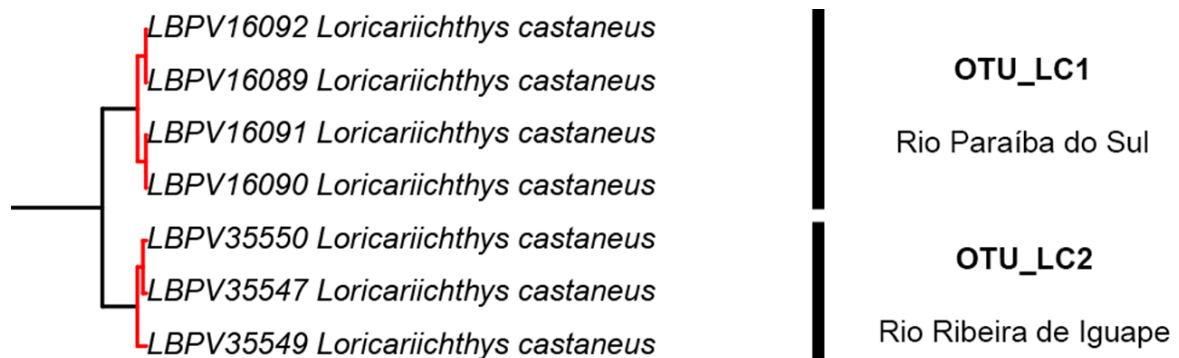


Figura 14. Detalhe do ramo da árvore Bayesiana gerada na análise de GMYC com as OTUs encontradas da espécie *Loricariichthys castaneus*. Diferentes indivíduos que compartilham um mesmo ramo vermelho fazem parte de uma mesma OTU.

Schizolecis guntheri

A análise de GMYC de *Schizolecis guntheri* foi executada no Anexo A e parte de seus resultados foram utilizados nessa parte da dissertação. Foram analisados 94 espécimes desse grupo delimitando cinco OTUs. Os valores de divergência genética entre as OTUs foram de 1.1%(±0.3%) a 8.7%(±1.5), e dentro das OTUs variou de 0 a 1.1%(± 0.3%) (Tabela 10).

Tabela 10: Os valores estão apresentados em porcentagem. Em vermelho estão as divergências dentro de cada OTU.

	OTU I	OTU II	OTU III	OTU IV	OTU V
OTU I	1.1 $\pm$ 0.3				
OTU II	6.4 $\pm$ 1.2	0			
OTU III	8.1 $\pm$ 1.3	8.6 $\pm$ 1.4	0.8 $\pm$ 0.3		
OTU IV	8.0 $\pm$ 1.4	8.4 $\pm$ 1.5	1.1 $\pm$ 0.4	0	
OTU V	8.0 $\pm$ 1.4	8.7 $\pm$ 1.5	2.3 $\pm$ 0.7	1.9 $\pm$ 0.6	0

Biogeografia

A análise geral da distribuição de todas 58 OTUs encontradas na análise GMYC está resumizada na Figura 15.

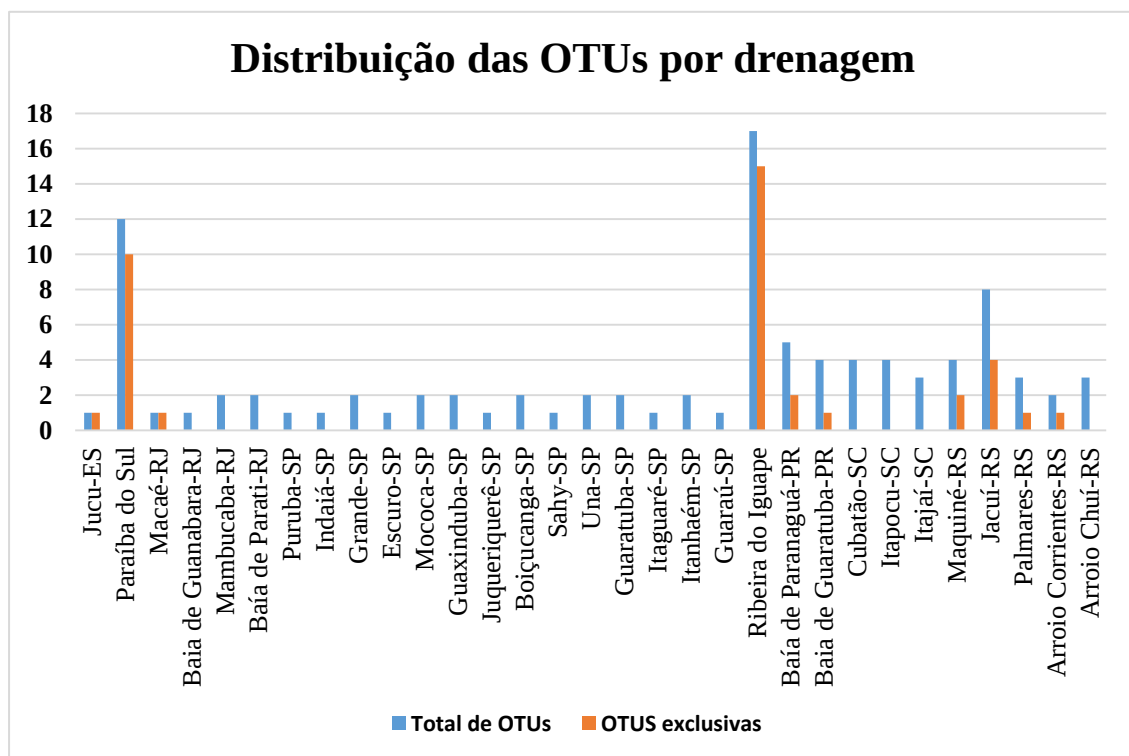


Figura 15. Distribuição das OTUs por drenagem.

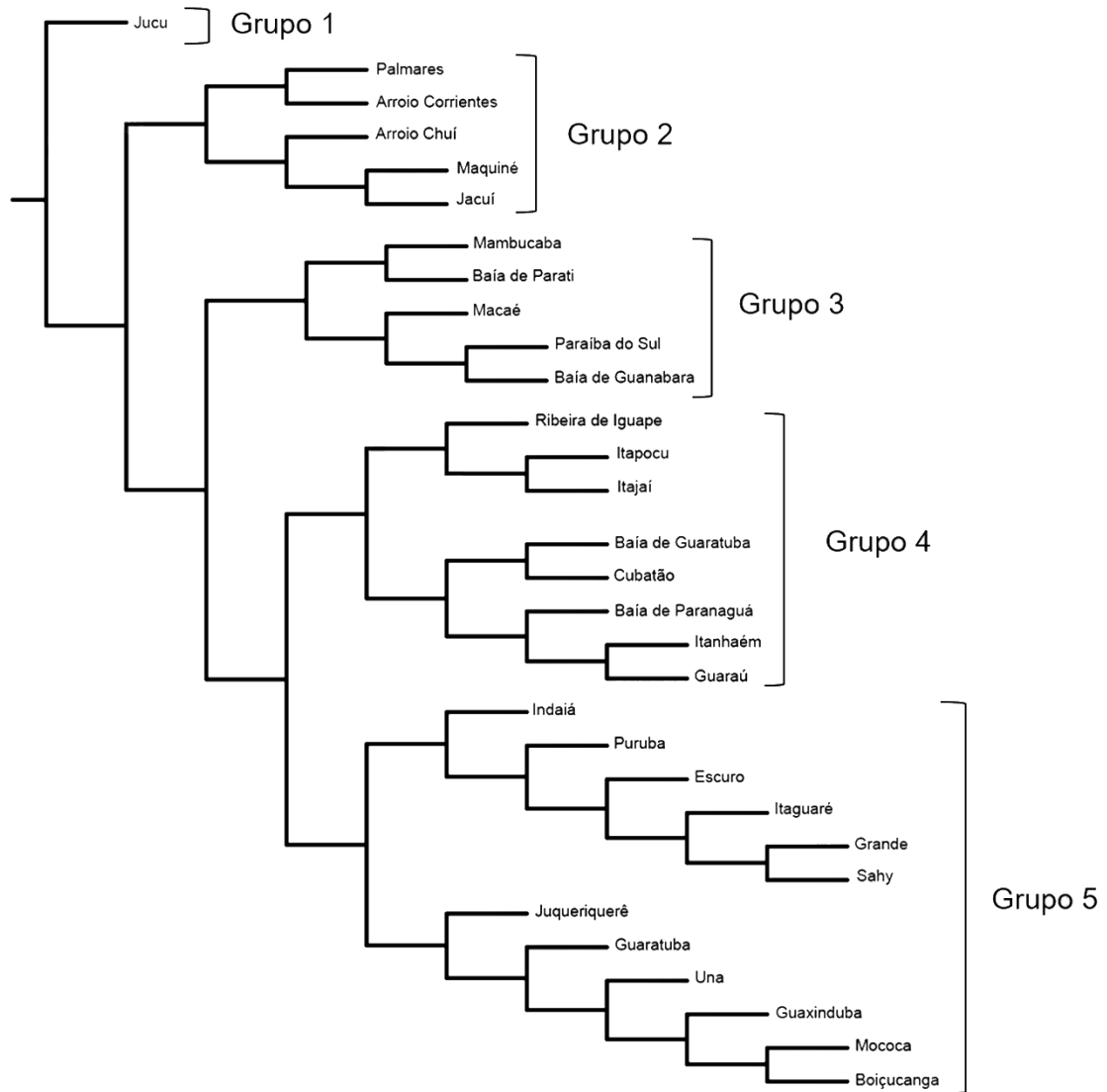


Figura 16: Árvore de consenso de maioria entre as 135 topologias mais parcimoniosas encontradas na análise de PAE entre as drenagens que compõem os rios da bacia do Leste na região Sudeste e Sul.

A análise de PAE realizada resgatou 135 árvores mais parcimoniosas e, após a realização do consenso por maioria, foi gerada uma árvore que mostra o relacionamento entre as drenagens (Figura 16).

5. Discussão

5.1 Identificação molecular de Loricariidae da Bacia do Leste

A família Loricariidae é um grupo de peixes com uma história taxonômica longa e problemática (Armbruster 2004; Roxo et al. 2014; Lujan et al. 2015; Covain et al. 2016). Esses problemas são atribuídos ao grande número de espécies e à semelhança acentuada entre muitos grupos, o que torna difícil compreender e identificar melhor essa família (Armbruster 2004; Costa et al. 2015; Lujan et al. 2015). Alguns trabalhos de identificação molecular têm sido realizados para esse grupo (Roxo et al. 2014, 2015; Costa et al. 2015), e em grande parte se mostraram eficientes para discriminação das espécies, no entanto, dificuldades também vêm sendo encontradas, revelando incongruências entre a identificação morfológica e molecular. Em nosso trabalho também foram encontradas dificuldades de identificação dentro de alguns gêneros como *Hisonotus*, *Hypostomus* e *Rineloricaria* (Fig. 4, Fig. 6 e Fig. 9). Esses grupos apresentam um grande número de espécies e, alguns desses uma história de diversificação recente (Roxo et al. 2014; Costa-Silva et al. 2015; Covain et al. 2016), o que pode contribuir para não encontrarmos um padrão de correspondência morfológica e de identificação molecular pelo gene COI, devido à sua taxa de evolução e não ter havido tempo hábil para o acúmulo acentuado de mutações ao ponto de delimitar inequivocamente as espécies. Por outro lado, diversos grupos que apresentam morfologia pouco variável apresentaram diferenças genéticas, pela delimitação de GMYC, como *Ancistrus multispinis*, *Hisonotus leucofrenatus*, *Kronichthys subteres*, *K. heylandi*, *Loricariichthys castaneus*, *Pareiorhaphis splendens*, *Parotocinclus maculicauda*, *Schizolecis guntheri*.

5.2 Diversidade de espécies e aspectos genéticos da evolução das espécies de Loricariidae

A análise de GMYC revelou 14 linhagens genéticas de Loricariidae antes não reconhecidas, reforçando esse como um bom método para o reconhecimento de Unidades Evolutivas Independentes. Os gêneros *Hisonotus* (8 OTUs) e *Rineloricaria* (11 OTUs) se mostraram os mais diversos quanto ao número de espécies distribuídas ao longo das 31 drenagens do estudo, como já relatado em estudos de levantamento de peixes (e.g. Oyakawa et al. 2006; Menezes et al. 2007; Buckup et al. 2007). Por outro lado, nossas análises delimitaram mais de uma OTU em *Ancistrus multispinis*, *Hisonotus leucofrenatus*, *Kronichthys subteres*, *K.*

heylandi, *Loricariichthys castaneus*, *Pareiorhaphis splendens*, *Parotocinclus maculicauda* e *Schizolecis guntheri*, grupos pouco diversos do ponto de vista morfológico.

As OTUs encontradas nas espécies acima também apresentaram, com exceção de *Kronichthys subteres*, *Pareiorhaphis splendens* e *Parotocinclus maculicauda*, uma divergência significativa, acima de 2% (3, 4, 5, 12, 13, 10 e 14) para o gene COI, podendo sugerir que esses grupos sejam espécies crípticas (Mayr 1942) isto é, unidades biológicas classificadas como uma única espécie nominal que não apresentam caracteres morfológicos distinguíveis, ou por vezes, ainda impossíveis de serem identificados e que se encontram reprodutivamente isolados (Bickford et al. 2007). No entanto, tal isolamento reprodutivo pode ser explicado em consequência do isolamento geográfico no caso das linhagens não simpátricas (Kekkonen & Hebert 2014), como evidenciado para outros grupos, como *Mimagoniates microlepis* (Menezes et al. 2008), *Hollandichthys multifasciatus* (Thomaz et al. 2015), *Cyanocharax itaimbe* (Hirschmann et al. 2015) e, para as linhagens de uma mesma drenagem, podem estar relacionadas com as pressões seletivas divergentes criadas por condições ambientais diferenciadas, por exemplo *Astyanax* e *Bramocharax* (Ornelas-García et al. 2008).

A análise de GMYC também não permitiu distinguir algumas espécies simpátricas (*Hisonotus armatus* e *H. leucofrenatus* e *Rineloricaria langei* e *R. kronei*,) (Fig. 4, Fig. 9). *Rineloricaria kronei* e *R. langei* possuem profundas diferenças morfológicas, que refletem diretamente no nicho e tipo de habitat ocupado por cada uma dessas espécies (Menezes et al. 2007; Ingenito et al. 2008), no entanto, elas se sobrepõem parcialmente suas áreas de distribuição, exceto pelo rio Iguaçu, onde só foi registrado *R. langei* (Ingenito et al. 2008, Costa-Silva et al. 2015). Nesse sentido, são espécies diferentes, mas por estarem em simpatria, seria plausível a miscigenação e a possível introgressão mitocondrial, como também levantado por Costa-Silva et al. (2015).

O resultado encontrado em *R. kronei* e *R. langei*, é parecido com o encontrado no gênero *Hisonotus*. Os espécimes de *Hisonotus leucofrenatus* foram divididos em 3 OTUs, duas compostas apenas por *H. leucofrenatus* (OTU_HL1 e OTU_HL2) e outra OTU (OTU_HLA) composta por indivíduos identificados como *H. armatus* e *H. leucofrenatus* (Fig. 4). A OTU_HLA, *H. armatus* está distribuído pelas drenagens do rio Jacuí e Arroio Chuí e *H. leucofrenatus* pelo rio Maquiné, sendo distintas drenagens, no entanto geograficamente próximas (Fig 1), o que indica que em tempos de glaciação elas podem ter estado na mesma paleodrenagem, possivelmente em simpatria, o que pode ter permitido o compartilhamento de genes.

Em *Hypostomus*, a análise de GMYC não conseguiu discriminar *H. affinis* de *H. commersoni*, distribuídas em drenagens diferentes (Fig. 6) (Menezes et al. 2007). O valor de divergência genética de 0.7% encontrado entre elas é menor que o valor limiar (2%) que tem sido usado para delimitação de espécies através de DNA *barcode* (Ward et al. 2005, 2009; Hubert et al. 2008; Pereira et al. 2013), as possíveis explicações para os valores baixos de divergência genética incluem a diferente taxa de evolução do COI (Ward et al. 2009; Pereira et al. 2013; Mikko et al. 2016) e a recente radiação do grupo datado entre 4 e 12 milhões de anos atrás, como sugerido por Montoya-Burgos et al. (2003).

5.3 Diversidade de espécies das drenagens

As espécies de *Isbrueckerichthys* (*I. alipionis*, *I. duseni* e *I. epakmos*), *Neoplecostomus* (*N. microps*, *N. espiritosantensis* e *N. ribeirensis*), *Harttia* (*H. carvalhoi*, *H. kronei* e *H. loricariformes*) e *Pareiorhina* (*P. brachyrhyncha* e *P. rudolphi*) têm como distribuição as regiões de cabeceira dos rio Ribeira de Iguape, rio Paraíba do Sul e rio Jucu, nesse sentido o retrocesso do mar em períodos de glaciação pouco afetariam a distribuição desses grupos, visto que essas linhagens não ocupam regiões de planícies, tão pouco o leito principal das drenagens (Menezes et al. 2007; Buckup et al. 2007), o que pode ser explicação de não encontrarmos esses gêneros amplamente distribuídos pelas drenagens da bacia do Leste. Portanto, as diversificações desses grupos podem ter como causa os eventos de capturas de cabeceiras que aconteceram entre drenagens da bacia do Leste e entre essas e as bacias adjacentes do interior (Ribeiro 2006).

