



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
Departamento de Morfologia
Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

Eric Venturini Ywamoto

Revisão taxonômica e biogeografia de *Atlantirivulus*
santensis Köhler, 1906 (Rivulidae, Cyprinodontiformes)

Mestrando: Eric Venturini Ywamoto
Orientador: Prof. Dr. Claudio de Oliveira

Botucatu
2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA**

Eric Venturini Ywamoto

Revisão taxonômica e biogeografia de *Atlantirivulus
santensis* Köhler, 1906 (Rivulidae, Cyprinodontiformes)

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

Orientador: Prof. Dr. Claudio de Oliveira

**Botucatu-SP
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Ywamoto, Eric Venturini.

Revisão taxonômica e biogeografia de *Atlantirivulus santensis Köhler*, 1906 (Rivulidae, Cyprinodontiformes) / Eric Venturini Ywamoto. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Claudio de Oliveira

Capes: 20204000

1. Peixe - Identificação. 2. DNA mitocondrial. 3. Citocromos c. 4. Biogeografia.

Palavras-chave: Biogeografia; COI; DNA barcoding; Rivulidae.

Resumo

Atlantirivulus santensis é amplamente distribuída ao longo das drenagens costeiras de São Paulo, Brasil. Algumas evidências de variação morfológica dentro dessa espécie sugerem que possam existir espécies novas que ainda não tenham sido descritas. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo é verificar se existem diferentes linhagens de *A. santensis* utilizando a ferramenta do DNA Barcoding, realizar a revisão taxonômica de *A. santensis* através de caracteres morfológicos e estabelecer os limites de distribuição desta espécie com o intuito de contribuir para futuros estudos de sistemática dos rivulídeos. Foram analisadas 68 sequências parciais da região Citocromo c Oxidase I do DNA mitocondrial (com aproximadamente 550 pares de bases) de espécimes de *A. santensis* (Ubatuba, Maresias, Bertioga, São Paulo, Santos, Mongaguá, Pedro de Toledo, Itanhaém e Peruíbe), além de *Atlantirivulus simplicis* encontrada no limite norte (Paraty-RJ) da distribuição de *A. santensis* e *Atlantirivulus ribeirensis*, limite sul, para fins comparativos, como grupos externos. Os dados obtidos foram analisados com os softwares Geneious v.4.8.5, BioEdit v5.0.9 e Mega 7.0. Os resultados foram graficamente representados em dendrogramas de Neighbour-Joining (NJ), Automatic Barcode Gap Definition (ABGD) e PTP. As análises geraram três clusters (mais os dois grupos externos) dentro de *A. santensis*. O primeiro grupo é composto por espécimes de Peruíbe, Pedro de Toledo e Itanhaém, o segundo por Santos, Mongaguá e São Paulo e o último grupo por Maresias, Bertioga e Ubatuba. Esses dados corroboram a hipótese da existência de três linhagens distribuídas na costa do Estado de São Paulo, que atualmente são agrupadas como *Atlantirivulus santensis*.

Palavras chaves: DNA barcoding, COI, biogeografia, Rivulidae.

Abstract

Atlantirivulus santensis is widely distributed along the coastal drains of São Paulo, Brazil. Some evidence of morphological variation within this species suggests that there may be new species that have not yet been described. In this sense, the objective of the present study is to verify if there are different strains of *A. santensis* using the tool of the DNA Barcoding, to carry out the taxonomic revision of *A. santensis* through morphological characters and to establish the distribution limits of this species with the intention to contribute for future studies of rivulide systematics. We analyzed 68 partial sequences of the cytochrome c Oxidase I region of the mitochondrial DNA (approximately 550 base pairs) of *A. santensis* specimens (Ubatuba, Maresias, Bertioga, São Paulo, Santos, Mongaguá, Pedro de Toledo, Itanhaém and Peruíbe), in addition to *Atlantirivulus simplicis* found in the northern boundary (Paraty-RJ) of the distribution of *A. santensis* and *Atlantirivulus ribeirensis* (Juquiá-SP), southern limit, for comparative purposes, as external groups. The data obtained were analyzed with the software Geneious v.4.8.5, BioEdit v5.0.9 and Mega 7.0. The results were graphically represented in Neighbor-Joining (NJ), Automatic Barcode Gap Definition (ABGD) and PTP dendrograms. The analyzes generated three clusters (plus the two external groups) within *A. santensis*. The first group consists of specimens from Peruíbe, Pedro de Toledo and Itanhaém, the second from Santos, Mongaguá and São Paulo, and the last group from Maresias, Bertioga and Ubatuba. These data corroborate the hypothesis of the existence of three strains distributed on the coast of the State of São Paulo, which are currently grouped as *Atlantirivulus santensis*.

Keywords: DNA barcoding, COI, biogeography, Rivulidae

Matilde, Maria Julieta e Paulo

Agradecimentos

Aos meu pais, Rosa e William, por todo amor, educação e incentivo.

Agradeço à Camila, todos os dias...

A todos os meus familiares, em especial minha irmã Cinthia e meu avô Antônio (pescador!), meus primos e amigos Pedro, Maurice e Gabriel, por todos os momentos de cumplicidade e motivação.

A todos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, em especial Fabilene, Giovana, Mayumi, Leticia, Luz, Fabio, Gabriel, Bruno e Renato, por todos os momentos de descontração, incentivo e ajuda na execução desse trabalho.

Ao Dalton, pela colaboração e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti pela inspiração como pesquisador e pessoa.

Ao Prof. Dr. Ricardo C. Benine por toda a atenção.