De acordo com Ribeiro (2006) os eventos de capturas de cabeceira foram bastante comuns entre as drenagens costeiras ou com as drenagens de planalto que drenam para o interior como é o caso dos rios Iguaçu, Tietê, Grande e Paranapanema. Um fato marcante que demonstra os eventos de capturas é o compartilhamento de fauna entre as drenagens do Ribeira de Iguape com o rio Iguaçu retratado em alguns trabalhos (Ribeiro 2006; Menezes et al. 2008). Segundo Menezes et al. (2008) e Buckup (2011), essa região situa-se exatamente sobre a formação geológica do Arco de Ponta Grossa, repleta de falhas tectônicas, o que influencia na estruturação das drenagens e relevo da região e reflete no compartilhamento de fauna. Nesse sentido, pode explicar a dispersão da OTU (OTU_R7) composta pelos morfotipos *Rineloricaria langei* e *R. kronei* pelas drenagens do Ribeira de Iguape, Itanhaém, Baía de Paranaguá e

Cubatão em nosso trabalho, uma vez que *R. langei* na literatura é também registrada no rio Iguaçu (Ingenito et al. 2008; Costa et al. 2015).

Os gêneros *Hisonotus*, *Rineloricaria* e *Hypostomus* são grupos que possuem, em grande parte, espécies de ampla distribuição e uma grande capacidade de sobreviver em ambientes recém colonizados (Silva et al. 2016). Porém até mesmo esses grupos se mostraram ausentes em diversas das pequenas drenagens litorâneas desde Angra dos Reis (rio Mambucaba) até o litoral norte de São Paulo (Itaguaré) (Fig. 1).

Esse fato pode sugerir 1) falha amostral nessas regiões, hipótese essa minimizada pelo esforço amostral na região estudada, 2) esses grupos nunca estiveram nessas drenagens, o que também é pouco plausível pois várias drenagens intermediárias apresentam essas linhagens e 3) essas linhagens estavam presentes em todas as drenagens, mas por algum motivo se perderam por meio de extinções locais. Bizerril (1995) aponta que extinções da ictiofauna da bacia do Leste foram muito frequentes em eras mais recentes, porém diferentemente de rios que fazem parte de grandes bacias hidrográficas, se os pequenos rios da bacia do Leste, que drenam diretamente para o mar, perdessem parte de sua ictiofauna seria necessário um rearranjo da malha hidrográfica para que as linhagens perdidas fossem recompostas. Se essa última hipótese for verdadeira, as drenagens Jacuí- RS, Ribeira de Iguape e Paraíba do Sul que mantiveram linhagens dos gêneros supracitados podem ter servido como refúgios para essa ictiofauna durante condições paleoclimáticas adversas, e ainda nesse sentido devem ser regiões prioritárias para preservação.

5.4 Relacionamento entre as drenagens

As drenagens Jacuí-RS, Ribeira de Iguape e Paraíba do Sul apresentaram uma grande quantidade de OTUs sendo que a maioria dessas é exclusiva (Fig. 15), demonstrando que essas drenagens possuem alto índice de endemismo, semelhante ao encontrado em outros trabalhos (Bizerril 1994; Buckup et al. 2007; Menezes et al. 2007; Abel et al. 2008).

Algumas OTUs se referem a espécies, que tem padrão de distribuição amplo, como no caso de *Ancistrus multispinis*, *Loricariichthys castaneus*, *Schizolecis guntheri* e *Hisonotus leucofrenatus*, mas que geneticamente se mostraram bem estruturadas e exclusivas das drenagens do Jacuí, Ribeira de Iguape e Paraíba do Sul. Assim, mesmo podendo se tratar de espécies crípticas ou não essas OTUs demonstram que essas drenagens possuem faunas bastante

particulares e a perda desse tipo de fauna poderia representar um grande impacto para a diversidade de peixes da região e por esse motivo são de imprescindível preservação.

A análise de PAE (Fig. 16) demonstra que várias drenagens têm compartilhamento de fauna, significando uma estreita relação entre elas. As drenagens Ribeira de Iguape e Jacuí, apresentaram um maior compartilhamento de fauna com drenagens adjacentes e principalmente com as de planícies litorâneas, porém a explicação para esses compartilhamentos parece ser diferente para essas duas drenagens. O rio Jacuí apresentou compartilhamento de linhagens com o rio Maquiné, rio Palmares, Arroio Corrientes e Arroio Chuí. Essas drenagens drenam uma ampla região da planície costeira do Sul do Brasil desembocando no sistema da Lagoa dos Patos, com exceção apenas do Arroio Chuí que desagua diretamente no Oceano Atlântico. Em períodos glaciais de regressão marinha é possível que esses rios faziam parte de uma mesma paleodrenagem (Grupo 2) e por isso seria possível o compartilhamento ictiofaunístico, resultado esse semelhante ao encontrado em Malabarba & Isaia (1992) e Hirschmann et al. (2015). Já o rio Ribeira de Iguape compartilha fauna com os rios de planícies litorâneas do sul de São Paulo (rio Itanhaém) e norte Santa Catarina (rio Itajaí). No entanto, como levantado, o rio Ribeira de Iguape compartilha espécies também presentes no rio Iguaçu, deixando indícios de que eventos de capturas de cabeceiras nas regiões do arco de Ponta Grossa poderiam ser responsáveis pela distribuição e compartilhamento de fauna nas regiões do sul assim como documentado em Menezes et al. (2008), e o compartilhamento pelas drenagens de planícies litorâneas como rio Itanhaém e Guaraú, pode se remeter em função dos “megaleques aluviais” (Horton e De Celles 2001; Wilkinson et al. 2006).

O relacionamento das drenagens apresentados pela análise de PAE são em maioria discordante com as paleodrenagens, inferidas por Thomaz et al. (2015). Uma diferença pode ser notada, por exemplo, no grupo 5 (Fig.16), onde em Thomaz et al. (2015) esses rios são subdivididos em mais de uma paleodrenagem. Essa diferença é interessante, uma vez que a não coincidência entre a distribuição de linhagens e a inferência das paleodrenagens realizado por Thomaz et al. (2015), sugere que o relevo apresentado pela plataforma continental atualmente pode não ter um perfil fidedigno aos leitos das paleodrenagens em períodos glaciais, ou ainda que eventos secundários como capturas de cabeceiras e flutuações laterais dos rios em sistemas de leques aluviais tiveram grande interferência na reformulação da rede hidrográfica da região em um passado recente, o que teria grande interferência na distribuição das espécies de peixes da região Sul e Sudeste.

6. Conclusão

Podemos delimitar cinco ecorregiões para a região Sul e Sudeste, baseado em padrões de distribuição de linhagens de Loricariidae. E consequentemente, vimos que os limites dessas ecorregiões podem estar intimamente relacionadas aos limites das drenagens que, ao longo do tempo, passaram por constantes rearranjos em sua malha hidrográfica. Nesse sentido, o presente trabalho reforça ser de relevância a utilização das linhagens evolutivas para a delimitação de ecorregiões, sendo essas elementos prioritários para projetos de manejo e preservação biológica. Linhagens genéticas de *Ancistrus multispinis*, *Loricariichthys castaneus*, *Schizolecis guntheri* e *Hisonotus leucofrenatus*, que se mostraram bem estruturadas e exclusivas das drenagens do Jacuí, Ribeira de Iguape e Paraíba do Sul, merecem estratégias de manejo particulares nessas drenagens.

7. Referências

- Abell, R., Thieme, M.L., Revenga, C., Bryer, M., Kottelat, M., Bogutskaya, N. et al. (2008). Freshwater Ecoregions of the World: A New Map of Biogeographic Units for Freshwater Biodiversity Conservation. *BioScience* 58, 403.
- Albert, J.S. & Reis, R.E. (2011). Historical biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. Univ. of California Press, Berkeley, Los Angeles.
- Avice, J.C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge.
- Armbruster J.W. (2004). Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 141, 1–80.
- Benzaquem, D.C., Oliveira, C., da Silva Batista, J., Zuanon, J., & Porto, J. I. R. (2015). DNA Barcoding in pencilfishes (Lebiasinidae: Nannostomus) reveals cryptic diversity across the Brazilian Amazon. *PLoS ONE*, 10(2), e0112217.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K. & Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 148–155.
- Bizerril, C. (1994). Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste brasileiro. *Acta Biologica Leopoldensia* 16, 51–80.
- Buckup, P.A., Menezes, N.A., Ghazzi, M.S. (2007). Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro, Museu Nacional, 195.
- Buckup, P. A. (2011). The Eastern Brazilian Shield. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*, 203–210.
- Brasil. Portaria nº 445/2014, de 18 de dezembro 2014. Peixes e Invertebrados Aquáticos Ameaçados. Disponível em: pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=126&data=18/12/2014> Acesso em: 20 dez. 2016.
- Carvalho, D. C., Oliveira, D., Pompeu, P. S., Leal, C. G., Oliveira, C. & Hanner, R. (2011). Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco

River basin. *Mitochondrial DNA*, 22, 80-86.

- Chiachio, M.C., Oliveira, C. & Montoya-Burgos, J.I. (2008). Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49, 606–617.
- Costa, W. (1995). *Pearl killifishes – the Cynolebiatinae: system-atics and biogeography of the neotropical annual fish subfamily*. T. F H. Publications., Neptune City.
- Costa-Silva, G.J., Rodriguez, M.S., Roxo, F.F., Foresti, F. & Oliveira, C. (2015). Using different methods to access the difficult task of delimiting species in a complex neotropical hyperdiverse group. *PLoS ONE* 10, 1–12.
- Covain, R., & Fisch-Muller, S. (2007). The genera of the Neotropical armored catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes: Loricariidae): a practical key and synopsis. *Zootaxa*, 1462, 1-40.
- Covain, R., Fisch-Muller, S., Oliveira, C., Mol, J. H., Montoya-Burgos, J. I., & Dray, S. (2016). Molecular phylogeny of the highly diversified catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae) reveals incongruences with morphological classification. *Molecular phylogenetics and evolution*, 94, 492-517.
- Drummond, A.J. & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology* 7, 214.
- Edgar, R.C., Drive, R.M. & Valley, M. (2004). MUSCLE : multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. 32, 1792–1797.
- Eschmeyer, W.N. & Fong, J.D. (2017). Species by Family/Subfamily. Available via <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily>.
- Fontaneto, D., Herniou, E.A., Boschetti, C., Caprioli, M., Melone, G., Ricci, C. & Barraclough, T.G. (2007). Independently Evolving Species in Asexual Bdelloid Rotifers M. A. F. Noor (Ed). *PLoS Biology* 5, e87.
- Goloboff, P.A, Farris, J.S. & Nixon, K.C. (2008). TNT, a free programm for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24(5), 774–786.
- Gomes, L.C., Pessali, T.C., Sales, N.G., Pompeu, P.S., & Carvalho, D. C. (2015). Integrative

- taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a neotropical river basin. *Genetica*, 143(5), 581-588.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & DeWaard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270, 313–321.
- Henriques, J.M., José, G. & Ashikaga, F.Y. (2015). Use of DNA barcode in the identification of fish species from Ribeira de Iguape Basin and coastal rivers from São Paulo State (Brazil). *DNA Barcodes* 3, 118–128.
- Hirschmann, A., Malabarba, L.R., Thomaz, A.T. & Fagundes, N.J.R. (2015). Riverine habitat specificity constrains dispersion in a Neotropical fish (Characidae) along Southern Brazilian drainages. *Zoologica Scripta* 44(4), 374–382.
- Horton, B.K. & PG DeCelles (2001). Modern and ancient fluvial megafans in the foreland basin system of the central Andes, southern Bolivia: Implications for drainage network evolution in fold-thrust belts. *Basin Research* 13, 43–63.
- Hubert N., Hanner R., Holm E., Mandrak N.E., Taylor E., Burrridge M. et al. (2008). Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *Plos One* 3:e2490.
- Ingenito, L.F.S., Ghazzi, M.S., Duboc, L.F. & Abilhoa, V. (2008). Two new species of Rineloricaria (Siluriformes : Loricariidae) from the rio Iguaçu basin, southern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 6(3), 355–366.
- Ivanova, N. V., Zelmak, T.S., Hanner, R.H. & Hebert, P.D.N. (2007). Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7, 544–548.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S. et al. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Kekkonen, M. & Hebert, P.D.N (2014). DNA barcode-based delineation of putative species: efficient start for taxonomic workflows. *Molecular ecology resources* 14(4), 706–15.
- Lima, F.C., & Ribeiro A.C. (2011). Continental-scale tectonic controls of biogeography and ecology. Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. *University of California Press, Berkeley*, 145-164.

- Lee, M.Y., Munroe, T.A. & Shao, K.-T. (2014). Description of a new cryptic, shallow-water tonguefish (Pleuronectiformes: Cynoglossidae: Symphurus) from the western North Pacific Ocean. *Journal of Fish Biology* 85, 563–585.
- Lujan, N.K., Armbruster J.W., Lovejoy N., López-Fernández H. (2015). Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62, 269–288.
- Malabarba, L. R. & E. A. Isaia (1992). The fresh water fish fauna of the rio Tramandaí drainage, Rio Grande do Sul, Brazil, with a discussion of its historical origin. *Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS*, 5: 197-223.
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the Origin of Species, from the Viewpoint of a Zoologist*. New York, NY: Harvard University Press.
- Mateussi, N. T., Pavanelli, C. S., & Oliveira, C. (2016). Molecular identification of cryptic diversity in species of cis-Andean Mylossoma (Characiformes: Serrasalminidae). *Mitochondrial DNA Part A*, 1-3.
- Melo, B. F., Benine, R. C., Mariguela, T. C., Oliveira, C. (2011) A new species of *Tetragonopterus* Cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae: Tetragonopterinae) from the rio Jari, Amapá, northern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 9: 49 –56.
- Melo, B. F., Vari, R. P., & Oliveira, C. (2016). *Curimatopsis maculosa*, a new species from the Rio Tapajós, Amazon basin, Brazil (Teleostei: Curimatidae). *Ichthyological exploration of freshwaters*, 27(4), 303-308.
- Menezes, N.A., Weitzman S.H., Oyakawa O.T., Lima F.C.T., Castro R.M.C. & Weitzman M.J. (2007). Peixes de água doce da Mata Atlântica: lista preliminar de espécies e comentários sobre conservação de peixes de água doce neotropicais. São Paulo, Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 408p.
- Menezes, N.A., Ribeiro, A.C., Weitzman, S. & Torres, R.A. (2008). Biogeography of Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae) revisited: phylogenetic patterns, historical geology and genetic connectivity. *Zootaxa*, 1726: 33-48.
- Mikko, P., Heli, S., Marko, M. & Tomas, R. (2016). Molecular evolution of a widely-adopted

- taxonomic marker (COI) across the animal tree of life. *Scientific Reports* 6, 35275.
- Montoya-Burgos, J.I. (2003). Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, 12(7), 1855-1867.
- Nelson JS. (2006). *Fishes of the world*. 4th ed., John Wiley e Sons, Inc.
- Nixon, K.C. (2002). WinClada (computer program for entering and analyzing cladistic data). Published by the author [Available at <http://www.cladistics.com>], Ithaca, NY.
- Oyakawa, O.T. (1993). Cinco espécies novas de *Harttia* Steindachner, 1876 da região sudeste do Brasil, e comentários sobre o gênero (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Série Zoologia*, 6, 3-28.
- Oyakawa, O.T., Akama, A., Mautari, K.C. & Nolasco, J.C. (2006). Peixes de riachos da mata atlântica nas Unidades de Conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo: Editora Neotrópica Ltda, 201 p.
- Ornelas-García, C. P., Domínguez-Domínguez, O., & Doadrio, I. (2008). Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854)(Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC evolutionary biology*, 8(1), 1.
- Pereira, L.H.G., Pazian, M.F., Hanner, R., Foresti, F. & Oliveira, C. (2011). DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paraná basin of Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22, 87-96.
- Pereira, L.H.G., Hanner, R., Foresti, F. & Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics*, 14, 20.
- Pons, J., Barraclough, T.G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D.P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W.D. & Vogler, A.P. (2006). Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Systematic Biology* 55, 595–609.
- R Development Core Team (2013) R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*.
- Ribeiro, A.C. (2006). Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the

coastal drainages of eastern Brazil : an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology* 4, 225–246.

- Rossini, B. C., Oliveira, C. A. M., de Melo, F. A. G., de Araújo Bertaco, V., de Astarloa, J. M. D., Rosso, J. J. et al. (2016). Highlighting Astyanax Species Diversity through DNA Barcoding. *PloS one*, 11(12), e0167203.
- Roxo, F. F., Zawadzki, C. H., Alexandrou, M. A., Costa Silva, G. J., Chiachio, M. C., Foresti, F., & Oliveira, C. (2012). Evolutionary and biogeographic history of the subfamily Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Ecology and Evolution*, 2(10), 2438–2449.
- Roxo, F.F., Albert, J.S., Silva, G.S.C., Zawadzki, C.H., Foresti, F. & Oliveira, C. (2014). Molecular Phylogeny and Biogeographic History of the Armored Neotropical Catfish Subfamilies Hypoptopomatinae, Neoplecostominae and Otothyriinae (Siluriformes: Loricariidae). *PLoS ONE* 9(8): e105564.
- Roxo, F.F., Ochoa, L.E., Costa-silva, G.J. & Oliveira, C. (2015). Species delimitation in Neoplecostomus (Siluriformes : Loricariidae) using morphologic and genetic approaches. *DNA Barcodes* 3, 110–117.
- Silva, G.S.C., Roxo, F.F., Lujan, N.K., Tagliacollo, V.A., Zawadzki, C.H. & Oliveira, C. (2016). Transcontinental dispersal, ecological opportunity and origins of an adaptive radiation in the Neotropical catfish genus Hypostomus (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Ecology*, 25: 1511–1529.
- Shimabukuro-Dias, C.K., Costa Silva, G.J. da, Ashikaga, F.Y., Foresti, F. & Oliveira, C. (2016). Molecular identification of the fish fauna from the pantanal flood plain area in Brazil. *Mitochondrial DNA Part A* 1394, 1–5.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30, 2725–9.
- Thomaz, A.T., Malabarba, L.R., Bonatto, S.L. & Knowles, L.L. (2015). Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: Study of a Neotropical fish of the Brazilian coastal Atlantic Forest. *Journal of Biogeography* 42, 2389–2401.

- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857.
- Ward, R. D., Hanner, R., & Hebert, P. D. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of fish biology*, 74(2), 329-356.
- Weitzman, S.H., Menezes, N.A. & Weitzman, M.J. (1988). Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distributions of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. In: P.E. Vanzolini & W. R. Heyer (Eds.). *Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns*. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, 379-427.
- Wilkinson, M.J., Marshall, L.G. & Lundberg, J.G. (2006). River behavior on megafans and potential influences on diversification and distribution of aquatic organisms. *Journal of South American Earth Sciences* 21, 151–172.
- Xia, X. (2001). DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Journal of Heredity* 92, 371–373.
- Xia, X. (2009). Assessing substitution saturation with DAMBE. , 49–58.

Apêndice A. Lista dos espécimes analisados no presente trabalho.

Bold						
Process ID	Voucher	Lote	Espécie	Estado	Latitude	Longitude
LBCR289-16	LBPV35471	7379	<i>Ancistrus multispinis</i>	São Paulo	-24,5617	-48,6683
LBCR283-16	LBPV60618	14462	<i>Ancistrus multispinis</i>	Rio Grande do Sul	-29,7761	-50,4428
LBCR290-16	LBPV49601	10690	<i>Ancistrus multispinis</i>	São Paulo	-22,5437	-44,9177
LBCR297-16	LBPV49680	10719	<i>Ancistrus multispinis</i>	São Paulo	-22,5383	-44,8011
LBCR287-16	LBPV35468	7379	<i>Ancistrus multispinis</i>	São Paulo	-24,5617	-48,6683
LBCR288-16	LBPV35470	7379	<i>Ancistrus multispinis</i>	São Paulo	-24,5617	-48,6683
LBCR292-16	LBPV49612	10694	<i>Ancistrus multispinis</i>	São Paulo	-22,5786	-44,8896
LBCR291-16	LBPV49603	10690	<i>Ancistrus multispinis</i>	São Paulo	-22,5437	-44,9177
LBCR296-16	LBPV49664	10710	<i>Ancistrus multispinis</i>	São Paulo	-22,5046	-44,7397
LBCR286-16	LBPV60617	14462	<i>Ancistrus multispinis</i>	Rio Grande do Sul	-29,7761	-50,4428
LBCR285-16	LBPV60616	14462	<i>Ancistrus multispinis</i>	Rio Grande do Sul	-29,7761	-50,4428
LBCR284-16	LBPV60615	14462	<i>Ancistrus multispinis</i>	Rio Grande do Sul	-29,7761	-50,4428
LBCR293-16	LBPV49613	10694	<i>Ancistrus multispinis</i>	São Paulo	-22,5786	-44,8896
LBCR294-16	LBPV49614	10694	<i>Ancistrus multispinis</i>	São Paulo	-22,5786	-44,8896
LBCR295-16	LBPV49616	10694	<i>Ancistrus multispinis</i>	São Paulo	-22,5786	-44,8896
LBCR301-16	LBPV62551	16347	<i>Ancistrus multispinis</i>	Rio de Janeiro	-22,5149	-44,744
LBCR300-16	LBPV62250	16347	<i>Ancistrus multispinis</i>	Rio de Janeiro	-22,5149	-44,744
LBCR299-16	LBPV49682	10719	<i>Ancistrus multispinis</i>	São Paulo	-22,5383	-44,8011
LBCR298-16	LBPV49681	10719	<i>Ancistrus multispinis</i>	São Paulo	-22,5383	-44,8011
LBCR186-16	LBPV37790	8047	<i>Harttia carvalhoi</i>	São Paulo	-22,583	-45,169
LBCR189-16	LBPV37788	8047	<i>Harttia carvalhoi</i>	São Paulo	-22,583	-45,169
LBCR188-16	LBPV37787	8047	<i>Harttia carvalhoi</i>	São Paulo	-22,583	-45,169
LBCR187-16	LBPV37746	8035	<i>Harttia carvalhoi</i>	São Paulo	-22,583	-45,169
LBCR191-16	LBPV37745	8035	<i>Harttia carvalhoi</i>	São Paulo	-22,583	-45,169
LBCR190-16	LBPV37789	8047	<i>Harttia carvalhoi</i>	São Paulo	-22,583	-45,169
LBCR193-16	LBPV35453	7374	<i>Harttia kronei</i>	São Paulo	-24,562	-48,668
LBCR192-16	LBPV35452	7374	<i>Harttia kronei</i>	São Paulo	-24,562	-48,668
LBCR194-16	LBPV35451	7374	<i>Harttia kronei</i>	São Paulo	-24,562	-48,668
LBCR198-16	LBPV21366	2121	<i>Harttia loricariformis</i>	São Paulo	-22,87	-44,85
LBCR196-16	LBPV21364	2121	<i>Harttia loricariformis</i>	São Paulo	-22,87	-44,85
LBCR195-16	LBPV21363	2121	<i>Harttia loricariformis</i>	São Paulo	-22,87	-44,85
LBCR199-16	LBPV21362	2121	<i>Harttia loricariformis</i>	São Paulo	-22,87	-44,85
LBCR197-16	LBPV21365	2121	<i>Harttia loricariformis</i>	São Paulo	-22,87	-44,85
LBCR271-16	LBPV60812	14530	<i>Hisonotus armatus</i>	Rio Grande do Sul	-33,6896	-53,4395
LBCR268-16	LBPV60612	14461	<i>Hisonotus armatus</i>	Rio Grande do Sul	-29,7761	-50,4428
LBCR269-16	LBPV60613	14461	<i>Hisonotus armatus</i>	Rio Grande do Sul	-29,7761	-50,4428
LBCR270-16	LBPV60811	14530	<i>Hisonotus armatus</i>	Rio Grande do Sul	-33,6896	-53,4395
LBCR266-16	LBPV60610	14461	<i>Hisonotus armatus</i>	Rio Grande do Sul	-29,7761	-50,4428
LBCR267-16	LBPV60611	14461	<i>Hisonotus armatus</i>	Rio Grande do Sul	-29,7761	-50,4428
LBCR273-16	LBPV61172	14697	<i>Hisonotus carreiro</i>	Rio Grande do Sul	-28,6342	-51,6148
LBCR274-16	LBPV61174	14697	<i>Hisonotus carreiro</i>	Rio Grande do Sul	-28,6342	-51,6148
LBCR272-16	LBPV61171	14697	<i>Hisonotus carreiro</i>	Rio Grande do Sul	-28,6342	-51,6148
LBCR262-16	LBPV33113	6837	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	São Paulo	-24,2122	-47,4838
LBCR279-16	LBPV69464	16847	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	São Paulo	-24,2073	-47,4769
LBCR278-16	LBPV69460	16847	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	São Paulo	-24,2073	-47,4769
LBCR264-16	LBPV34322	7159	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	Paraná	-25,5398	-48,6887

LBCR263-16	LBPV33115	6837	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	São Paulo	-24,2122	-47,4838
LBCR261-16	LBPV29057	6037	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	Rio Grande do Sul	-29,7013	-50,1867
LBCR260-16	LBPV29055	6037	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	Rio Grande do Sul	-29,7013	-50,1867
LBCR259-16	LBPV29053	6037	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	Rio Grande do Sul	-29,7013	-50,1867
LBCR258-16	LBPV21667	3634	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	Santa Catarina	-26,4714	-49,182
LBCR257-16	LBPV21665	3634	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	Santa Catarina	-26,4714	-49,182
LBCR256-16	LBPV21664	3634	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	Santa Catarina	-26,4714	-49,182
LBCR255-16	LBPV21636	3622	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	Santa Catarina	-26,4926	-49,078
LBCR240-16	LBPV13934	2039	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	Santa Catarina	-26,1765	-48,9103
LBCR241-16	LBPV13937	2039	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	Santa Catarina	-26,1765	-48,9103
LBCR242-16	LBPV13938	2039	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	Santa Catarina	-26,1765	-48,9103
LBCR243-16	LBPV14433	2085	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	Paraná	-25,5548	-48,8007
LBCR244-16	LBPV14434	2085	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	Paraná	-25,5548	-48,8007
LBCR245-16	LBPV14435	2085	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	Paraná	-25,5548	-48,8007
LBCR246-16	LBPV14436	2085	<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	Paraná	-25,5548	-48,8007
LBCR281-16	LBPV25616	4783	<i>Hisonotus nigricauda</i>	Rio Grande do Sul	-30,3011	-51,3447
LBCR280-16	LBPV25615	4783	<i>Hisonotus nigricauda</i>	Rio Grande do Sul	-30,3011	-51,3447
LBCR282-16	LBPV25617	4783	<i>Hisonotus nigricauda</i>	Rio Grande do Sul	-30,3011	-51,3447
LBCR247-16	LBPV20256	3472	<i>Hisonotus notatus</i>	Rio de Janeiro	-22,2353	-41,8624
LBCR250-16	LBPV20260	3472	<i>Hisonotus notatus</i>	Rio de Janeiro	-22,2353	-41,8624
LBCR249-16	LBPV20259	3472	<i>Hisonotus notatus</i>	Rio de Janeiro	-22,2353	-41,8624
LBCR248-16	LBPV20258	3472	<i>Hisonotus notatus</i>	Rio de Janeiro	-22,2353	-41,8624
LBCR276-16	LBPV61183	14699	<i>Hisonotus prata</i>	Rio Grande do Sul	-28,6342	-51,6148
LBCR265-16	LBPV60495	14451	<i>Hisonotus prata</i>	Rio Grande do Sul	-30,3177	-50,4879
LBCR275-16	LBPV61182	14699	<i>Hisonotus prata</i>	Rio Grande do Sul	-28,6342	-51,6148
LBCR277-16	LBPV61184	14699	<i>Hisonotus prata</i>	Rio Grande do Sul	-28,6342	-51,6148
LBCR252-16	LBPV21247	3376	<i>Hisonotus taimensis</i>	Rio Grande do Sul	-31,4795	-52,213
LBCR253-16	LBPV21248	3376	<i>Hisonotus taimensis</i>	Rio Grande do Sul	-31,4795	-52,213
LBCR251-16	LBPV21246	3376	<i>Hisonotus taimensis</i>	Rio Grande do Sul	-31,4795	-52,213
LBCR254-16	LBPV21250	3376	<i>Hisonotus taimensis</i>	Rio Grande do Sul	-31,4795	-52,213
LBCR315-16	LBPV29109	6463	<i>Hypostomus affinis</i>	São Paulo	-23,369	-46,0245
LBCR321-16	LBPV29355	6311	<i>Hypostomus affinis</i>	São Paulo	-22,6333	-44,6
LBCR320-16	LBPV29354	6311	<i>Hypostomus affinis</i>	São Paulo	-22,6333	-44,6
LBCR319-16	LBPV29113	6464	<i>Hypostomus affinis</i>	São Paulo	-23,369	-46,0245
LBCR318-16	LBPV29112	6463	<i>Hypostomus affinis</i>	São Paulo	-23,369	-46,0245
LBCR317-16	LBPV29111	6463	<i>Hypostomus affinis</i>	São Paulo	-23,369	-46,0245
LBCR316-16	LBPV29110	6463	<i>Hypostomus affinis</i>	São Paulo	-23,369	-46,0245
LBCR322-16	LBPV34907	7507	<i>Hypostomus ancistroides</i>	São Paulo	-23,8454	-47,0853
LBCR323-16	LBPV34908	7507	<i>Hypostomus ancistroides</i>	São Paulo	-23,8454	-47,0853
LBCR324-16	LBPV34909	7507	<i>Hypostomus ancistroides</i>	São Paulo	-23,8454	-47,0853
LBCR329-16	LBPV37754	8037	<i>Hypostomus auroguttatus</i>	São Paulo	-22,5996	-45,1608
LBCR328-16	LBPV37753	8037	<i>Hypostomus auroguttatus</i>	São Paulo	-22,5996	-45,1608
LBCR327-16	LBPV37752	8037	<i>Hypostomus auroguttatus</i>	São Paulo	-22,5996	-45,1608
LBCR332-16	LBPV37784	8046	<i>Hypostomus auroguttatus</i>	São Paulo	-22,5835	-45,1691
LBCR331-16	LBPV37756	8037	<i>Hypostomus auroguttatus</i>	São Paulo	-22,5996	-45,1608
LBCR330-16	LBPV37755	8037	<i>Hypostomus auroguttatus</i>	São Paulo	-22,5996	-45,1608
LBCR308-16	LBPV29082	6442	<i>Hypostomus auroguttatus</i>	São Paulo	-23,3739	-46,0529
LBCR314-16	LBPV29108	6463	<i>Hypostomus auroguttatus</i>	São Paulo	-23,369	-46,0245
LBCR313-16	LBPV29100	6463	<i>Hypostomus auroguttatus</i>	São Paulo	-23,369	-46,0245
LBCR312-16	LBPV29086	6442	<i>Hypostomus auroguttatus</i>	São Paulo	-23,3739	-46,0529

LBCR311-16	LBPV29085	6442	<i>Hypostomus auroguttatus</i>	São Paulo	-23,3739	-46,0529
LBCR310-16	LBPV29084	6442	<i>Hypostomus auroguttatus</i>	São Paulo	-23,3739	-46,0529
LBCR309-16	LBPV29083	6442	<i>Hypostomus auroguttatus</i>	São Paulo	-23,3739	-46,0529
LBCR334-16	LBPV37786	8046	<i>Hypostomus auroguttatus</i>	São Paulo	-22,5835	-45,1691
LBCR333-16	LBPV37785	8046	<i>Hypostomus auroguttatus</i>	São Paulo	-22,5835	-45,1691
LBCR307-16	LBPV29059	6038	<i>Hypostomus commersoni</i>	Rio Grande do Sul	-29,7013	-50,1867
LBCR306-16	LBPV29058	6038	<i>Hypostomus commersoni</i>	Rio Grande do Sul	-29,7013	-50,1867
LBCR335-16	LBPV60601	14453	<i>Hypostomus commersoni</i>	Rio Grande do Sul	-29,7761	-50,4428
LBCR326-16	LBPV35569	7497	<i>Hypostomus tapijara</i>	São Paulo	-24,3916	-47,8352
LBCR325-16	LBPV35568	7497	<i>Hypostomus tapijara</i>	São Paulo	-24,3916	-47,8352
LBCR485-16	LBPV34850	7375	<i>Isbrueckerichthys alipionis</i>	São Paulo	-24,5617	-48,6683
LBCR483-16	LBPV34848	7375	<i>Isbrueckerichthys alipionis</i>	São Paulo	-24,5617	-48,6683
LBCR484-16	LBPV34849	7375	<i>Isbrueckerichthys alipionis</i>	São Paulo	-24,5617	-48,6683
LBCR486-16	LBPV34851	7375	<i>Isbrueckerichthys alipionis</i>	São Paulo	-24,5617	-48,6683
LBCR480-16	LBPV17402	2650	<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	Paraná	-25,0464	-49,0928
LBCR481-16	LBPV35486	7385	<i>Isbrueckerichthys epakmos</i>	São Paulo	-23,9671	-47,508
LBCR482-16	LBPV35487	7385	<i>Isbrueckerichthys epakmos</i>	São Paulo	-23,9671	-47,508
LBCR168-16	LBPV54840	14385	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,564	-45,309
LBCR169-16	LBPV54841	14385	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,564	-45,309
LBCR098-16	LBPV12890	1768	<i>Kronichthys sp.n</i>	São Paulo	-24,368	-47,055
LBCR171-16	LBPV61107	14426	<i>Kronichthys heylandi</i>	Rio de Janeiro	-22,961	-44,559
LBCR172-16	LBPV61108	14426	<i>Kronichthys heylandi</i>	Rio de Janeiro	-22,961	-44,559
LBCR173-16	LBPV61109	14426	<i>Kronichthys heylandi</i>	Rio de Janeiro	-22,961	-44,559
LBCR174-16	LBPV61110	14426	<i>Kronichthys heylandi</i>	Rio de Janeiro	-22,961	-44,559
LBCR175-16	LBPV61121	14432	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,729	-45,742
LBCR176-16	LBPV61122	14432	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,729	-45,742
LBCR177-16	LBPV61123	14432	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,729	-45,742
LBCR178-16	LBPV61124	14432	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,729	-45,742
LBCR179-16	LBPV61125	14432	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,729	-45,742
LBCR180-16	LBPV69455	19555	<i>Kronichthys subteres</i>	São Paulo	-24,2073	-47,4769
LBCR181-16	LBPV69459	19555	<i>Kronichthys subteres</i>	São Paulo	-24,2073	-47,4769
LBCR182-16	LBPV53309	14318	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,7822	-45,9503
LBCR183-16	LBPV53310	14318	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,7822	-45,9503
LBCR184-16	LBPV53311	14318	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,7822	-45,9503
LBCR185-16	LBPV53312	14318	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,7822	-45,9503
LBCR117-16	LBPV18605	2881	<i>Kronichthys subteres</i>	São Paulo	-24,062	-47,59
LBCR116-16	LBPV18604	2881	<i>Kronichthys subteres</i>	São Paulo	-24,062	-47,59
LBCR115-16	LBPV18603	2881	<i>Kronichthys subteres</i>	São Paulo	-24,062	-47,59
LBCR114-16	LBPV17425	2659	<i>Kronichthys subteres</i>	São Paulo	-24,57	-48,671
LBCR113-16	LBPV17422	2659	<i>Kronichthys subteres</i>	São Paulo	-24,57	-48,671
LBCR112-16	LBPV14457	2122	<i>Kronichthys heylandi</i>	Rio de Janeiro	-23,24	-44,763
LBCR111-16	LBPV14449	2122	<i>Kronichthys heylandi</i>	Rio de Janeiro	-23,24	-44,763
LBCR110-16	LBPV14362	2061	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,692	-48,574
LBCR109-16	LBPV14361	2061	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,692	-48,574
LBCR108-16	LBPV14360	2061	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,692	-48,574
LBCR107-16	LBPV14359	2061	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,692	-48,574
LBCR106-16	LBPV14358	2061	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,692	-48,574
LBCR105-16	LBPV13955	2043	<i>Kronichthys lacerta</i>	Santa Catarina	-26,004	-48,868
LBCR170-16	LBPV61106	14426	<i>Kronichthys heylandi</i>	Rio de Janeiro	-22,961	-44,559
LBCR099-16	LBPV12891	1768	<i>Kronichthys sp. n</i>	São Paulo	-24,368	-47,055