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

A Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas (Genética) e Departamento de Morfologia e todos os funcionários do Instituto de Biociências, pela oportunidade e condições necessárias à realização deste estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Sumario

1. Introdução	9
1.1 Família Rivulidae	9
1.2 O gênero Atlantirivulus	11
1.4 Contextualização da Serra do Mar.....	14
1.5 A Biodiversidade e o viés taxonômico	16
2. Objetivos.....	17
3. Material e métodos	17
4.1 Coleta de dados	17
4.2 Análise dos dados	19
4.2.1 Análise molecular	19
Poisson Tree Processes (PTP).....	20
4.2.2 Análise morfológica.....	21
4. Resultados.....	22
Resultados morfológicos.....	27
5. Discussão	42
5.1 Taxonomia	42
5.2 Biogeografia	43
6. Conclusão	45
Referências	45
7. Apêndice	54
8. Anexo.....	60

1. Introdução

1.1 Família Rivulidae

Com aproximadamente 850 espécies distribuídas em 110 gêneros, a ordem Cyprinodontiformes constitui um dos maiores grupos de peixes Teleostei de água doce (Ponzetto, 2012). Nessa ordem encontramos os “killifishes” (Subordem: Aplocheiloidei) representados por três grandes famílias: i) Aplocheilidae distribuída na Ásia; ii) Nothobranchidae habita regiões da África; e iii) Rivulidae, à qual pertencem as espécies de “killifishes”, é a quarta maior família de peixes de água doce, com distribuição desde o Sul da Florida, nos Estados Unidos, até o Nordeste da Argentina (Costa, 2003; Reis *et al.*, 2003). É composta por peixes geralmente pequenos, raramente ultrapassando 80 mm de comprimento total (Costa, 1990; Nielsen, 1997). Atualmente essa família é composta por 36 gêneros com 350 espécies válidas, e divididas em três subfamílias: Kryptolebiatinae, Cynolebiatinae e Rivulinae, habitando regiões pantanosas de águas rasas, muitas vezes temporárias (Costa, 2003; 2004a; 2011).

Hipóteses de relacionamento para Aplocheiloidei foram propostas por Costa (2013) incluindo 61 representantes e seis “outgroups”, baseado num conjunto combinado de segmentos de três genes mitocondriais (citocromo b, 12S rRNA e 16S rRNA) e 199 caracteres morfológicos (Figura 1). Neste estudo, o autor demonstra que a divergência entre Cynolebiasinae e Rivulinae está relacionada a um evento de vicariância que separa o antigo grupo em áreas do leste brasileiro dos demais na área da Amazônia. A distribuição de Cynolebiasinae implica numa distribuição ancestral em áreas do leste e do escudo cristalino brasileiro, além de um evento de dispersão para a área Amazônica. Sendo que o ancestral mais recente dos Rivulinae é tido como endêmico da área Amazônica, a qual é habitada por representantes da maioria das linhagens de Rivulinae. Logo, dois importantes eventos de dispersão e vicariância são propostos de terem ocorrido, um dentro do gênero *Melanorivulus* na região Amazônica até a região dos escudos cristalinos brasileiros e outro da região Amazônica até o sudeste do Brasil, separando a recente área habitada pelo ancestral do *Atlantirivulus* (Costa, 2013).

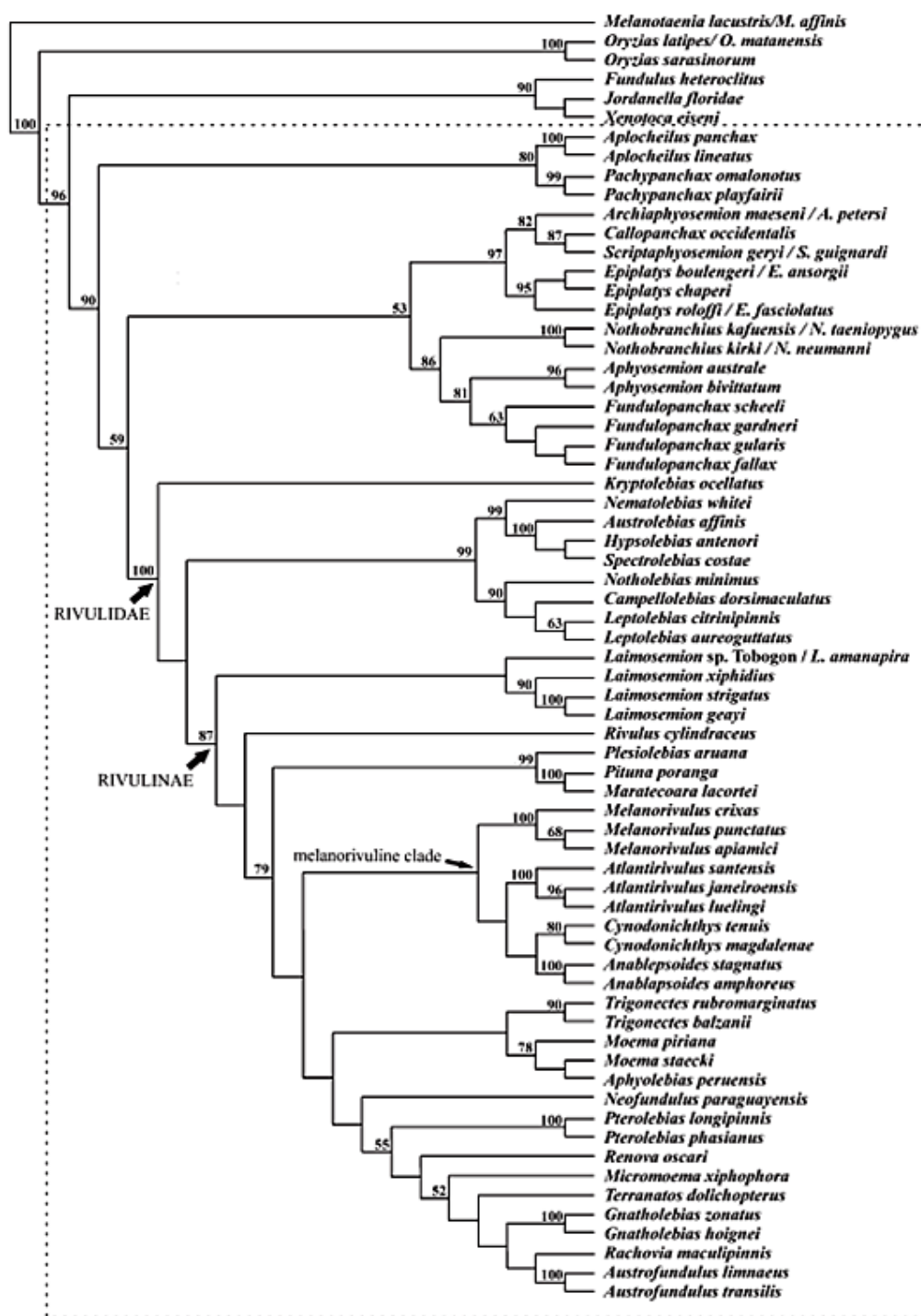


Figura 1 - Árvore filogenética mais parcimoniosa das relações filogenéticas entre representantes de Aplocheiloidei e seis “outgroups”. Números acima dos ramos são valores de bootstrap. O retângulo pontilhado delimita Aplocheiloidei. Adaptado de Costa (2013).

1.2 O gênero *Atlantirivulus*

Costa & Brasil (1991) reconheceram a monofilia de um grupo geograficamente isolado no Sudeste do Brasil baseado na morfologia apomórfica do osso angulo-articular. Esse grupo ficou conhecido como "o grupo *Rivulus santensis*" (Costa, 2004). Em 2008a, foi proposto por Costa o subgênero *Atlantirivulus* dentro de *Rivulus* que incluísse apenas espécies endêmicas da Mata Atlântica. Recentemente Costa (2011) apresentou um trabalho de filogenia de alguns gêneros da América Central e do Sul, baseado na morfologia de 15 espécies, incluindo o grupo conhecido como *Rivulus*. Como resultado deste trabalho, *Rivulus* se restringiu as duas espécies endêmicas de Cuba (*Rivulus cylindraceus* Poey, 1860 e *Rivulus berovidesi* R. R. Silva, 2015) e uma na República Dominicana (*Rivulus roloffi* Roloff, 1938), sendo *Anablepsoides*, *Atlantirivulus*, *Laimosemion*, *Melanorivulus* e *Cynodonichthys*, antes subgêneros de *Rivulus*, agora considerados gêneros válidos.

Atlantirivulus é um gênero composto por 15 espécies (Tabela 1) endêmicas da Mata Atlântica, e distribuídas nos Estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Fricke *et al.*, 2018). Podendo alcançar entre 25-45 mm de comprimento total, apresentam sempre nadadeiras curtas e arredondadas, distinguem-se de todos os outros Rivulidae devido aos neuromastos na série infra-orbital dispostos em ziguezague e por ter um processo ventral do ângulo-articular curvo. As espécies desse gênero vivem geralmente nas regiões de florestas densas (exceção de *A. jurubatibensis*), em banhados e alagados, com água ácida, habitando suas partes mais rasas, cerca de 10 cm de profundidade e altitudes abaixo de 100 m (Costa, 2011).

Trata-se de um grupo morfologicamente bem homogêneo, mas sua taxonomia tem sido negligenciada nos últimos anos, tornando evidente a necessidade de se compreender melhor esse grupo. As descobertas no sul do Estado do Rio de Janeiro (*Atlantirivulus simplicis*; Costa, 2004), sul de São Paulo e norte do Paraná (*Atlantirivulus ribeirensis*; Costa, 2014), que já fizeram parte do “grupo *Rivulus santensis*” ressaltam a importância do uso de ferramentas genéticas e taxonômicas para delimitar e melhor entender esse grupo.

Dentro do grupo se encontra *Atlantirivulus santensis* com ampla distribuição geográfica entre as planícies costeiras do Estado de São Paulo (Costa, 2008b), em muitos casos, habitando áreas com grande ocupação imobiliária, o que tem potencializado o risco de extinções.

Redescrita por Costa (2008b), a distribuição das populações de *Atlantirivulus santensis*

abrangeu desde Ubatuba-SP até Paranaguá-PR. O autor não utilizou dados moleculares para identificar geneticamente essas populações. O mesmo autor descreveu *Atlantirivulus ribeirensis*; (Costa, 2014), espécie que se distribui na Bacia do rio Ribeira de Iguape, de Iguape-SP até Paranaguá-PR. O autor relata que nenhuma outra espécie foi encontrada junto a *A. ribeirensis*. Portanto, ao verificar as localidades dos espécimes utilizados na redescrição (Costa, 2008b) e posteriormente na descrição dessa nova espécie (Costa, 2014), nota-se que são exemplares da mesma linhagem, sendo assim, atualmente a distribuição de *A. santensis* é mais restrita do que a relatada em sua redescrição, afinal, as populações de Iguape até o Paraná se tratavam na verdade de uma espécie diferente.