LBCR100-16	LBPV12893	1768	<i>Kronichthys sp. n</i>	São Paulo	-24,368	-47,055
LBCR101-16	LBPV12894	1768	<i>Kronichthys sp. n</i>	São Paulo	-24,368	-47,055
LBCR102-16	LBPV12895	1768	<i>Kronichthys sp. n</i>	São Paulo	-24,368	-47,055
LBCR103-16	LBPV13953	2043	<i>Kronichthys lacerta</i>	Santa Catarina	-26,004	-48,868
LBCR104-16	LBPV13954	2043	<i>Kronichthys lacerta</i>	Santa Catarina	-26,004	-48,868
LBCR118-16	LBPV18606	2881	<i>Kronichthys subteres</i>	São Paulo	-24,062	-47,59
LBCR119-16	LBPV18607	2881	<i>Kronichthys subteres</i>	São Paulo	-24,062	-47,59
LBCR120-16	LBPV21380	2129	<i>Kronichthys sp. n</i>	São Paulo	-24,086	-46,733
LBCR121-16	LBPV21381	2129	<i>Kronichthys sp. n</i>	São Paulo	-24,086	-46,733
LBCR122-16	LBPV21610	3615	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,487	-48,852
LBCR123-16	LBPV21611	3615	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,487	-48,852
LBCR124-16	LBPV21693	3645	<i>Kronichthys lacerta</i>	Santa Catarina	-26,003	-48,873
LBCR125-16	LBPV21694	3645	<i>Kronichthys lacerta</i>	Santa Catarina	-26,003	-48,873
LBCR126-16	LBPV21695	3645	<i>Kronichthys lacerta</i>	Santa Catarina	-26,003	-48,873
LBCR127-16	LBPV21774	3675	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,508	-48,876
LBCR128-16	LBPV21775	3675	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,508	-48,876
LBCR129-16	LBPV26462	5244	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,508	-48,876
LBCR130-16	LBPV26463	5244	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,508	-48,876
LBCR131-16	LBPV26464	5244	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,508	-48,876
LBCR132-16	LBPV33093	6834	<i>Kronichthys subteres</i>	São Paulo	-24,212	-47,484
LBCR133-16	LBPV33094	6834	<i>Kronichthys subteres</i>	São Paulo	-24,212	-47,484
LBCR134-16	LBPV34307	7156	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,54	-48,689
LBCR135-16	LBPV34308	7156	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,54	-48,689
LBCR136-16	LBPV34309	7156	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,54	-48,689
LBCR137-16	LBPV34310	7156	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,54	-48,689
LBCR138-16	LBPV34311	7156	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,54	-48,689
LBCR139-16	LBPV34343	7167	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,441	-48,874
LBCR140-16	LBPV34344	7167	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,441	-48,874
LBCR141-16	LBPV34346	7167	<i>Kronichthys lacerta</i>	Paraná	-25,441	-48,874
LBCR142-16	LBPV35462	7378	<i>Kronichthys subteres</i>	São Paulo	-24,562	-48,668
LBCR143-16	LBPV35463	7378	<i>Kronichthys subteres</i>	São Paulo	-24,562	-48,668
LBCR144-16	LBPV35464	7378	<i>Kronichthys subteres</i>	São Paulo	-24,562	-48,668
LBCR145-16	LBPV35465	7378	<i>Kronichthys subteres</i>	São Paulo	-24,562	-48,668
LBCR146-16	LBPV35466	7378	<i>Kronichthys subteres</i>	São Paulo	-24,562	-48,668
LBCR147-16	LBPV38156	8178	<i>Kronichthys sp. n</i>	São Paulo	-24,089	-46,656
LBCR148-16	LBPV38157	8178	<i>Kronichthys sp. n</i>	São Paulo	-24,089	-46,656
LBCR149-16	LBPV38158	8178	<i>Kronichthys sp. n</i>	São Paulo	-24,089	-46,656
LBCR150-16	LBPV38159	8178	<i>Kronichthys sp. n</i>	São Paulo	-24,089	-46,656
LBCR151-16	LBPV38160	8178	<i>Kronichthys sp. n</i>	São Paulo	-24,089	-46,656
LBCR152-16	LBPV54701	14341	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,778	-45,611
LBCR153-16	LBPV54702	14341	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,778	-45,611
LBCR154-16	LBPV54703	14341	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,778	-45,611
LBCR155-16	LBPV54704	14341	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,778	-45,611
LBCR156-16	LBPV54705	14341	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,778	-45,611
LBCR157-16	LBPV54746	14356	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,706	-45,494
LBCR158-16	LBPV54747	14356	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,706	-45,494
LBCR159-16	LBPV54748	14356	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,706	-45,494
LBCR160-16	LBPV54749	14356	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,706	-45,494
LBCR161-16	LBPV54750	14356	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,706	-45,494
LBCR162-16	LBPV54791	14370	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,609	-45,401

LBCR163-16	LBPV54792	14370	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,609	-45,401
LBCR164-16	LBPV54793	14370	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,609	-45,401
LBCR165-16	LBPV54795	14370	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,609	-45,401
LBCR166-16	LBPV54838	14385	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,564	-45,309
LBCR167-16	LBPV54839	14385	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-23,564	-45,309
LBCR096-16	LBPV10052	4955	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-15,581	-47,343
LBCR097-16	LBPV10053	4955	<i>Kronichthys heylandi</i>	São Paulo	-15,581	-47,343
LBCR367-16	LBPV16090	2382	<i>Loricariichthys castaneus</i>	Rio de Janeiro	-22	-41,3333
LBCR369-16	LBPV16092	2382	<i>Loricariichthys castaneus</i>	Rio de Janeiro	-22	-41,3333
LBCR370-16	LBPV35547	7490	<i>Loricariichthys castaneus</i>	São Paulo	-24,3916	-47,8352
LBCR371-16	LBPV35549	7490	<i>Loricariichthys castaneus</i>	São Paulo	-24,3916	-47,8352
LBCR372-16	LBPV35550	7490	<i>Loricariichthys castaneus</i>	São Paulo	-24,3916	-47,8352
LBCR366-16	LBPV16089	2382	<i>Loricariichthys castaneus</i>	Rio de Janeiro	-22	-41,3333
LBCR368-16	LBPV16091	2382	<i>Loricariichthys castaneus</i>	Rio de Janeiro	-22	-41,3333
LBCR447-16	LBPV29382	6319	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,6554	-44,5789
LBCR479-16	LBPV62262	16352	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,6545	-44,5811
LBCR478-16	LBPV62244	16341	<i>Neoplecostomus microps</i>	Rio de Janeiro	-22,4325	-44,5321
LBCR477-16	LBPV62243	16341	<i>Neoplecostomus microps</i>	Rio de Janeiro	-22,4325	-44,5321
LBCR476-16	LBPV62242	16341	<i>Neoplecostomus microps</i>	Rio de Janeiro	-22,4325	-44,5321
LBCR475-16	LBPV62241	16341	<i>Neoplecostomus microps</i>	Rio de Janeiro	-22,4325	-44,5321
LBCR474-16	LBPV52175	12255	<i>Neoplecostomus microps</i>	Minas Gerais	-21,2354	-43,5141
LBCR473-16	LBPV52177	12247	<i>Neoplecostomus microps</i>	Minas Gerais	-21,2464	-43,5021
LBCR472-16	LBPV52176	12247	<i>Neoplecostomus microps</i>	Minas Gerais	-21,2464	-43,5021
LBCR471-16	LBPV52157	12247	<i>Neoplecostomus microps</i>	Minas Gerais	-21,2464	-43,5021
LBCR470-16	LBPV52113	12236	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,7856	-45,4556
LBCR469-16	LBPV49647	10703	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,4857	-44,9241
LBCR468-16	LBPV49646	10703	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,4857	-44,9241
LBCR467-16	LBPV49645	10703	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,4857	-44,9241
LBCR466-16	LBPV49644	10703	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,4857	-44,9241
LBCR465-16	LBPV49643	10703	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,4857	-44,9241
LBCR460-16	LBPV37782	8045	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,5835	-45,1691
LBCR459-16	LBPV37781	8045	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,5835	-45,1691
LBCR458-16	LBPV37780	8045	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,5835	-45,1691
LBCR457-16	LBPV37779	8045	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,5835	-45,1691
LBCR456-16	LBPV37751	8036	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,5996	-45,1608
LBCR455-16	LBPV37750	8036	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,5996	-45,1608
LBCR454-16	LBPV37749	8036	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,5996	-45,1608
LBCR453-16	LBPV37748	8036	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,5996	-45,1608
LBCR452-16	LBPV37747	8036	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,5996	-45,1608
LBCR451-16	LBPV29386	6319	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,6554	-44,5789
LBCR450-16	LBPV29385	6319	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,6554	-44,5789
LBCR449-16	LBPV29384	6319	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,6554	-44,5789
LBCR448-16	LBPV29383	6319	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,6554	-44,5789
LBCR446-16	LBPV29334	6296	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,6573	-44,7638
LBCR445-16	LBPV29333	6296	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,6573	-44,7638
LBCR444-16	LBPV29332	6296	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,6573	-44,7638
LBCR443-16	LBPV29330	6296	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,6573	-44,7638
LBCR442-16	LBPV21359	2120	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,8703	-44,8508
LBCR441-16	LBPV20408	3406	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,8309	-44,8649
LBCR461-16	LBPV37783	8045	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,5835	-45,1691

LBCR440-16	LBPV20407	3406	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,8309	-44,8649
LBCR439-16	LBPV7560	646	<i>Neoplecostomus microps</i>	São Paulo	-22,8724	-45,6111
LBCR506-16	LBPV34841	7384	<i>Neoplecostomus ribeirensis</i>	São Paulo	-23,9671	-47,508
LBCR508-16	LBPV33008	6808	<i>Neoplecostomus ribeirensis</i>	São Paulo	-23,9671	-47,508
LBCR507-16	LBPV33007	6808	<i>Neoplecostomus ribeirensis</i>	São Paulo	-23,9671	-47,508
LBCR364-16	LBPV60466	14442	<i>Pareiorhaphis azygolechis</i>	Santa Catarina	-27,6581	-49,4208
LBCR365-16	LBPV79567	20158	<i>Pareiorhaphis azygolechis</i>	Santa Catarina	-26,4701	-49,1824
LBCR358-16	LBPV21700	3646	<i>Pareiorhaphis azygolechis</i>	Santa Catarina	-26,0029	-48,873
LBCR362-16	LBPV60462	14442	<i>Pareiorhaphis azygolechis</i>	Santa Catarina	-27,6581	-49,4208
LBCR363-16	LBPV60465	14442	<i>Pareiorhaphis azygolechis</i>	Santa Catarina	-27,6581	-49,4208
LBCR350-16	LBPV16034	2362	<i>Pareiorhaphis azygolechis</i>	Santa Catarina	-26,4736	-49,1933
LBCR351-16	LBPV16035	2362	<i>Pareiorhaphis azygolechis</i>	Santa Catarina	-26,4736	-49,1933
LBCR352-16	LBPV16036	2362	<i>Pareiorhaphis azygolechis</i>	Santa Catarina	-26,4736	-49,1933
LBCR353-16	LBPV21653	3632	<i>Pareiorhaphis azygolechis</i>	Santa Catarina	-26,4714	-49,182
LBCR354-16	LBPV21654	3632	<i>Pareiorhaphis azygolechis</i>	Santa Catarina	-26,4714	-49,182
LBCR355-16	LBPV21655	3632	<i>Pareiorhaphis azygolechis</i>	Santa Catarina	-26,4714	-49,182
LBCR356-16	LBPV21656	3632	<i>Pareiorhaphis azygolechis</i>	Santa Catarina	-26,4714	-49,182
LBCR357-16	LBPV21699	3646	<i>Pareiorhaphis azygolechis</i>	Santa Catarina	-26,0029	-48,873
LBCR341-16	LBPV8400	748	<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Santa Catarina	-25,9847	-48,8942
LBCR345-16	LBPV9684	1117	<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Paraná	-25,4888	-48,8438
LBCR360-16	LBPV21778	3676	<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Paraná	-25,5082	-48,8756
LBCR359-16	LBPV21777	3676	<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Paraná	-25,5082	-48,8756
LBCR346-16	LBPV13872	2022	<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Santa Catarina	-26,0026	-48,8657
LBCR347-16	LBPV13873	2022	<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Santa Catarina	-26,0026	-48,8657
LBCR348-16	LBPV13875	2022	<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Santa Catarina	-26,0026	-48,8657
LBCR349-16	LBPV13956	2044	<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Santa Catarina	-26,0039	-48,8683
LBCR340-16	LBPV8399	748	<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Santa Catarina	-25,9847	-48,8942
LBCR339-16	LBPV8398	748	<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Santa Catarina	-25,9847	-48,8942
LBCR338-16	LBPV8397	748	<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Santa Catarina	-25,9847	-48,8942
LBCR361-16	LBPV21779	3676	<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Paraná	-25,5082	-48,8756
LBCR344-16	LBPV9703	1117	<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Paraná	-25,4888	-48,8438
LBCR343-16	LBPV9702	1117	<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Paraná	-25,4888	-48,8438
LBCR342-16	LBPV9683	1117	<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Paraná	-25,4888	-48,8438
LBCR337-16	LBPV8396	748	<i>Pareiorhaphis splendens</i>	Santa Catarina	-25,9847	-48,8942
LBCR216-16	LBPV18573	2869	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,2122	-47,4838
LBCR215-16	LBPV18571	2869	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,2122	-47,4838
LBCR234-16	LBPV35703	7422	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,7569	-48,0687
LBCR235-16	LBPV60456	14439	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	Santa Catarina	-27,6581	-49,4208
LBCR236-16	LBPV69456	16846	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,2073	-47,4769
LBCR237-16	LBPV69457	16846	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,2073	-47,4769
LBCR238-16	LBPV69458	16846	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,2073	-47,4769
LBCR232-16	LBPV35700	7422	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,7569	-48,0687
LBCR233-16	LBPV35702	7422	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,7569	-48,0687
LBCR239-16	LBPV6294	517	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,5705	-48,6713
LBCR231-16	LBPV35699	7422	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,7569	-48,0687
LBCR230-16	LBPV35675	7414	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,5901	-48,275
LBCR229-16	LBPV35674	7414	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,5901	-48,275
LBCR228-16	LBPV35673	7414	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,5901	-48,275
LBCR227-16	LBPV35672	7414	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,5901	-48,275
LBCR226-16	LBPV35654	7407	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,5901	-48,275