Souza *et al.*, (2018) indicam que espécies de ampla distribuição apresentam diferentes linhagens ou mesmo se enquadram em espécies crípticas, dados também corroborados por diferentes estudos (Costa 2001, 2006a, 2007a; Agnèse *et al.*, 2006; Sonnenberg, 2007), o que reforça a importância de uma revisão integrativa para *Atlantirivulus santensis*.

Tabela 1 – Relação de espécies do gênero *Atlantirivulus*

Espécie	Referência
<i>Atlantirivulus depressus</i>	Costa, 1991
<i>Atlantirivulus guanabarensis</i>	Costa, 2014
<i>Atlantirivulus haraldsiolii</i>	Berkenkamp, 1984
<i>Atlantirivulus janeiroensis</i>	Costa, 1991
<i>Atlantirivulus jurubatibensis</i>	Costa, 2008
<i>Atlantirivulus lazzarotoi</i>	Costa, 2007
<i>Atlantirivulus luelingi</i>	Seegers, 1984
<i>Atlantirivulus maricensis</i>	Costa, 2014
<i>Atlantirivulus nudiventris</i>	Costa & G. C. Brasil, 1991
<i>Atlantirivulus paranaguensis</i>	Costa, 2014

<i>Atlantirivulus ribeirensis</i>	Costa, 2014
<i>Atlantirivulus riograndensis</i>	Costa & Lanés, 2009
<i>Atlantirivulus santensis</i>	Köhler, 1906
<i>Atlantirivulus simplicis</i>	Costa, 2004
<i>Atlantirivulus unaensis</i>	Costa & De Luca, 2009

1.3 DNA Barcoding

Hebert *et al.* (2003) propuseram o DNA barcoding para a identificação molecular de espécies utilizando um pequeno fragmento de DNA (aproximadamente 650 pares de base) do gene mitocondrial Citocromo c Oxidase subunidade I (COI). Os autores justificam a escolha desse gene devido à ampla gama de estudos já realizados, além da existência de conjuntos robustos de primers universais para essa região para a maioria dos filos animais, pelo fato desse gene apresentar um aparente melhor sinal filogenético, por possuir uma taxa de mutação aproximadamente três vezes maior que as dos genes ribossomais 12S e 16S e demonstrar maior eficácia na atribuição de indivíduos à categorias taxonômicas elevadas (filos, ordens) por meio da análise das substituições de aminoácidos. Partindo de comparações entre as sequências obtidas, é estabelecido que ao apresentar um valor de divergência genética maior que 2% em relação a um espécime conhecido, esse espécime teria 95% de probabilidade de representar uma espécie diferente (Ward *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2011). Este limite é baseado na distribuição de valores de distância genética a partir do modelo Kimura-2 parâmetros (K2P) intra e interespecífica de, aproximadamente, 172.000 espécies sequenciadas, incluindo 9.502 peixes (Pereira *et al.*, 2013).

Denominada DNA barcode, em analogia ao sistema de identificação de produtos por códigos de barras, nessa metodologia uma espécie seria identificada por sua combinação única e exclusiva de nucleotídeos no fragmento do gene COI (Hebert *et al.*, 2003). A metodologia possui como premissa a exploração da diversidade entre as sequências de DNA, que tendem, a se tornarem únicas e exclusivas

durante a história evolutiva das espécies, graças as mutações (Hebert *et al.*, 2003). Outro fato constatado é que a variação genética observada entre indivíduos de uma mesma espécie (intraespecífica), em sua maioria, é significativamente menor do que a variação encontrada entre espécies (interespecífica) (Hebert *et al.*, 2003, Hebert *et al.*, 2004b). Essa diferença cria uma lacuna entre os valores de variação genética intra e interespecíficas denominada de “barcode gap” (Hebert *et al.*, 2004b), o que fornece o meio para a diferenciação entre as espécies (Hebert *et al.*, 2004b; Ward *et al.*, 2009). O principal objetivo dessa metodologia é a criação de um Sistema Global de Bioidentificação (GBS) que é a criação de um banco de dados público contendo as sequências barcode de toda a vida eucariótica (Hebert *et al.*, 2003).

O DNA barcode pode ser utilizado para identificar espécies e contribuir para revisão da nomenclatura de vários grupos, assim como pode ser utilizado como método de rotina para auxiliar na identificação de espécies (Hebert *et al.*, 2003).

Segundo Lipscomb *et al.* (2003), dizer que a taxonomia se restringe somente à identificação de espécies a torna uma simples atividade técnica ao invés de uma ciência baseada em hipóteses. O mesmo se aplica aos estudos de DNA barcode, que não se tratam apenas de gerar sequências, pois estes procuram interpretar as semelhanças e divergências entre as sequências e suas relações com as espécies já reconhecidas, contextualizando assim a possível discriminação entre as linhagens. Para tanto, DeSalle *et al.* (2005), propuseram que deve haver uma ponte entre as pesquisas moleculares e morfológicas e que isso deve aprimorar o processo de identificação de espécies.

Rosenberg (2007) demonstrou que uma pequena amostra, de apenas dez indivíduos para cada grupo testado pode ser suficiente para uma discriminação altamente significativa do ponto de vista estatístico, sendo cinco exemplares o mínimo a ser amostrado de cada espécie, preferencialmente procedentes de diferentes pontos dentro da área estudada, a fim de se obter resultados bem suportados estatisticamente.

1.4 Contextualização da Serra do Mar

A região Neotropical compreende a área do sul da América do Norte até a América do Sul, e apresenta a maior ictiofauna de água doce do planeta (5160 espécies), com estimativas atuais acima de 9100 espécies para águas continentais e marinhas costeiras combinadas, prevê-se que o total de

espécies de peixes de água doce neotropicais esteja entre 8000 e 9000 espécies (Reis *et al.*, 2016).

O Brasil é um dos detentores dessa diversidade de peixes de água doce por possuir uma das maiores redes hidrográficas do mundo. Estima-se mais de 2.500 espécies válidas atualmente, no entanto, com o aumento dos estudos e das coletas em ambientes pouco explorados e o acréscimo de outros ainda não pesquisados, esse número com certeza aumentará (Reis *et al.*, 2016). De acordo com Myers *et al.* (2000) há ainda em torno de 5000 espécies de peixes não descobertas, ou um número aproximadamente maior do que todos os mamíferos (5416 espécies - Wilson & Reeder, 2005) até então conhecidos.

Segundo Castro (1999) nas regiões do sudoeste do Rio de Janeiro e nordeste de São Paulo encontram-se pequenas drenagens costeiras, que abrigam geralmente espécies de menor porte e com elevado endemismo, devido à baixa capacidade de deslocamento desses peixes. A atual formação geográfica do litoral norte do Estado de São Paulo é composta de áreas nas quais a Serra do Mar se conecta diretamente com o mar, isolando as planícies costeiras, o que favoreceu o processo de especiação no passado (Thomaz *et al.*, 2015b). A descoberta de novos táxons nestas bacias de baixa ou nenhuma amostragem, ou mesmo o desmembramento de grupos erroneamente atribuídos às espécies já descritas, podem ainda aumentar o número de espécies conhecidas nestas regiões. Levantamentos da ictiofauna de água doce em áreas costeiras muitas vezes são escassos, dificultando análises biogeográficas que corroborem com a elaboração de processos históricos que influenciaram na estruturação das bacias hidrográficas (Serra *et al.*, 2007).

A ictiofauna dos rios e riachos que drenam a Mata Atlântica é reconhecida pelo alto grau de endemismo e o padrão de distribuição das espécies é o resultado de milhões de anos de evolução da paisagem (Menezes *et al.*, 2007). Já que a grande maioria das espécies de peixes de água doce é incapaz de transpor porções de terra ou tolerar níveis de salinidade como a água do mar, o oceano e as barreiras terrestres são capazes de isolar populações de peixes dentro de uma determinada bacia hidrográfica após sua formação (Vari, 1988).

Padrões de isolamento de drenagem e coalescência entre bacias hidrográficas têm sido associados à especiação e dispersão em grande escala, respectivamente, em muitos grupos de peixes de água doce da América do Sul tropical (Awise, 2004; Reis *et al.*, 2016). Em virtude da desconexão atual entre as bacias hidrográficas, é esperado também que populações de espécies de peixes de corpos de águas distintos e independentes sejam geneticamente estruturadas (Awise, 2000; Waters *et al.*, 2007). Já

que há dependência direta de conexões entre as bacias hidrográficas para que os peixes de água doce aumentem sua dispersão, é esperada uma forte relação entre a história das bacias e sua ictiofauna (Hischmann *et al.*, 2015).

As bacias que drenam a Mata Atlântica ocupam a parte leste do escudo cristalino brasileiro, uma área de topografia complexa, que foi moldada pela atividade tectônica ocorrida no Terciário e mudanças no nível do mar no Quaternário (Ribeiro *et al.*, 2006). Assim, os eventos que provavelmente são responsáveis pelos atuais padrões de distribuição de espécies de peixes na Mata Atlântica, devem ser atribuídos às atividades neotectônicas nas áreas de planalto e expansões/retrações das planícies costeiras. Estas decorrentes das flutuações do nível do mar, capturas de cabeceiras e flutuações laterais dos rios em sistemas de leques aluviais, os quais tiveram grande interferência na reformulação e similaridade ictiofaunística da rede hidrográfica da região Sul e Sudeste. (Ribeiro *et al.*, 2006; Montoya-Burgos, 2003; Menezes *et al.*, 2007; Torres & Ribeiro, 2008; Roxo *et al.*, 2012; Camelier *et al.* 2018). A continuidade destes processos foi provavelmente a causa de uma intensa entrada da fauna do escudo cristalino para os rios costeiros ao longo do Terciário e depois, como exemplificado pelos Padrões B e C apresentados em Ribeiro *et al.* (2006).

1.5 A Biodiversidade e o viés taxonômico

Das 986 espécies na Mata Atlântica, 183 espécies (18,5%) foram listadas como ameaçadas, indicando que este bioma é um dos mais ameaçados (Reis *et al.*, 2016). Portanto, conhecer a riqueza de espécies requer um conhecimento detalhado das distribuições geográficas e das relações filogenéticas, aliadas a evolução da paisagem, podendo assim, contribuir para a implementação de estratégias conservacionistas eficazes para a biodiversidade (Moritz *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 2016).

Entretanto, utilizar somente a distribuição de determinada espécie para as análises biogeográficas pode levar a conclusões enganosas, em especial, entre os grupos que compreendem um complexo de espécies, as quais são ligeiramente distinguíveis por caracteres morfológicos e frequentemente classificadas como uma espécie nominal única, ou seja, espécies crípticas (Bickford *et al.*, 2007). A inclusão de dados moleculares se torna potencialmente mais esclarecedora nesses casos, pois, geralmente os grupos resultam de um histórico evolutivo independente (Waters & Wallis, 2000; Frankham *et al.*, 2008; Galetti Jr *et al.*, 2008).