LBCR225-16	LBPV35428	7368	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,5617	-48,6683
LBCR224-16	LBPV35427	7368	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,5617	-48,6683
LBCR223-16	LBPV35426	7368	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,5617	-48,6683
LBCR222-16	LBPV33092	6833	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,2122	-47,4838
LBCR221-16	LBPV33090	6833	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,2122	-47,4838
LBCR220-16	LBPV33089	6833	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,2122	-47,4838
LBCR219-16	LBPV33088	6833	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,2122	-47,4838
LBCR218-16	LBPV21638	3622	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	Santa Catarina	-26,4926	-49,078
LBCR217-16	LBPV18608	2882	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	São Paulo	-24,0618	-47,5901
LBCR209-16	LBPV13905	2032	<i>Pseudotothyris ignota</i>	Santa Catarina	-26,1765	-48,9103
LBCR214-16	LBPV13902	2032	<i>Pseudotothyris ignota</i>	Santa Catarina	-26,1765	-48,9103
LBCR213-16	LBPV13975	2051	<i>Pseudotothyris ignota</i>	Paraná	-25,9539	-48,7176
LBCR212-16	LBPV79575	20307	<i>Pseudotothyris ignota</i>	Paraná	-25,7671	-48,5867
LBCR211-16	LBPV13976	2051	<i>Pseudotothyris ignota</i>	Paraná	-25,9539	-48,7176
LBCR210-16	LBPV13904	2032	<i>Pseudotothyris ignota</i>	Santa Catarina	-26,1765	-48,9103
LBCR208-16	LBPV13906	2032	<i>Pseudotothyris ignota</i>	Santa Catarina	-26,1765	-48,9103
LBCR207-16	LBPV8421	750	<i>Pseudotothyris ignota</i>	Paraná	-25,6903	-48,4953
LBCR206-16	LBPV8473	757	<i>Pseudotothyris obtusa</i>	Paraná	-25,5231	-48,8083
LBCR205-16	LBPV19474	3240	<i>Pseudotothyris obtusa</i>	Paraná	-25,5208	-48,798
LBCR204-16	LBPV19473	3240	<i>Pseudotothyris obtusa</i>	Paraná	-25,5208	-48,798
LBCR436-16	LBPV60669	14482	<i>Rineloricaria aequalicuspis</i>	Rio Grande do Sul	-29,7205	-50,1987
LBCR430-16	LBPV60627	14465	<i>Rineloricaria aequalicuspis</i>	Rio Grande do Sul	-29,7761	-50,4428
LBCR431-16	LBPV60628	14465	<i>Rineloricaria aequalicuspis</i>	Rio Grande do Sul	-29,7761	-50,4428
LBCR432-16	LBPV60629	14465	<i>Rineloricaria aequalicuspis</i>	Rio Grande do Sul	-29,7761	-50,4428
LBCR413-16	LBPV41701	8943	<i>Rineloricaria aequalicuspis</i>	Rio Grande do Sul	-29,5706	-50,2639
LBCR433-16	LBPV60630	14465	<i>Rineloricaria aequalicuspis</i>	Rio Grande do Sul	-29,7761	-50,4428
LBCR435-16	LBPV60668	14482	<i>Rineloricaria aequalicuspis</i>	Rio Grande do Sul	-29,7205	-50,1987
LBCR390-16	LBPV25693	4807	<i>Rineloricaria cadeae</i>	Rio Grande do Sul	-30,5472	-51,5257
LBCR391-16	LBPV25694	4807	<i>Rineloricaria cadeae</i>	Rio Grande do Sul	-30,5472	-51,5257
LBCR392-16	LBPV25696	4807	<i>Rineloricaria cadeae</i>	Rio Grande do Sul	-30,5472	-51,5257
LBCR487-16	LBPV7326	901	<i>Rineloricaria cadeae</i>	Rio Grande do Sul	-30,0561	-51,3763
LBCR488-16	LBPV25561	4767	<i>Rineloricaria cadeae</i>	Rio Grande do Sul	-30,3002	-51,2973
LBCR490-16	LBPV20466	3336	<i>Rineloricaria cadeae</i>	Rio Grande do Sul	-32,1519	-52,1067
LBCR491-16	LBPV21283	9159	<i>Rineloricaria cadeae</i>	Rio Grande do Sul	-31,4795	-52,213
LBCR501-16	LBPV8369	730	<i>Rineloricaria jaraguensis</i>	Santa Catarina	-26,4559	-49,1752
LBCR380-16	LBPV21659	3633	<i>Rineloricaria jaraguensis</i>	Santa Catarina	-26,4714	-49,182
LBCR381-16	LBPV21662	3633	<i>Rineloricaria jaraguensis</i>	Santa Catarina	-26,4714	-49,182
LBCR382-16	LBPV21658	3633	<i>Rineloricaria jaraguensis</i>	Santa Catarina	-26,4714	-49,182
LBCR500-16	LBPV8265	728	<i>Rineloricaria jaraguensis</i>	Santa Catarina	-26,4559	-49,1752
LBCR499-16	LBPV11176	1248	<i>Rineloricaria kronei</i>	São Paulo	-24,2669	-47,4126
LBCR374-16	LBPV13959	2047	<i>Rineloricaria kronei</i>	Santa Catarina	-26,0039	-48,8683
LBCR373-16	LBPV13886	2028	<i>Rineloricaria kronei</i>	Santa Catarina	-26,0026	-48,8657
LBCR386-16	LBPV21769	3674	<i>Rineloricaria kronei</i>	Paraná	-25,5082	-48,8756
LBCR387-16	LBPV21770	3674	<i>Rineloricaria kronei</i>	Paraná	-25,5082	-48,8756
LBCR388-16	LBPV21772	3674	<i>Rineloricaria kronei</i>	Paraná	-25,5082	-48,8756
LBCR389-16	LBPV21773	3674	<i>Rineloricaria kronei</i>	Paraná	-25,5082	-48,8756
LBCR497-16	LBPV8535	771	<i>Rineloricaria kronei</i>	Paraná	-25,4888	-48,8438
LBCR498-16	LBPV8412	745	<i>Rineloricaria kronei</i>	Santa Catarina	-25,9847	-48,8942
LBCR405-16	LBPV35455	7376	<i>Rineloricaria kronei</i>	São Paulo	-24,5617	-48,6683
LBCR406-16	LBPV35456	7376	<i>Rineloricaria kronei</i>	São Paulo	-24,5617	-48,6683

LBCR407-16	LBPV35457	7376	<i>Rineloricaria kronei</i>	São Paulo	-24,5617	-48,6683
LBCR408-16	LBPV35704	7423	<i>Rineloricaria kronei</i>	São Paulo	-24,7569	-48,0687
LBCR409-16	LBPV35710	7424	<i>Rineloricaria kronei</i>	São Paulo	-24,7569	-48,0687
LBCR410-16	LBPV35711	7424	<i>Rineloricaria kronei</i>	São Paulo	-24,7569	-48,0687
LBCR411-16	LBPV35713	7424	<i>Rineloricaria kronei</i>	São Paulo	-24,7569	-48,0687
LBCR375-16	LBPV14397	2070	<i>Rineloricaria kronei</i>	Paraná	-25,4582	-48,8347
LBCR401-16	LBPV34312	7157	<i>Rineloricaria langei</i>	Paraná	-25,5398	-48,6887
LBCR376-16	LBPV14424	2082	<i>Rineloricaria langei</i>	Paraná	-25,5548	-48,8007
LBCR377-16	LBPV14425	2082	<i>Rineloricaria langei</i>	Paraná	-25,5548	-48,8007
LBCR378-16	LBPV14426	2082	<i>Rineloricaria langei</i>	Paraná	-25,5548	-48,8007
LBCR379-16	LBPV21398	2134	<i>Rineloricaria langei</i>	São Paulo	-24,2765	-47,2259
LBCR383-16	LBPV21720	3657	<i>Rineloricaria langei</i>	Paraná	-25,5208	-48,798
LBCR384-16	LBPV21721	3657	<i>Rineloricaria langei</i>	Paraná	-25,5208	-48,798
LBCR385-16	LBPV21722	3657	<i>Rineloricaria langei</i>	Paraná	-25,5208	-48,798
LBCR398-16	LBPV33083	6832	<i>Rineloricaria langei</i>	São Paulo	-24,2122	-47,4838
LBCR399-16	LBPV33084	6832	<i>Rineloricaria langei</i>	São Paulo	-24,2122	-47,4838
LBCR400-16	LBPV33085	6832	<i>Rineloricaria langei</i>	São Paulo	-24,2122	-47,4838
LBCR402-16	LBPV34313	7157	<i>Rineloricaria langei</i>	Paraná	-25,5398	-48,6887
LBCR403-16	LBPV34314	7157	<i>Rineloricaria langei</i>	Paraná	-25,5398	-48,6887
LBCR404-16	LBPV34315	7157	<i>Rineloricaria langei</i>	Paraná	-25,5398	-48,6887
LBCR412-16	LBPV38083	8222	<i>Rineloricaria langei</i>	São Paulo	-24,1008	-46,7309
LBCR395-16	LBPV29139	6453	<i>Rineloricaria lima</i>	São Paulo	-23,3606	-46,0025
LBCR397-16	LBPV29377	6318	<i>Rineloricaria lima</i>	São Paulo	-22,6554	-44,5789
LBCR396-16	LBPV29140	6453	<i>Rineloricaria lima</i>	São Paulo	-23,3606	-46,0025
LBCR502-16	LBPV7930	4949	<i>Rineloricaria lima</i>	São Paulo	-22,8196	-44,4714
LBCR492-16	LBPV21282	3384	<i>Rineloricaria longicauda</i>	Rio Grande do Sul	-31,4795	-52,213
LBCR437-16	LBPV60699	14494	<i>Rineloricaria longicauda</i>	Rio Grande do Sul	-30,3177	-50,4879
LBCR438-16	LBPV60700	14494	<i>Rineloricaria longicauda</i>	Rio Grande do Sul	-30,3177	-50,4879
LBCR493-16	LBPV41702	8944	<i>Rineloricaria longicauda</i>	Rio Grande do Sul	-31,8642	-52,8233
LBCR434-16	LBPV60631	14465	<i>Rineloricaria malabarbai</i>	Rio Grande do Sul	-29,7761	-50,4428
LBCR414-16	LBPV41708	8943	<i>Rineloricaria malabarbai</i>	Rio Grande do Sul	-29,5706	-50,2639
LBCR429-16	LBPV60603	14455	<i>Rineloricaria malabarbai</i>	Rio Grande do Sul	-29,7761	-50,4428
LBCR496-16	LBPV37164	7919	<i>Rineloricaria nigricauda</i>	São Paulo	-23,4456	-45,0898
LBCR494-16	LBPV29101	6465	<i>Rineloricaria nigricauda</i>	São Paulo	-23,369	-46,0245
LBCR393-16	LBPV29119	6459	<i>Rineloricaria nigricauda</i>	São Paulo	-23,3627	-45,9906
LBCR415-16	LBPV51101	11400	<i>Rineloricaria nigricauda</i>	Rio de Janeiro	-21,9936	-42,2782
LBCR394-16	LBPV29120	6459	<i>Rineloricaria nigricauda</i>	São Paulo	-23,3627	-45,9906
LBCR495-16	LBPV29081	6444	<i>Rineloricaria nigricauda</i>	São Paulo	-23,3739	-46,0529
LBCR416-16	LBPV51102	11400	<i>Rineloricaria nigricauda</i>	Rio de Janeiro	-21,9936	-42,2782
LBCR428-16	LBPV60481	14448	<i>Rineloricaria sp.n</i>	Rio Grande do Sul	-30,3177	-50,4879
LBCR427-16	LBPV60480	14448	<i>Rineloricaria sp.n</i>	Rio Grande do Sul	-30,3177	-50,4879
LBCR426-16	LBPV60479	14448	<i>Rineloricaria sp.n</i>	Rio Grande do Sul	-30,3177	-50,4879
LBCR425-16	LBPV60455	14438	<i>Rineloricaria sp.n</i>	Santa Catarina	-27,6581	-49,4208
LBCR418-16	LBPV60433	14434	<i>Rineloricaria sp.n</i>	Santa Catarina	-27,7541	-49,3956
LBCR419-16	LBPV60434	14434	<i>Rineloricaria sp.n</i>	Santa Catarina	-27,7541	-49,3956
LBCR420-16	LBPV60435	14434	<i>Rineloricaria sp.n</i>	Santa Catarina	-27,7541	-49,3956
LBCR421-16	LBPV60451	14438	<i>Rineloricaria sp.n</i>	Santa Catarina	-27,6581	-49,4208
LBCR422-16	LBPV60452	14438	<i>Rineloricaria sp.n</i>	Santa Catarina	-27,6581	-49,4208
LBCR423-16	LBPV60453	14438	<i>Rineloricaria sp.n</i>	Santa Catarina	-27,6581	-49,4208
LBCR424-16	LBPV60454	14438	<i>Rineloricaria sp.n</i>	Santa Catarina	-27,6581	-49,4208

LBCR417-16	LBPV60432	14434	<i>Rineloricaria sp.n</i>	Santa Catarina	-27,7541	-49,3956
LBCR505-16	LBPV21279	3384	<i>Rineloricaria strigilata</i>	Rio Grande do Sul	-31,4795	-52,213
LBCR503-16	LBPV21280	3384	<i>Rineloricaria strigilata</i>	Rio Grande do Sul	-31,4795	-52,213
LBCR504-16	LBPV21281	3384	<i>Rineloricaria strigilata</i>	Rio Grande do Sul	-31,4795	-52,213
LBCR063-16	LBPV34508	7169	<i>Schizolecis guntheri</i>	Paraná	-25,441	-48,874
LBCR062-16	LBPV34507	7169	<i>Schizolecis guntheri</i>	Paraná	-25,441	-48,874
LBCR061-16	LBPV19475	3241	<i>Schizolecis guntheri</i>	Paraná	-25,508	-48,876
LBCR060-16	LBPV19479	3241	<i>Schizolecis guntheri</i>	Paraná	-25,508	-48,876
LBCR059-16	LBPV19477	3241	<i>Schizolecis guntheri</i>	Paraná	-25,508	-48,876
LBCR058-16	LBPV19472	3241	<i>Schizolecis guntheri</i>	Paraná	-25,508	-48,876
LBCR057-16	LBPV15266	2513	<i>Schizolecis guntheri</i>	Rio de Janeiro	-22,525	-42,688
LBCR056-16	LBPV54861	14391	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,484	-45,173
LBCR055-16	LBPV54865	14391	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,484	-45,173
LBCR054-16	LBPV54836	14384	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,564	-45,309
LBCR053-16	LBPV54835	14384	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,564	-45,309
LBCR052-16	LBPV54834	14384	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,564	-45,309
LBCR051-16	LBPV54833	14384	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,564	-45,309
LBCR050-16	LBPV54832	14384	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,564	-45,309
LBCR049-16	LBPV54800	14372	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,609	-45,401
LBCR048-16	LBPV60595	14421	<i>Schizolecis guntheri</i>	Rio de Janeiro	-23,123	-44,729
LBCR047-16	LBPV60553	14410	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,355	-44,951
LBCR046-16	LBPV60552	14410	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,355	-44,951
LBCR045-16	LBPV60554	14410	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,355	-44,951
LBCR044-16	LBPV24226	4402	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-9,57	-63,969
LBCR043-16	LBPV24223	4402	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-9,57	-63,969
LBCR042-16	LBPV19648	2988	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,408	-45,073
LBCR041-16	LBPV19646	2988	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,408	-45,073
LBCR040-16	LBPV19645	2988	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,408	-45,073
LBCR039-16	LBPV37007	7901	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,4	-45,069
LBCR038-16	LBPV19647	2988	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,408	-45,073
LBCR037-16	LBPV24225	4402	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-9,57	-63,969
LBCR036-16	LBPV24224	4402	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-9,57	-63,969
LBCR035-16	LBPV60596	14421	<i>Schizolecis guntheri</i>	Rio de Janeiro	-23,123	-44,729
LBCR034-16	LBPV60597	14421	<i>Schizolecis guntheri</i>	Rio de Janeiro	-23,123	-44,729
LBCR033-16	LBPV60598	14421	<i>Schizolecis guntheri</i>	Rio de Janeiro	-23,123	-44,729
LBCR032-16	LBPV60599	14421	<i>Schizolecis guntheri</i>	Rio de Janeiro	-23,123	-44,729
LBCR031-16	LBPV61133	14700	<i>Schizolecis guntheri</i>	Rio de Janeiro	-22,962	-44,559
LBCR030-16	LBPV61134	14700	<i>Schizolecis guntheri</i>	Rio de Janeiro	-22,962	-44,559
LBCR029-16	LBPV61132	14700	<i>Schizolecis guntheri</i>	Rio de Janeiro	-22,962	-44,559
LBCR028-16	LBPV61135	14700	<i>Schizolecis guntheri</i>	Rio de Janeiro	-22,962	-44,559
LBCR027-16	LBPV61113	14427	<i>Schizolecis guntheri</i>	Rio de Janeiro	-22,962	-44,559
LBCR026-16	LBPV61114	14427	<i>Schizolecis guntheri</i>	Rio de Janeiro	-22,962	-44,559
LBCR025-16	LBPV53315	14319	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,723	-45,875
LBCR024-16	LBPV53279	14310	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,774	-45,956
LBCR023-16	LBPV53318	14319	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,723	-45,875
LBCR022-16	LBPV53317	14319	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,723	-45,875
LBCR021-16	LBPV54706	14342	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,778	-45,611
LBCR020-16	LBPV54708	14342	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,778	-45,611
LBCR019-16	LBPV53379	14335	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,765	-45,684
LBCR018-16	LBPV54707	14342	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,778	-45,611

LBCR017-16	LBPV53377	14335	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,765	-45,684
LBCR016-16	LBPV53376	14335	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,765	-45,684
LBCR015-16	LBPV54709	14342	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,778	-45,611
LBCR014-16	LBPV53375	14335	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,765	-45,684
LBCR013-16	LBPV54710	14342	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,778	-45,611
LBCR012-16	LBPV21161	3546	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,405	-45,064
LBCR011-16	LBPV60511	14397	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,393	-45,028
LBCR010-16	LBPV60510	14397	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,393	-45,028
LBCR009-16	LBPV60509	14397	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,393	-45,028
LBCR008-16	LBPV60513	14397	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,393	-45,028
LBCR007-16	LBPV37032	7921	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,446	-45,09
LBCR006-16	LBPV37031	7921	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,446	-45,09
LBCR005-16	LBPV37033	7921	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,446	-45,09
LBCR004-16	LBPV37034	7921	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,446	-45,09
LBCR003-16	LBPV37035	7921	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,446	-45,09
LBCR002-16	LBPV37018	7911	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,395	-45,121
LBCR001-16	LBPV54799	14372	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,609	-45,401
LBCR095-16	LBPV19476	3241	<i>Schizolecis guntheri</i>	Paraná	-25,508	-48,876
LBCR094-16	LBPV49807	10759	<i>Schizolecis guntheri</i>	Rio de Janeiro	-22,227	-42,444
LBCR093-16	LBPV49806	10759	<i>Schizolecis guntheri</i>	Rio de Janeiro	-22,227	-42,444
LBCR092-16	LBPV49804	10759	<i>Schizolecis guntheri</i>	Rio de Janeiro	-22,227	-42,444
LBCR091-16	LBPV54863	14391	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,484	-45,173
LBCR090-16	LBPV60551	14410	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,355	-44,951
LBCR089-16	LBPV60550	14410	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,355	-44,951
LBCR088-16	LBPV19649	2988	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,408	-45,073
LBCR087-16	LBPV21159	3546	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,405	-45,064
LBCR086-16	LBPV21158	3546	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,405	-45,064
LBCR085-16	LBPV21160	3546	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,405	-45,064
LBCR084-16	LBPV37010	7901	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,4	-45,069
LBCR083-16	LBPV61131	14700	<i>Schizolecis guntheri</i>	Rio de Janeiro	-22,962	-44,559
LBCR082-16	LBPV61111	14427	<i>Schizolecis guntheri</i>	Rio de Janeiro	-22,962	-44,559
LBCR081-16	LBPV61127	14433	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,73	-45,733
LBCR080-16	LBPV53378	14335	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,765	-45,684
LBCR079-16	LBPV61128	14433	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,73	-45,733
LBCR078-16	LBPV61126	14433	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,73	-45,733
LBCR077-16	LBPV61129	14433	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,73	-45,733
LBCR076-16	LBPV61130	14433	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,73	-45,733
LBCR075-16	LBPV38452	8244	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,404	-45,064
LBCR074-16	LBPV38454	8244	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,404	-45,064
LBCR073-16	LBPV21157	3546	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,405	-45,064
LBCR072-16	LBPV60512	14397	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,393	-45,028
LBCR071-16	LBPV37009	7901	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,4	-45,069
LBCR070-16	LBPV37017	7911	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-23,395	-45,121
LBCR069-16	LBPV79551	20209	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-24,802	-48,238
LBCR068-16	LBPV79550	20209	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-24,802	-48,238
LBCR067-16	LBPV79549	20209	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-24,802	-48,238
LBCR066-16	LBPV79548	20209	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-24,802	-48,238
LBCR065-16	LBPV79547	20209	<i>Schizolecis guntheri</i>	São Paulo	-24,802	-48,238
LBCR064-16	LBPV34353	7169	<i>Schizolecis guntheri</i>	Paraná	-25,441	-48,874
FPSR148-09	LBPV37774	8044	<i>Pareiorhina rudolphi</i>	São Paulo	-22,5835	-45,1691