A ocorrência de complexos de espécies tem sido relatada entre killifishes aplocheiloides habitando áreas tropicais da África e da América do Sul (Costa, 2001, 2009; Agnèse et al., 2006; Sonnenberg, 2007; Wildekamp et al., 2009). Estes complexos são caracterizados por espécies alopátricas ou parapátricas com intenso dimorfismo sexual, as quais podem ser reconhecidas por detalhes nos padrões de coloração e morfologia das nadadeiras dos machos, embora caracteres morfológicos raramente sejam úteis para distingui-los. As fêmeas, frequentemente, são similares morfológicamente (Costa 2001, 2006a, 2007a; Agnèse et al., 2006; Sonnenberg, 2007).

Os vieses taxonômicos são mais frequentes entre esses grupos, e as estimativas precisas de biodiversidade não se tornam viáveis, consequentemente, as avaliações sobre o estado de conservação podem ser equivocadas quando o reconhecimento de espécies é problemático (Schönrogge et al., 2002).

2. Objetivos

Esse estudo teve por objetivo testar a hipótese de que populações de *A. santesis* pertencem a uma única espécie. Portanto:

- ✓ Verificar se existem diferentes linhagens ou se representam um complexo de *A. santesis* utilizando a ferramenta do DNA Barcoding;
- ✓ Realizar a revisão taxonômica de *A. santesis* através de caracteres morfológicos;

3. Material e métodos

4.1 Coleta de dados

Foram amostrados de dois a 15 espécimes de cada população ao longo do litoral de São Paulo (Fig. 2) utilizando redes-de-mão e redes-de-arrasto. Os indivíduos capturados foram transportados vivos até o Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBGP), onde representantes de cada localidade foram fotografados (Anexo Fig.1-9). Em seguida todos os espécimes foram anestesiados e sacrificados para que uma amostra de um pequeno fragmento de tecido fosse retirada e armazenada em etanol 95%.

Posteriormente, estes indivíduos foram fixados, etiquetados e depositados na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (Apêndice).

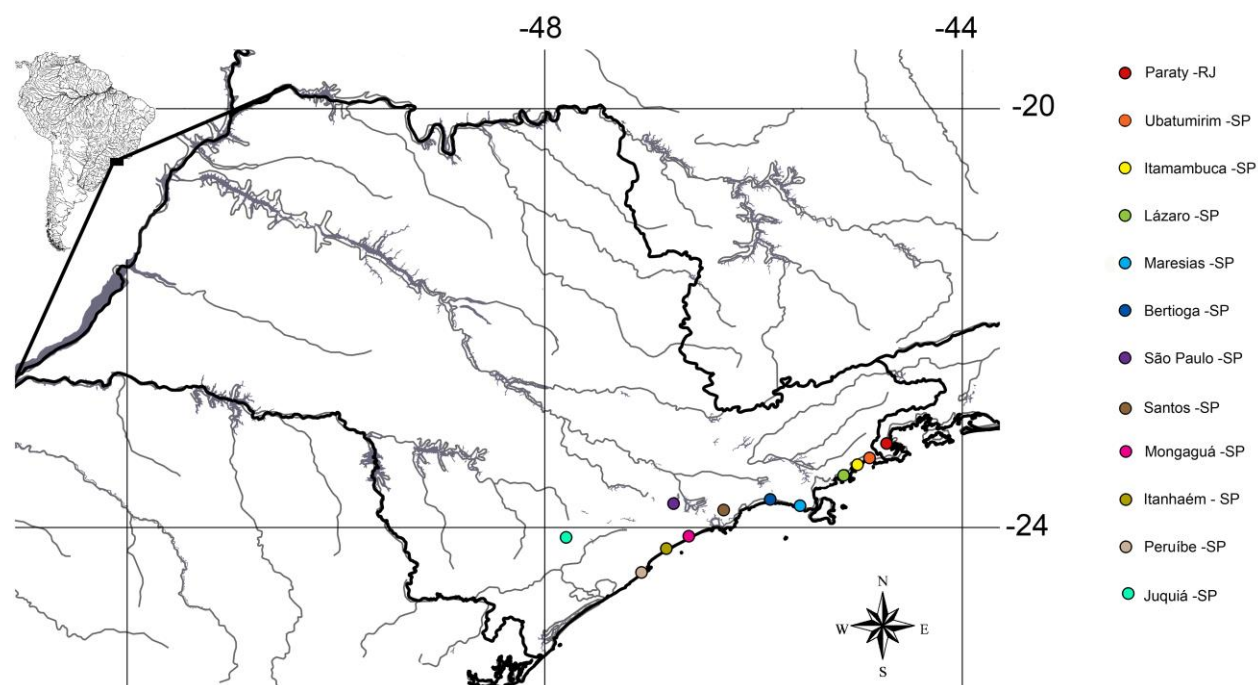


Figura 2 – Distribuição dos pontos de coleta dos exemplares de *Atlantirivulus santensis* ao longo da costa do estado de São Paulo. Os pontos em **vermelho** e **azul** representam as localidades das populações utilizadas como grupos externos. Respectivamente, *Atlantirivulus simplicis* e *Atlantirivulus ribeirensis*.

4.2 Análise dos dados

4.2.1 Análise molecular

Extração de DNA genômico, amplificação e sequenciamento

O DNA total foi obtido a partir de amostras de fígado ou músculo utilizando o protocolo de Ivanova *et al.* (2007).