FPSR149-09	LBPV37775	8044	<i>Pareiorhina rudolphi</i>	São Paulo	-22,5835	-45,1691
FPSR150-09	LBPV37776	8044	<i>Pareiorhina rudolphi</i>	São Paulo	-22,5835	-45,1691
FPSR151-09	LBPV37777	8044	<i>Pareiorhina rudolphi</i>	São Paulo	-22,5835	-45,1691
FPSR152-09	LBPV37778	8044	<i>Pareiorhina rudolphi</i>	São Paulo	-22,5835	-45,1691
FPSR142-09	29866	6349	<i>Pareiorhina brachyrhyncha</i>	São Paulo	-22.79	-45.46
FPSR143-09	29867	6349	<i>Pareiorhina brachyrhyncha</i>	São Paulo	-22.79	-45.46
FPSR144-09	29868	6349	<i>Pareiorhina brachyrhyncha</i>	São Paulo	-22.79	-45.46
FPSR145-09	29869	6349	<i>Pareiorhina brachyrhyncha</i>	São Paulo	-22.79	-45.46
LBCR509-16	LBPV17102	2551	<i>Neoplecostomus espiritosantensis</i>	Espirito Santo	-20,4084	-40,9154
LBCR510-16	LBPV15241	2551	<i>Neoplecostomus espiritosantensis</i>	Espirito Santo	-20,4084	-40,9154

Apêndice B. Resultado do teste de saturação de substituições. Iss < Iss.cSym e Iss < Iss.cAsym, não indicam saturação de substituições.

Iss	Iss.cSym	Iss.cAsym
0.245	0.798	0.763
0.251	0.754	0.643
0.265	0.724	0.516
0.276	0.706	0.383

Anexo A

**Genetic and morphological analyses implying that *Schizolecis guntheri*
(Siluriformes: Loricariidae) constitutes a cryptic species**

Target jornal: ZooKeys

Genetic and morphological analyses implying that *Schizolecis guntheri* (Siluriformes: Loricariidae) constitutes a cryptic species

Camila S. Souza^{1†}, Guilherme J. Costa-Silva^{1‡}, Fábio F. Roxo^{1§}, Fausto Foresti^{1|} and Claudio Oliveira^{1ψ}

¹*Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Instituto de Biociências de Botucatu, R. Prof. Dr. Antônio Celso Wagner Zanin S/N, Distrito de Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, Brazil*

[†]*camilasvsouza@gmail.com*

[‡]*costasilvagj@gmail.com*

[§]*roxoff@hotmail.com.br*

[|]*fforest@ibb.unes.br*

^ψ*claudio@ibb.unesp.br*

Corresponding author: Camila S. Souza

Running title: Genetic and morphological analyses of *Schizolecis guntheri*

Abstract

Schizolecis is a monotypic genus of Siluriformes widely distributed throughout isolated coastal drainages of southeastern of Brazil. Previous studies have shown that fishes groups found in isolated river basins tend to differentiate over time due to the absence of gene flow resulting in allopatric speciation. In this study, we used the DNA barcoding technique (COI gene) with the analysis of the General Mixed Yule Coalescent (GMYC) model for single locus species delimitation and a Principal Component Analysis (PCA) of external morphology to test the hypothesis that *Schizolecis guntheri* is a cryptic species. For that, we analyzed 94 samples of *S. guntheri* for GMYC and 82 samples for PCA from 22 independent rivers of Brazilian coastal drainages from the Paraná State to the north of Rio de Janeiro State. As a result, the GMYC model delimited five operational taxonomy units (OTUs), a much higher number of species compared to the traditional alpha taxonomy that recognize only *S. guntheri* across the isolated coastal rivers of Brazil. Furthermore, the PCA analysis suggests that *S. guntheri* is highly variable in aspects of external body proportions, including dorsal-fin spine length, pectoral-fin spine length, pelvic-fin spine length, lower caudal-fin spine length, caudal peduncle depth, anal width and mandibular ramus length. However, no exclusive character was found among the isolated populations that could be used to described a new species of *Schizolecis*. Therefore, we can conclude, based in our results of a continuous morphological variation contrasting with the results of GMYC model that delimited five OTUs, that *S. guntheri* represents a cryptic species. Furthermore, we also can conclude that it is important to combine molecular methodologies with current taxonomy in order to support future investments in biodiversity conservation.

Keywords

Coastal drainages, catfish, molecular identification, COI gene, GMYC model

Introduction

The fast development of DNA sequencing and advances in molecular techniques in the last years have been effective in recognize species with high level of genetic variation, even in groups with low morphological diversity – e.g., birds (Saitoh et al. 2015; Tavares et al. 2011), fishes (Ward et al. 2005; Pereira et al. 2011, 2013a; Roxo et al. 2012, 2015; Shimabukuro-Dias et al. 2016), insects (Batovska et al. 2016; Hebert et al. 2004; Versteirt et al. 2015), and mammals (Borisenko et al. 2008; Li et al. 2015).

The DNA barcoding techniques combined with the General Mixed Yule Coalescent (GMYC) model (Pons et al. 2006) enables the estimation of the real number of Operational Taxonomy Units (OTUs) (Carstens et al. 2013) more efficiently than old techniques (Pons et al. 2006; Fontaneto et al. 2007). Among the latter methods are the 2% threshold of genetic divergence (Hebert et al. 2003) and the interspecific genetic variation 10 times larger than the average intraspecific values (Hebert et al. 2004). In recently published works, the GMYC model has provided good resolution for species delimitation in several Neotropical fish groups – e.g., *Rineloricaria* (Costa-Silva et al. 2015), *Curimatopsis* (Melo et al. 2016) and *Neoplecostomus* (Roxo et al. 2015).

The extensive distribution pattern of fish species throughout hydrographic systems currently not connected is unusual among fishes of the Atlantic rainforest rivers (Menezes et al. 2007), as well as among members of Otothyridini (Reis et al. 2003). More recently, several genetic studies focusing on freshwater fishes, as in *Rineloricaria* (Costa-Silva et al. 2015), *Curimatopsis* (Melo et al. 2016), and *Piabina* (Pereira et al. 2011) have shown that species of these groups may present large discontinuities in their distribution pattern with high genetic divergences, but with low morphological variability among isolated populations. These results suggest that members of these groups may represent a cryptic species (“two or more distinct species that are erroneously classified (and hidden) under one species name” – concept defined by Bickford et al. 2007).

Schizolecis guntheri, described by Miranda-Ribeiro (1918) and redescribed by Britski and Garavello (1984), is currently the only species of the monotypic genus *Schizolecis*. This species is a remnant of a very ancient lineage that arose during the Middle Eocene about 42 Mya according to Roxo et al. (2014). The work conducted by Britski and Garavello (1984) detected morphological differences related only to orbits of the eyes, body depth and head depth among populations, but without enough evidence to support the hypothesis that some of the

analyzed populations could represent a new species. Therefore, despite *Schizolecis guntheri* be widely distributed across adjacent and not connected Atlantic coastal rivers from northern Santa Catarina to northern Rio de Janeiro states (Menezes et al. 2007) and present small morphological variations among isolated populations, the doubt to whether or not *S. guntheri* represent a cryptic species still remains.

Therefore, in the present study, we performed a molecular identification of local samples of *Schizolecis guntheri* from 22 independent rivers of the Brazilian coast through DNA barcoding using GMYC analytical method, and analyzed the body shape variation among isolated populations using a PCA trying to recognize if this species represent or not a cryptic species.

Materials and methods

Taxon sampling

We analyzed 94 *Schizolecis guntheri* specimens from 22 independent rivers of the Brazilian coastal drainages, from southern Paraná to northern Rio de Janeiro states (Fig. 1). Information about each sample used in the present study is available in Bold Systems with the accession number for each individual present in Table S1. The vouchers and tissues are deposited in the fish collection of LBP – Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo State, Brazil. Sequences from one additional species of Loricariidae (*Hypostomus ancistroides*) was used as external group to root our tree.

DNA extraction, amplification, and sequencing

We conducted the total genomic DNA extraction using the protocol described by Ivanova et al. (2006). Partial sequences of the cytochrome oxidase C subunit I (COI) gene were amplified using the primers: Fish F1 and Fish R1 (Ward et al. 2005) or COI L6252-Asn and H7271-COXI (Melo et al. 2011). Both primers underwent identical PCR reaction conditions in a total reaction mixture volume of 12.5 µl. Each reaction includes 1.25 µl of 10 X Buffer, 0.25 µl of MgCl₂ (50 Mm), 0.2 µl dNTPs (2 mM), 0.5 µl of each primer (5 mM), 0.1 µl of Pht Taq DNA polymerase (Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda, Belo Horizonte, Brazil), 1 µl of genomic DNA (200 ng) and 8.7 ml ddH₂O. The conditions for each PCR reaction consisted of an initial denaturation (5 min at 94°C), followed by 30 cycles of chain denaturation (40s at 94 °C), primer hybridization (30s at 50°C – 54°C), nucleotide extension (1 min at 68°C) and final extension (8

min at 72°C). The amplified products were checked on 1% agarose gels and then purified using ExoSap-IT (USB Corporation, Cleveland, USA) following the manufacturer's instructions. We accomplished the sequencing reactions using the Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Austin, USA), purified again by ethanol precipitation, and loaded on an automatic sequencer ABI 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems, California, USA).

Genetic analysis

The consensus sequences were obtained using the program Geneious 7.1.4 (<http://www.geneious.com>; Kearse et al. 2012) and the alignment was generated with the algorithm Muscle (Edgar 2004) implemented on Geneious under default parameters. To evaluate the occurrence of substitution saturation in our molecular data, we estimated whether the Iss (index of substitution saturation) is significant lower than Iss.cAsym (assuming asymmetrical topology) using the method described by Xia et al. (2003) with the software DAMBE 5.3.38 (Xia 2013).

The ultrametric tree was estimated in Beast v1.8.2 (Drummond et al. 2012) using an uncorrelated lognormal relaxed clock, the General Time Reversible (GTR) model (Lanave et al. 1984; Tavaré 1986) and birth-death speciation process. The Bayesian inference started with a UPGMA tree. The Markov Chain Monte Carlo (MCMC) methods was performed for 100 million generations, and a tree was sampled for each 20,000 generations. We used the software Tracer v1.6 (Rambaut et al. 2014) to determine the stationary phase of the posterior distribution. All sampled topologies beneath the asymptote (20,000,000 generations) were discarded as part of a burn-in procedure, and the remaining trees were used to construct a 90% majority-rule consensus tree using the Tree Annotator v1.8.2 (Drummond et al. 2012).

We used the GMYC method (Pons et al. 2006) to delimit the operational taxonomic units (OTUs) in *Schizolecis guntheri*. For this analysis, we used an ultrametric tree generated in the software Beast v1.8.2. The GMYC analysis was performed on the program R v3.0.0 (R Development Core Team 2011) using the package Species Limits by Threshold Statistics ("splits") (Fujisawa and Barraclough 2013). After the identification of the OTUs, we calculated the genetic variation within and among the OTUs using the Kimura-2-parameter (K2P) model in the MEGA v.6.06 software (Tamura et al. 2013).

Morphological analysis

Principal Component Analysis – PCA (Jolliffe 2002) was used to check external morphology variation among 82 samples of *Schizolecis guntheri* among regions of genetic groups (Table S2) using the program Past version v1.28 (Hammer et al. 2004). Landmarks distances followed those originally proposed by Carvalho and Reis (2009) and they were measured for adult specimens (>26.2 mm SL). Previously to the PCA analysis we followed the method of Dryden and Mardia (1998) to minimize body size influence on morphometric data. We normalized the first two coordinate dimensions, divided all coordinate values by the centroid size for each specimen and conducted a Procrustes superimposition of the left half to a mirrored version of the right half. After that we also log transformed the data for base 10. The PCA Loadings are present in Table 1.

Results

We obtained partial sequences of COI for 94 specimens of *Schizolecis guntheri*. After alignment, we generated a matrix with 533 characters, 230 of which were variable. The nucleotide frequencies were A (25.4%), G (16.7%), T (29.3%) and C (28.7%). No insertions, deletions, stop codons or contamination in the sequences were detected. The data were not saturated considering that the Iss.cAsym values are higher than the Iss for the different numbers of NumOTU analyzed (4 OTUs Iss = 0.187, Iss.cAsym = 0.763, P = 0; 8 OTUs Iss = 0.177, Iss.cAsym = 0.643, P = 0; 16 OTUs Iss = 0.179, Iss.cAsym = 0.516, P = 0; 32 OTUs Iss = 0.180, Iss.cAsym = 0.383, P = 0) in the total matrix (all molecular characters including gaps).

Principal Component Analysis – PCA

The first (PC1) and second (PC2) principal component axis of our analysis explained 28.1% and 12.4%, respectively, of variation in body shape for all *Schizolecis guntheri* analyzed specimens. The variation is partly distributed within populations, and partly between populations, and apparently, it represents a continuous distribution of external morphology, as we can observe in the PCA scatter plot (Fig. 1). Our results also showed that the measures with greater variations were respectively: dorsal-fin spine length, pectoral-fin spine length, pelvic-fin spine length, lower caudal-fin spine length, caudal peduncle depth, anal width and mandibular ramus length as we can observe in the PCA loading values (Table 1).

Phylogenetic analysis and genotypic species delimitation – GMYC model

The phylogenetic reconstruction resulted in a tree with high values of posterior probability across the monophyletic OTUs (>95%), highlighting the existence of five lineages within *Schizolecis guntheri* (Fig. 2). The analysis of species delimitation using GMYC model under a phylogenetic tree estimated using a Birth-Death model prior of branching rates showed that the threshold time found was -0.0055687, indicating the time before which all nodes reflect diversification events and after which all nodes in the tree reflect coalescent events. The likelihood of the null model was 958.2078 and the maximum likelihood of the GMYC model was 962.0088.

The OTUs lineages were divided following the genetic delimitation of five clusters (OTUs) and named according to their distribution: OTU I – Paraíba do Sul basin and rivers of Guanabara bay; OTU II – Rivers of Paranaguá bay; OTU III – Rivers from Bertioga to Ubatuba; OTU IV – Ribeira de Iguape basin; OTU V – Rivers of Angra dos Reis and Parati (Figs. 1 and 2). The values between the OTUs ranged from 1.1% (OTU III and OTU IV) to 8.7% (OTU II and OTU V). The OTU I and OTU II are in north and OTU IV in south distribution boundaries of *S. guntheri* (Fig. 1) and presented the highest values of genetic divergence among all OTUs (Table 2).

Discussion

Evidences for cryptic species

The results of GMYC analysis of the samples of 22 independent rivers of the Brazilian coastal drainages (Figs. 1 and 2) highlighted the existence of five monophyletic, independent and highly statistical supported (> 95%) lineages within *Schizolecis guntheri*, suggesting a very low level (or almost absence) of gene flow among population of this species (Fig. 2). Molecular studies in several Neotropical fish groups have shown that widely distributed nominal species isolated in independent hydrographic systems can sometimes represent a cryptic species (Pereira et al. 2011; Costa-Silva et al. 2015; Melo et al. 2016) and the combined usage of DNA barcoding and morphological data has provided support to recognize and describe new species, many of them previously considered as cryptic (Melo et al. 2011; Silva et al. 2013; Amaral et al. 2013).

The results of *Schizolecis guntheri* morphological analysis exhibits high external morphology variation across its range including color pattern (Fig. 1), but especially in morphometric characters as, dorsal-fin spine length, pectoral-fin spine length, pelvic-fin spine length, lower caudal-fin spine length, caudal peduncle depth, anal width and mandibular ramus length as we can observe in the PCA loading values (Table 1). However, this diversity is partly distributed within populations and among populations and represents a continuous variation in external morphology, as we can observe in the PCA scatter plot (Fig. 1). Therefore, we do not found any exclusive character to support a possible new species for any of the analyzed populations distributed across the isolated coastal drainages. A similar result was previously found by Britski and Garavello (1984). These authors found differences of morphometric characters of eyes orbits, body depth and head depth, but no exclusive character that could support a new species of the genus *Schizolecis* among the analyzed populations. Therefore, Britski and Garavello (1984) considered the morphological variation that they found as intraspecific variation.

Considering the lack of phenotypic discontinuities and the presence of high levels of genetic divergence among populations of *Schizolecis guntheri* indicating that these populations may have reached the reproductive isolation, we hypothesize that *S. guntheri* is a cryptic species (Pereira et al. 2011; Bellafronte et al. 2013; Marques et al. 2013). Furthermore, the similarity in external morphology found among populations of this species can be caused by convergences related to selective pressures driven by similar ecological conditions (authors personal obs. during field collection), as observed in *Astyanax* species from Central America (Ornelas-García et al. 2008) and in *R. heteroptera* (Costa-Silva et al. 2015). The type locality of *S. guntheri* is Piraíque beach (Britski and Garavello 1984), Ilha de São Sebastião and it is represented in our results by the green area in the map (rivers from Bertioiga to Ubatuba, Fig. 1) and the OTU III (Fig. 2). Therefore, the OTUs identified in the paleodrainages of southeastern of Brazil, mainly in Paraíba do Sul basin and rivers of Guanabara bay (OTU I), Ribeira de Iguape basin (OTU IV), rivers of Paranaguá bay (OTU II) and rivers of Angra dos Reis and Parati (OTU V) could represent possible new species.

Conflict among species concepts

Another important issue associated with species delimitation is related to the use of different species concepts. According to Queiroz (2007) the controversy around the definition of the species and methods for inferring its boundaries has led to more than fifty years of discussion.

The main problem is that different areas in Biology uses different and incompatible concepts – e.g., Genotypic Cluster, Phenetic Cluster or Phylogenetic (Zink 1996; Mayden, 1997; de Queiroz, 1998; Harrison, 1998) that can lead to different conclusions concerning to the number of species (Queiroz 2007). Our results also showed an incongruence concerning to the number of species of *S. guntheri* delimited based on the GMYC model (Genotypic Cluster) that recognized five monophyletic and high statistically supported groups with high values of genetic divergence among them (Table 2) and the morphological analysis (Phenetic Cluster) that recognized only *S. guntheri* with a continuous variation in the external morphology shown by the PCA.

De Queiroz (2007) also argue that the confusion among species concept is associated to the speciation process. As the time goes, two independent lineages develop and increasingly acquire different properties relative to each other – i.e., they become phenetically distinct, reaches the reciprocal monophyly, became ecologically distinct or reproductively incompatible. Before the recovery of the first property, everybody will recognize that there is a single species, and after the acquisition of several properties, everyone will agree that there are two species. Otherwise, in between, there will be confusion. De Queiroz (2007) call the area where two concepts of species come into conflict and the boundaries among species are unclear as a grey zone. On either side of the gray zone, there will be consistent agreement about the species number, but in the gray zone has conflict.

Therefore, the confusion among recognize different number of species among GMYC model and the morphological analysis in *S. guntheri* could be associated with the fact that this species is in the gray zone of De Queiroz (2007). Furthermore, we could hypothesize that geomorphological process, as headwater capture or climate oscillation, has been affected the populations of *S. guntheri* among isolated coastal river over time (Roxo et al. 2014) and these processes may have facilitated the intermix of the isolated populations and helped to maintain *S. guntheri* in the gray zone. Furthermore, from the last possible intermixed among these populations to the present, lineages of each paleodrainage reached the reciprocal monophyly as we can see in the results of GMYC, but it does not reflect in morphological differentiation.

Acknowledgments

This research was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico proc. 150415/2015–0 to GJCS), FAPESP (Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, proc. 2014/05051–5 and 2015/00691–9 to FFR), and MCT/CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) (Edital Universal, proc. N. 441347/2014–2 coord. FFR). The authors are grateful to Priscila Camelier and Renato Devidé for their help during the collection expeditions. The authors also wish to thank Gabriel S. C. Silva for his help with the identification of the specimens.

References

- Amaral CRL, Brito PM, Silva DA, Carvalho EF (2013) A new cryptic species of South American freshwater pufferfish of the genus *Colomesus* (Tetraodontidae), based on both morphology and DNA data. *PLoS One* 8(9): e74397.
- Albert JS, Reis RE (2011) *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. University of California Press, Berkeley, 408 pp.
- Batovska J, Blacket MJ, Brown K, Lynch SE (2016) Molecular identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in southeastern Australia. *Ecology and Evolution* 6: 3001–3011.
- Bellafronte E, Mariguela T, Garcia-Pereira L, Oliveira C, Moreira-Filho O (2013) DNA barcode of Parodontidae species from the La Plata river basin-applying new data to clarify taxonomic problems. *Neotropical Ichthyology* 11:497–506.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 148–155.
- Borisenko AV, Lim BK, Ivanova NV, Hanner RH, Hebert PDN (2008) DNA barcoding in surveys of small mammal communities: A field study in Suriname. *Molecular Ecology Resources* 8: 471–479.
- Britski H, Garavello J (1984) Two New Southeastern Brazilian Genera of Hypoptopomatinae and a Redescription of *Pseudotocinclus* Nichols, 1919 (Ostariophysi, Loricariidae). *Papéis avulsos de Zoologia* 35: 225–241.

- Carstens BC, Pelletier TA, Reid NM, Satler JD (2013) How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology* 22: 4369–4383.
- Carvalho TP, Reis RE (2009) Four new species of *Hisonotus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Uruguay, southeastern South America, with a review of the genus in the rio Uruguay basin. *Zootaxa* 2113: 1–40.
- Costa-Silva GJ, Rodriguez MS, Roxo FF, Foresti F, Oliveira C (2015) Using different methods to access the difficult task of delimiting species in a complex neotropical hyperdiverse group. *PLoS ONE* 10:1–12.
- De Queiroz K (1998) The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation. In: Howard DJ, Berlocher SH, editors. *Species and Speciation*. Oxford University Press, New York, pp. 57–78.
- De Queiroz K (2007) Species concepts and species delimitation. *Systematic biology* 56:879–86.
- Dryden IL, Mardia KV (1998) *Statistical Shape Analysis*. John Wiley & Sons, New York, 347pp.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969–1973.
- Edgar, RC (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797.
- Fontaneto D, Herniou EA, Boschetti C, Caprioli M, Melone G, Ricci C, Barraclough TG (2007) Independently evolving species in asexual bdelloid rotifers. *PLoS Biology* 5: 914–921.
- Fujisawa T, Barraclough TG (2013) Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulated datasets. *Systematic Biology*, syt033.
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2004) *Past - Palaeontological Statistics*, ver. 1.32. Oslo: University of Oslo.
- Harrison RG (1998) Linking evolutionary pattern and process. In Howard DJ, Berlocher SH, editors. *Species and speciation*. Oxford University Press, New York, pp. 19–31.

- Hebert PDN, Cywinska A, Ball S L, DeWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 313–321.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 14812–14817.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647–1649.
- Ivanova NV, Dewaard JR, Hebert PDN (2006) An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality. *DNA Molecular Ecology Notes* 6: 998–1002.
- Jolliffe IT (2002) *Principal Component Analysis*. Springer Series in Statistics, 2nd ed, Springer, New York, 487 pp.
- Lanave C, Preparata G, Saccone C, Serio G (1984) A new method for calculating evolutionary substitution rates. *Journal of Molecular Evolution* 20: 86–93.
- Li J, Zheng X, Cai Y, Zhang X, Yang M, Yue B, Li, J (2015) DNA barcoding of murinae (Rodentia: Muridae) and arvicolinae (Rodentia: Cricetidae) distributed in China. *Molecular Ecology Resources* 15: 153–167.
- Mayden, R. L. (1997) A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In Claridge MF, Dawah HA, Wilson MR, editors. *Species: The Units of Biodiversity*. London: Chapman and Hall, pp. 381–424.
- Marques D, Santos F, Silva S (2013) Cytogenetic and DNA barcoding reveals high divergence within the trahira, *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) from the lower Amazon River. *Neotropical Ichthyology* 11:459–66.
- Melo BF, Benine RC, Mariguela TC, Oliveira C (2011) A new species of *Tetragonopterus* Cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae: Tetragonopterinae) from the rio Jari, Amapá, northern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 9: 49–56.

- Melo BF, Ochoa LE, Vari, RP, Oliveira C (2016) Cryptic species in the Neotropical fish genus (Teleostei, Characiformes). *Zoologica Scripta* 1–9.
- Menezes N, Weitzman S, Oyakawa O, Lima F, Castro R, Weitzman M (2007) Peixes de Água Doce da Mata Atlântica: lista preliminar das espécies e comentários sobre conservação de peixes de água doce neotropicais. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 408pp.
- Pereira LHG, Hanner R, Foresti F, Oliveira C (2013a) Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC genetics* 14, 20.
- Pereira LHG, Pazian MF, Hanner R, Foresti F, Oliveira C (2011) DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paraná Basin of Brazil. *Mitochondrial DNA* 22(1): 87–96.
- Polzin T, Daneshmand SV (2003) NETWORK 4.1.1.2 Fluxus Technology Ltd Steiner (MP) algorithm.
- Pons J, Barraclough T, Gomez-Zurita, J, Cardoso A, Duran D, Hazell S, Kamoun S, Sumlin W, Vogler A (2006) Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Systematic Biology* 55: 595–609.
- Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ (2014) Tracer v1.6 Available via <http://beastbioedacuk/Tracer>
- Reis RE, Kullander OS, Ferraris CJJ (2003) Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre - Brazil, 742 pp.
- Roxo FF, Ochoa LE, Costa-Silva GJ, Oliveira C (2015) Species delimitation in *Neoplecostomus* (Siluriformes: Loricariidae) using morphologic and genetic approaches. *DNA Barcodes* 3: 110–117.
- Roxo FF, Albert JS, Silva GSC, Zawadzki CH, Foresti F, Oliveira C (2014) Molecular phylogeny and biogeographic history of the armored neotropical catfish subfamilies hypoptopomatinae, neoplecostominae and Otothyrinae (siluriformes: Loricariidae). *PLoS ONE* 9: 1–17

- Roxo FF, Zawadzki CH, Alexandrou MA, Silva GJC, Chiachio MC, Foresti F, Oliveira C (2012) Evolutionary and biogeographic history of the subfamily Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Ecology and Evolution* 2: 2438–2449.
- Saitoh T, Sugita N, Someya S, Iwami Y, Kobayashi S, Kamigaichi H, Higuchi A, Asai S, Yamamoto Y, Nishiumi I (2015) DNA barcoding reveals 24 distinct lineages as cryptic bird species candidates in and around the Japanese Archipelago. *Molecular Ecology Resources* 15: 177–186.
- Silva GSC, Melo BF, Oliveira C, Benine RC (2013) Morphological and molecular evidence for two new species of *Tetragonopterus* (Characiformes: Characidae) from central Brazil. *Journal of Fish Biology* 82: 1613–1631.
- Shimabukuro-Dias CK, Costa-Silva GJ, Ashikaga FY, Foresti F, Oliveira C (2016) Molecular identification of the fish fauna from the pantanal flood plain area in Brazil. *Mitochondrial DNA Part A* 1394: 1–5.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- Tavares ES, Gonçalves P, Miyaki CY, Baker AJ (2011) DNA barcode detects high genetic structure within neotropical bird species. *PLoS ONE* 6(12): e28543.
- Tavare S (1986) Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences* 17: 57–86.
- Thomaz AT, Malabarba LR, Bonatto SL, Knowles LL (2015) Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: Study of a Neotropical fish of the Brazilian coastal Atlantic Forest. *Journal of Biogeography* 42: 2389–2401.
- Versteirt V, Nagy ZT, Roelants P, Denis L, Breman FC, Damiens D, Dekoninck W, Backeljau T, Coosemans M, Van Bortel W (2015) Identification of Belgian mosquito species (Diptera: Culicidae) by DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 15: 449–457.

- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B. Biological sciences 360: 1847–1857.
- Xia X, Xie Z, Salemi M, Chen L, Wang Y (2003) An index of substitution saturation and its application. Molecular Phylogenetics and Evolution 26: 1–7.
- Xia, X (2013) DAMBE5: a comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. Molecular Biology and Evolution 30: 1720–1728.
- Zink RM (1996) Bird species diversity. Nature 381:566

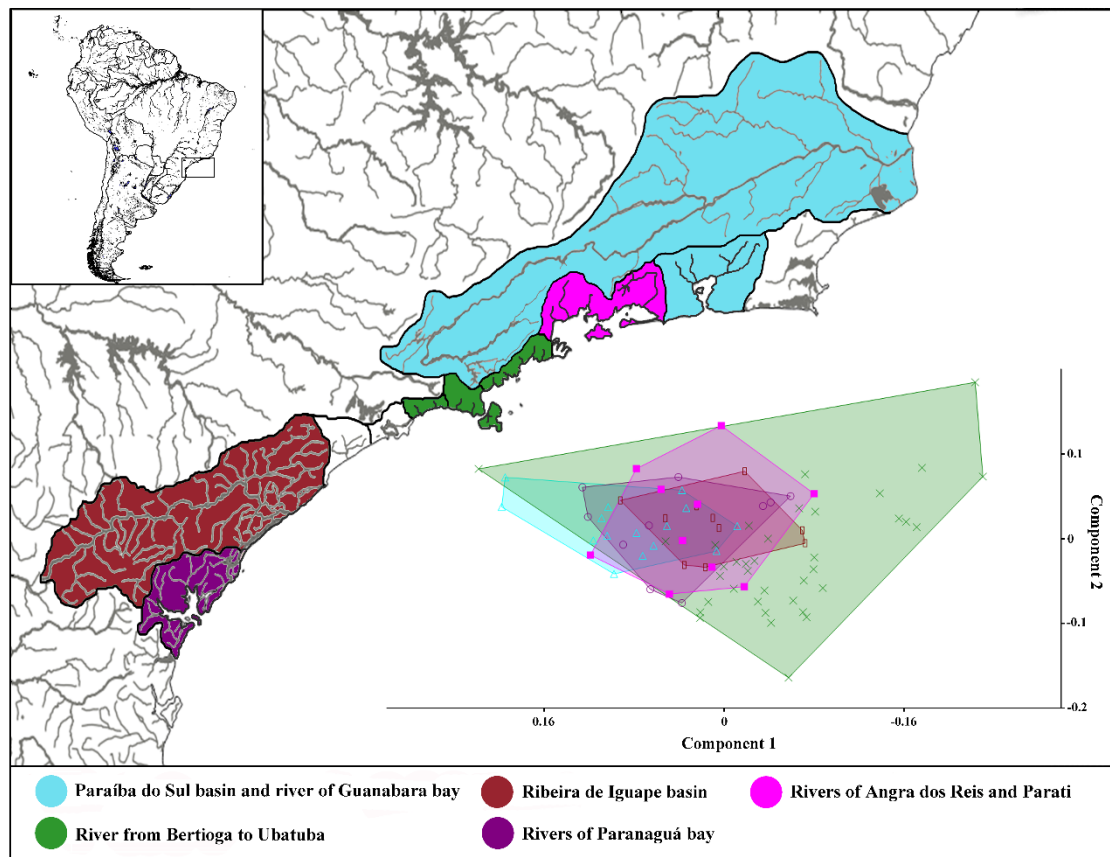


Figure 1. Image showing the map of coastal rivers of southeastern of Brazil following the paleodrainages inference of Thomaz et al. (2015), and adding the Rivers of Guanabara bay and Paraíba do Sul basin. The image also shows the scatter plot of Principal Component Analysis (PCA) of populations of *Schizolecis* found in each paleodrainage. Light-blue empty triangle – Paraíba do Sul and rivers of Guanabara bay; Green cross – Rivers from Bertioga to Ubatuba; Dark-red empty rectangular – Ribeira de Iguape basin; Purple empty circle – Rivers of Paranaguá bay; Pink filled square – Rivers of Angra dos Reis and Parati.