As sequências parciais do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI) foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando um volume total de 12.9 µL com 1.25 µL de 10X tampão (10 mM Tris-HCl), 0,375 µL MgCl (50 mM), 0.5 µL dNTPs (200 nM de cada), 0.25 µL de cada *primer* (5 mM- COI L6252-Asn e H7271-COXI (Melo *et al.* 2011)), 0.1 µL Platinum® Taq Polymerase (Invitrogen), 2 µL DNA genômico (12 ng) e 8.175 µL de ddH₂O. A reação da PCR consistiu na seguinte programação: um passo inicial de 4min a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50-54°C e 1 minuto a 72°C e extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% e purificados utilizando o ExoSap-IT® (USB Corporation, Cleveland, USA). Então, esses produtos foram sequenciados utilizando o kit “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems, Austin, USA) usando 3,5 µl de água ultrapura, 1,5 µl 5x de tampão de BigDye, 0,70 µl de BigDye Terminator, 0,35 µl de primer (10 mM) e 1 µl do produto de PCR purificado. As condições de termociclagem foram os seguintes parâmetros: 1 minuto a 96°C; 35 ciclos de 15 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C e 2 minutos a 60°C. Finalizada a reação, os produtos foram purificados pelo método de Acetato/EDTA/etanol e analisados em um sequenciador de DNA automático, modelo ABI 3130-Genetic Analyzer (Applied Biosystems, California, USA).

Obtenção das sequências consenso, alinhamentos e matrizes de dados

As sequências de DNA obtidas foram editadas no programa Geneious v. 4.2.2 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012) e alinhadas pelo algoritmo Muscle (Edgar *et al.* 2004), implementado no programa Geneious 4.2.2 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 *et al.*, 2003; Xia & Lemey, 2009) foi estimado no programa Dambe 5.3.38 (Xia 2001).

Para avaliar a diversidade genética de *A. santensis*, foram realizadas análises utilizando os métodos Neighbor-Joining (NJ), Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) e Poisson Tree Processes (PTP).

Neighbor-Joining (NJ)

Os padrões de divergência sugeridos pelas distâncias intra e interespecíficas foram graficamente representados usando um dendrograma de Neighbor-Joining (NJ) com 1000 réplicas de bootstrap, utilizando o melhor modelo estimado, T92 (Tamura 3-parâmetros - Tamura, 1992), no programa MEGA v7.0 (Kumar *et al.*, 2015).

Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD)

Puillandre *et al.* (2011) propuseram um procedimento automático que classifica as sequências em espécies hipotéticas baseadas no gap de DNA Barcode, que pode ser observado sempre que a divergência entre organismos pertencentes à mesma espécie for menor que a divergência entre organismos de espécies diferentes. O método chamado Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD), detecta o gap do barcode como o primeiro gap significativo além desse limite e o utiliza para particionar os dados. A inferência do limite e da detecção de intervalo é aplicada recursivamente aos grupos previamente obtidos para obter partições mais finas até que não haja mais particionamento. ABGD é computacionalmente eficiente, ressalta-se a sensibilidade do método à presença de eventos recentes de especiação.

A análise de ABGD foi processada usando a versão “web” disponível em: <http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>, sob os parâmetros “default”.

As matrizes de dados foram exportadas para o programa MEGA v.7.0 (Kumar *et al.*, 2016) onde foram estimados os valores de distâncias genéticas intra e interespecíficas utilizando-se o modelo de substituição T92 (Tamura 3-parâmetros) (Tamura, 1992). Estas mesmas ferramentas foram utilizadas para a construção dos dendrogramas baseados no método de Neighbor-Joining (NJ) para se obter uma representação gráfica do padrão de distribuição da divergência genética T92 obtida.

Poisson Tree Processes (PTP)

Uma árvore de Máxima Verossimilhança (ML) gerada pelo modelo T92 (Tamura 3-parâmetros - Tamura, 1992), no programa MEGA v7.0 ((Kumar *et al.*, 2015) foi usada como “input” na análise de máxima verossimilhança para PTP, implementada no servidor bPTP (<http://species.h-its.org/pt/>; / Zhang *et al.*, 2013). O PTP é um método de delimitação de locus único que utiliza apenas informações de substituição de nucleotídeos, implementando um modelo que assume comprimentos de ramos de árvores gênicas gerados por duas classes independentes de processos de Poisson (eventos de substituição dentro e entre espécies). A análise de PTP foi realizada utilizando 100.000 gerações MCMC, com “Thinning” 100 e “burn-in” de 0,1. Estudos de simulação disponíveis sugerem que o PTP supera o GMYC para delimitações de espécies de locus único (Pons *et al.*, 2006; Fujisawa & Barraclough, 2013), sem a necessidade de uma árvore ultramétrica.

4.2.2 Análise morfológica

As medições foram feitas ponto a ponto sob um estereomicroscópio com um paquímetro digital para o 0,01mm mais próximo no lado esquerdo dos espécimes, sempre que possível, seguindo Costa (1995b; 2007). As medidas são expressas como porcentagens de comprimento padrão (SL), exceto as subunidades da cabeça, que são registradas como porcentagens de comprimento da cabeça (HL). Na descrição, contagens de vértebras e costelas pleurais foram obtidas de espécimes clareados e corados (c & s) de *Atlantirivulus santensis*, dois machos de Ubatuba, um macho de Santos e uma fêmea de Itanhaém, preparados de acordo com Taylor e Van Dyke (1985). A terminologia da escamação frontal segue Hoedeman (1958) e Costa (2006b). Para as contagens vertebrais, o centro do composto caudal foi contado como um único elemento. As características osteológicas incluídas na descrição são aquelas consideradas filogeneticamente informativas por estudos recentes sobre *Atlantirivulus* (Costa 2006b, 2011a). Abreviações institucionais seguem Sabaj-Pérez (2010).