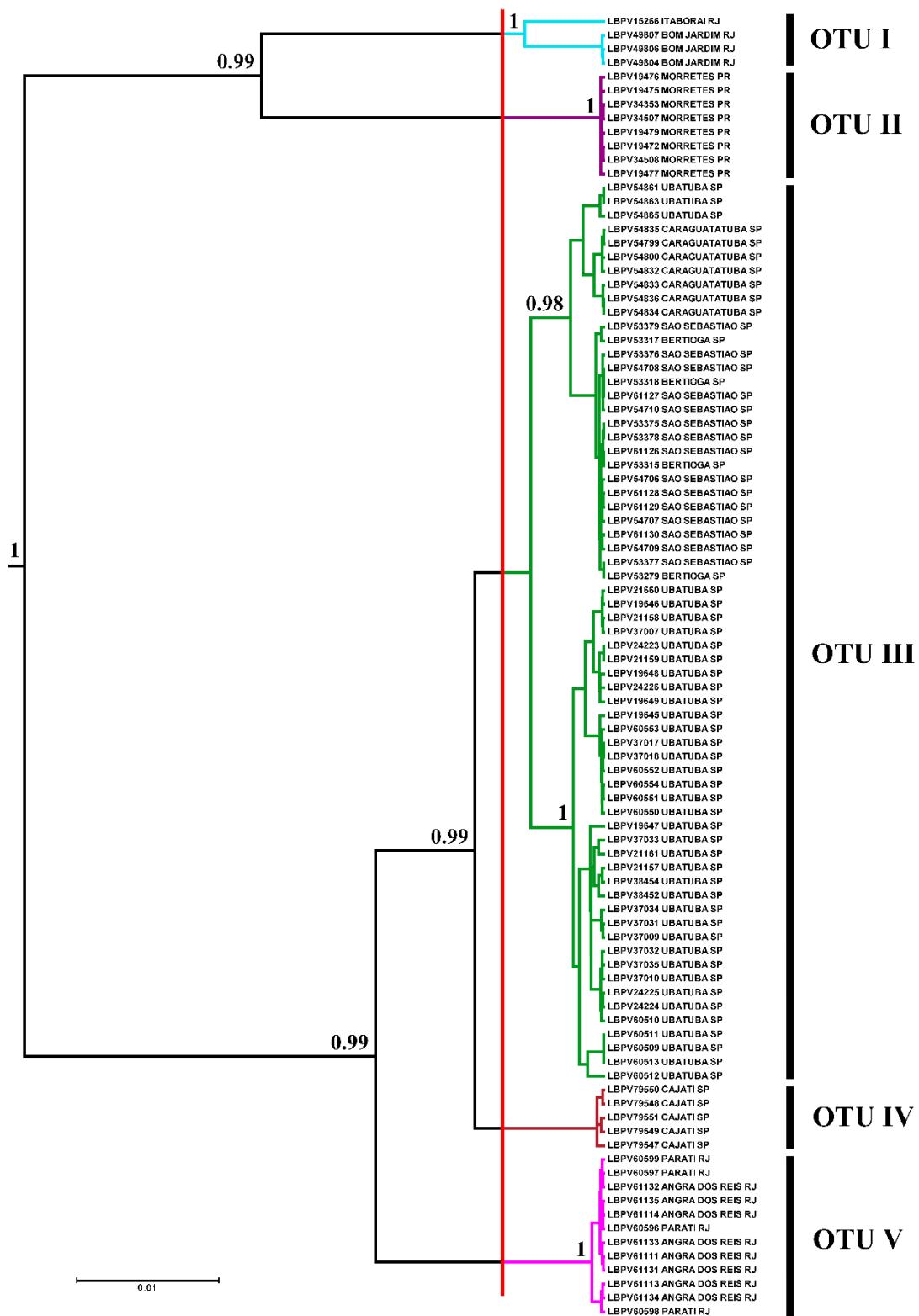


Figure 2. Bayesian tree showing the distribution of specimens by OTUs selected through GMYC analyses. Numbers after branches are posterior probabilities. Values below 0.95 are not shown. The vertical red line represents the threshold time (-0.0055687). The color of the branches to the right of the red line corresponds to the color of the paleodrainages in Fig. 1.

LBPV is the code for samples of the fish collection of the *Laboratório de Biologia e Genética de Peixes* on the Boldsystems site.

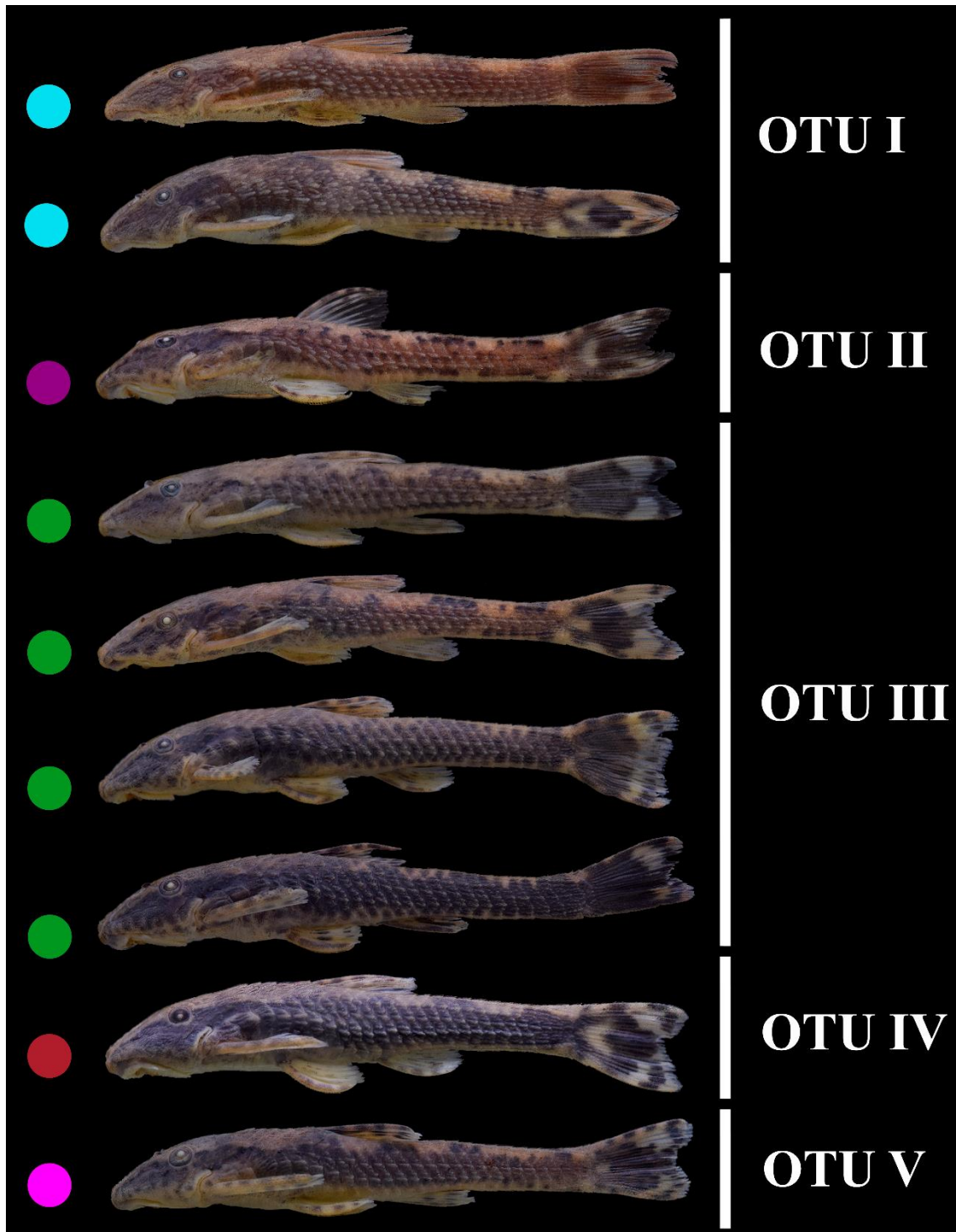


Figure 3. Pictures showing the variation in external morphology among *Schizolecisc guntheri* populations. Colored circles represent the paleodrainages proposed by Thomaz et al. (2015) shown in Fig. 1.

Table 1. Variable loadings in the first and second axes of size-free Principal Component Analysis (Axis 1 and Axis 2) of samples of *Schizolecis guntheri*. Bold values represent the character with the highest variation.

	Axis 1	Axis 2
Standard length	0.03469	0.01922
Predorsal length	0.05589	0.05622
Preanal length	-0.0378	-0.08091
Head length	0.1271	0.0697
Cleithral width	0.1482	0.1679
Dorsal-fin spine length	0.3355	-0.2164
Base of dorsal-fin length	0.1576	0.002704
Thorax length	0.1218	0.01957
Pectoral-fin spine length	0.3305	-0.1625
Abdomen length	0.1143	0.1715
Pelvic-fin spine length	0.3478	0.1035
Anal-fin spine length	0.2795	-0.2604
Lower caudal-fin spine length	0.5282	-0.3743
Caudal peduncle depth	0.1384	0.3224
Caudal peduncle length	-0.04707	0.05234
Anal width	0.3044	0.287
Snout-opercle length	0.07479	0.1523
Head width	0.1181	0.14
Head depth	0.1298	0.2021
Snout length	0.07969	0.153
Interorbital width	0.08071	0.1185
Orbital diameter	0.01212	0.2747
Suborbital depth	0.1547	0.1987
Mandibular ramus length	0.127	0.4584

Table 2. Genetic divergences based on the Kimura-2-parameter (K2P) nucleotide model for COI sequences of *S. guntheri*. In the main diagonal are the values of intragroup genetic divergences in highlighted in bold. Below the main diagonal is the values of intergroup (OTUs) genetic divergences. The values are shown in percentage.

	OTU I	OTU II	OTU III	OTU IV	OTU V
OTU I	1.1 ±0.3				
OTU II	6.4 ±1.2	0			
OTU III	8.1 ±1.3	8.6 ±1.4	0.8 ±0.3		
OTU IV	8.0 ±1.4	8.4 ±1.5	1.1 ±0.4	0	
OTU V	8.0 ±1.4	8.7 ±1.5	2.3 ±0.7	1.9 ±0.6	0

Supplementary table 1. Sequences of *Schizolecis guntheri* species available in Boldsystems.

Fish No	Process ID Bold Systems	Collection No	Species	Geographic coordinates	
LBPV15266	LBCR057-16	LBP2513	<i>Schizolecis guntheri</i>	-22.525	-42.688
LBPV49804	LBCR092-16	LBP10759	<i>Schizolecis guntheri</i>	-22.227	-42.444
LBPV49806	LBCR093-16	LBP10759	<i>Schizolecis guntheri</i>	-22.227	-42.444
LBPV49807	LBCR094-16	LBP10759	<i>Schizolecis guntheri</i>	-22.227	-42.444
LBPV61111	LBCR082-16	LBP14427	<i>Schizolecis guntheri</i>	-22.962	-44.559
LBPV61113	LBCR027-16	LBP14427	<i>Schizolecis guntheri</i>	-22.962	-44.559
LBPV61114	LBCR026-16	LBP14427	<i>Schizolecis guntheri</i>	-22.962	-44.559
LBPV61131	LBCR083-16	LBP14700	<i>Schizolecis guntheri</i>	-22.962	-44.559
LBPV61132	LBCR029-16	LBP14700	<i>Schizolecis guntheri</i>	-22.962	-44.559
LBPV61133	LBCR031-16	LBP14700	<i>Schizolecis guntheri</i>	-22.962	-44.559
LBPV61134	LBCR030-16	LBP14700	<i>Schizolecis guntheri</i>	-22.962	-44.559
LBPV61135	LBCR028-16	LBP14700	<i>Schizolecis guntheri</i>	-22.962	-44.559
LBPV60596	LBCR035-16	LBP14421	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.123	-44.729
LBPV60597	LBCR034-16	LBP14421	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.123	-44.729
LBPV60598	LBCR033-16	LBP14421	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.123	-44.729
LBPV60599	LBCR032-16	LBP14421	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.123	-44.729
LBPV19645	LBCR040-16	LBP2988	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.408	-45.073
LBPV19646	LBCR041-16	LBP2988	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.408	-45.073
LBPV19647	LBCR038-16	LBP2988	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.408	-45.073
LBPV19648	LBCR042-16	LBP2988	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.408	-45.073
LBPV19649	LBCR088-16	LBP2988	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.408	-45.073
LBPV21157	LBCR073-16	LBP3546	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.405	-45.064
LBPV21158	LBCR086-16	LBP3546	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.405	-45.064
LBPV21159	LBCR087-16	LBP3546	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.405	-45.064
LBPV21161	LBCR012-16	LBP3546	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.405	-45.064
LBPV21660	LBCR085-16	LBP3546	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.405	-45.064
LBPV24223	LBCR043-16	LBP4402	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.4014	-45.065
LBPV24224	LBCR036-16	LBP4402	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.4014	-45.065
LBPV24225	LBCR037-16	LBP4402	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.4014	-45.065
LBPV24226	LBCR044-16	LBP4402	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.4014	-45.065
LBPV37007	LBCR039-16	LBP7901	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.4	-45.069
LBPV37009	LBCR071-16	LBP7901	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.4	-45.069
LBPV37010	LBCR084-16	LBP7901	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.4	-45.069
LBPV37017	LBCR070-16	LBP7911	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.395	-45.121
LBPV37018	LBCR002-16	LBP7911	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.395	-45.121
LBPV37031	LBCR006-16	LBP7921	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.446	-45.09
LBPV37032	LBCR007-16	LBP7921	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.446	-45.09
LBPV37033	LBCR005-16	LBP7921	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.446	-45.09
LBPV37034	LBCR004-16	LBP7921	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.446	-45.09

LBPV37035	LBCR003-16	LBP7921	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.446	-45.09
LBPV38452	LBCR075-16	LBP8244	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.404	-45.064
LBPV38454	LBCR074-16	LBP8244	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.404	-45.064
LBPV60509	LBCR009-16	LBP14397	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.393	-45.028
LBPV60510	LBCR010-16	LBP14397	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.393	-45.028
LBPV60511	LBCR011-16	LBP14397	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.393	-45.028
LBPV60512	LBCR072-16	LBP14397	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.393	-45.028
LBPV60513	LBCR008-16	LBP14397	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.393	-45.028
LBPV60550	LBCR089-16	LBP14410	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.355	-44.951
LBPV60551	LBCR090-16	LBP14410	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.355	-44.951
LBPV60552	LBCR046-16	LBP14410	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.355	-44.951
LBPV60553	LBCR047-16	LBP14410	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.355	-44.951
LBPV60554	LBCR045-16	LBP14410	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.355	-44.951
LBPV54861	LBCR056-16	LBP14391	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.484	-45.173
LBPV54863	LBCR091-16	LBP14391	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.484	-45.173
LBPV54865	LBCR055-16	LBP14391	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.484	-45.173
LBPV54832	LBCR050-16	LBP14384	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.564	-45.309
LBPV54833	LBCR051-16	LBP14384	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.564	-45.309
LBPV54834	LBCR052-16	LBP14384	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.564	-45.309
LBPV54835	LBCR053-16	LBP14384	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.564	-45.309
LBPV54836	LBCR054-16	LBP14384	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.564	-45.309
LBPV54799	LBCR013-16	LBP14372	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.609	-45.601
LBPV54800	LBCR049-16	LBP14372	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.609	-45.401
LBPV54706	LBCR021-16	LBP14342	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.778	-45.611
LBPV54707	LBCR018-16	LBP14342	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.778	-45.611
LBPV54708	LBCR020-16	LBP14342	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.778	-45.611
LBPV54709	LBCR015-16	LBP14342	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.778	-45.611
LBPV54710	LBCR013-16	LBP14342	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.778	-45.611
LBPV53375	LBCR014-16	LBP14335	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.765	-45.684
LBPV53376	LBCR016-16	LBP14335	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.765	-45.684
LBPV53377	LBCR017-16	LBP14335	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.765	-45.684
LBPV53378	LBCR080-16	LBP14335	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.765	-45.684
LBPV53379	LBCR019-16	LBP14335	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.765	-45.684
LBPV61126	LBCR078-16	LBP14433	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.73	-45.733
LBPV61127	LBCR081-16	LBP14433	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.73	-45.733
LBPV61128	LBCR079-16	LBP14433	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.73	-45.733
LBPV61129	LBCR077-16	LBP14433	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.73	-45.733
LBPV61130	LBCR076-16	LBP14433	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.73	-45.733
LBPV53279	LBCR024-16	LBP14310	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.774	-45.956
LBPV53315	LBCR025-16	LBP14319	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.723	-45.875
LBPV53317	LBCR022-16	LBP14319	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.723	-45.875
LBPV53318	LBCR023-16	LBP14319	<i>Schizolecis guntheri</i>	-23.723	-45.875
LBPV79547	LBCR065-16	LBP20209	<i>Schizolecis guntheri</i>	-24.802	-48.238

LBPV79548	LBCR066-16	LBP20209	<i>Schizolecis guntheri</i>	-24.802	-48.238
LBPV79549	LBCR067-16	LBP20209	<i>Schizolecis guntheri</i>	-24.802	-48.238
LBPV79550	LBCR068-16	LBP20209	<i>Schizolecis guntheri</i>	-24.802	-48.238
LBPV79551	LBCR069-16	LBP20209	<i>Schizolecis guntheri</i>	-24.802	-48.238
LBPV19472	LBCR058-16	LBP3241	<i>Schizolecis guntheri</i>	-25.508	-48.876
LBPV19475	LBCR061-16	LBP3241	<i>Schizolecis guntheri</i>	-25.508	-48.876
LBPV19476	LBCR095-16	LBP3241	<i>Schizolecis guntheri</i>	-25.508	-48.876
LBPV19477	LBCR059-16	LBP3241	<i>Schizolecis guntheri</i>	-25.508	-48.876
LBPV19479	LBCR060-16	LBP3241	<i>Schizolecis guntheri</i>	-25.508	-48.876
LBPV34353	LBCR064-16	LBP7169	<i>Schizolecis guntheri</i>	-25.441	-48.874
LBPV34507	LBCR062-16	LBP7169	<i>Schizolecis guntheri</i>	-25.441	-48.874
LBPV34508	LBCR063-16	LBP7169	<i>Schizolecis guntheri</i>	-25.441	-48.874
LBPV10887	KM104509	LBP2544	<i>Hypostomus ancistroides</i>	-	-

Supplementary table 2. Lots used in Principal Component Analysis.

Locality	Drainages	Voucher	Number of samples
Silva Jardim-RJ	Rivers of Guanabara bay	18473	5
Bom Jardim-RJ	Paraíba do Sul basin	10759	10
Angra dos Reis-RJ	Rivers of Angra dos Reis	14427 14700	5 5
Ubatuba-SP	Rivers of Ubatuba	3546 7921	5 5
Caraguatatuba-SP	Rivers of Caraguatatuba	14372 14384	2 5
São Sebastião-SP	Rivers of São Sebastião	14342 14433	5 5
Bertioga-SP	River of Bertioga	14319	10
Cajati-SP	Ribeira de Iguape basin	20209 898	5 5
Morretes-PR	Rivers of Paranaguá bay	3241 3239 7169 2514	6 1 1 2