4. Resultados

No total, 68 sequências do gene COI foram obtidas para representantes de *Atlantirivulus santensis*, além de 4 sequências de *Atlantirivulus simplicis* e 5 sequências de *Atlantirivulus ribeirensis*, para fins comparativos, totalizando 77 sequências (ver lista do material no Apêndice para maiores informações). A matriz obtida possui 541 pb, sendo que 456 pb são conservadas e 85 pb são variáveis. A frequência nucleotídica foi de 24.9% de timina, 15.9% de citosina, 35% de adenina e 24.3% de guanina. A divergência média total foi de 6% ($\pm 1\%$) para todas as sequências obtidas. Os dados não apresentaram saturação (Figura 11- Anexo) considerando que o índice de Iss não indicou nenhuma saturação em transições e transversões, em topologias assimétricas (Iss.cAsym) e simétricas (Iss.cSym) (Xia *et. al.*, 2003; Xia & Lemey, 2009).

Em relação a reconstrução do COI, três linhagens (aqui nomeadas: Litoral Norte, Baixada Santista/ São Paulo e Litoral Sul) correspondentes aos locais amostrados surgiram como a melhor partição genética nos três métodos: ABGD (Figura 4), NJ (Figura 5) e PTP (Figura 6). Utilizando o método de distância T92 com valor limiar ($> 2\%$), as populações do Litoral Norte e Baixada Santista/ São Paulo são linhagens mais distantes, com uma divergência genética interespecífica de 8.0%, enquanto as da Baixada Santista/ São Paulo e Litoral Sul representam diferentes linhagens, entretanto mais próximas entre si (3%). Já a divergência entre as populações do Litoral Norte e Sul apresenta a maior distância observada, 9%. Distância maior que os 7% observados entre as populações de *A. ribeirensis* e as do Litoral Sul ou Baixada Santista/ São Paulo (Tabela 2).

A divergência interna dos grupos foi 0.5% para o Litoral Norte, 0.4% para a linhagem do Litoral Sul e 0.1% na Baixada Santista/ São Paulo (Tabela 3). Dados proporcionais as áreas de distribuição das linhagens, aquela com maior distância intraespecífica, também se encontra mais distribuída (Ubatuba-SP a Bertioga-SP) – Litoral Norte. Já a que apresenta área mais restrita, também possui menor distância (Santos-Mongaguá-São Paulo) – Litoral Sul.

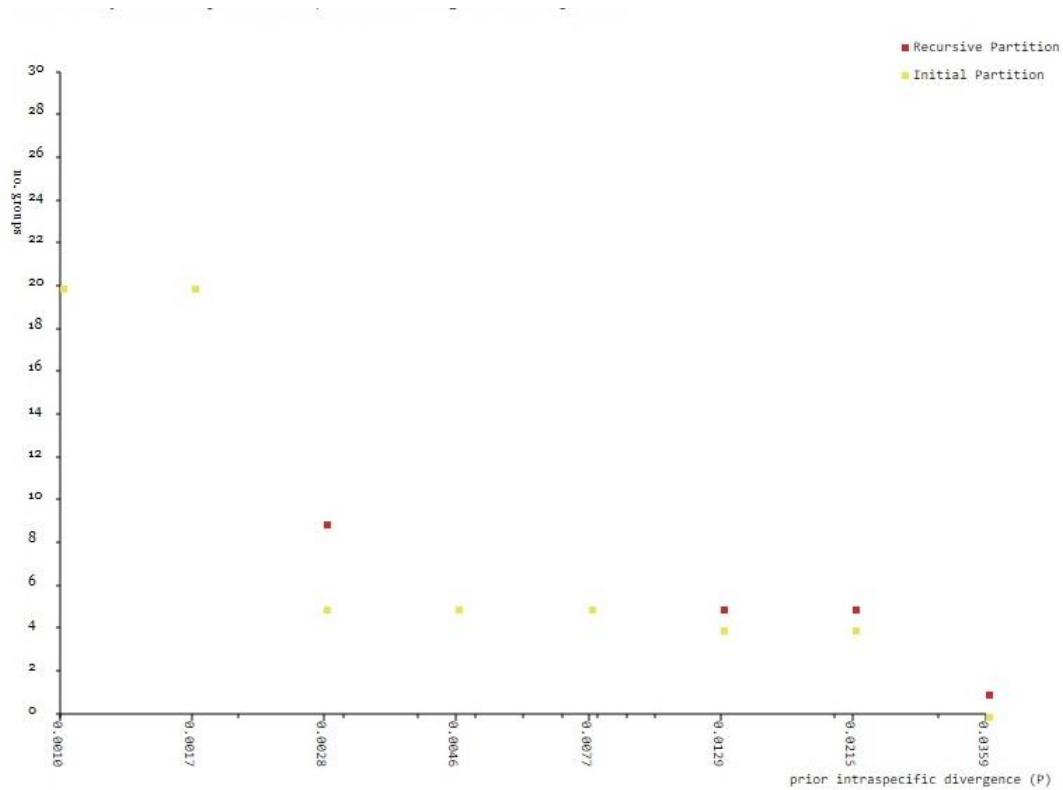


Figura 4: Gráfico ABGD para correlação de grupos (Eixo “Y”) e agrupamento de divergência intraespecífica (P) (Eixo “X”) para as sequências COI de *Atlantirivulus santensis* e os dois grupos externos.

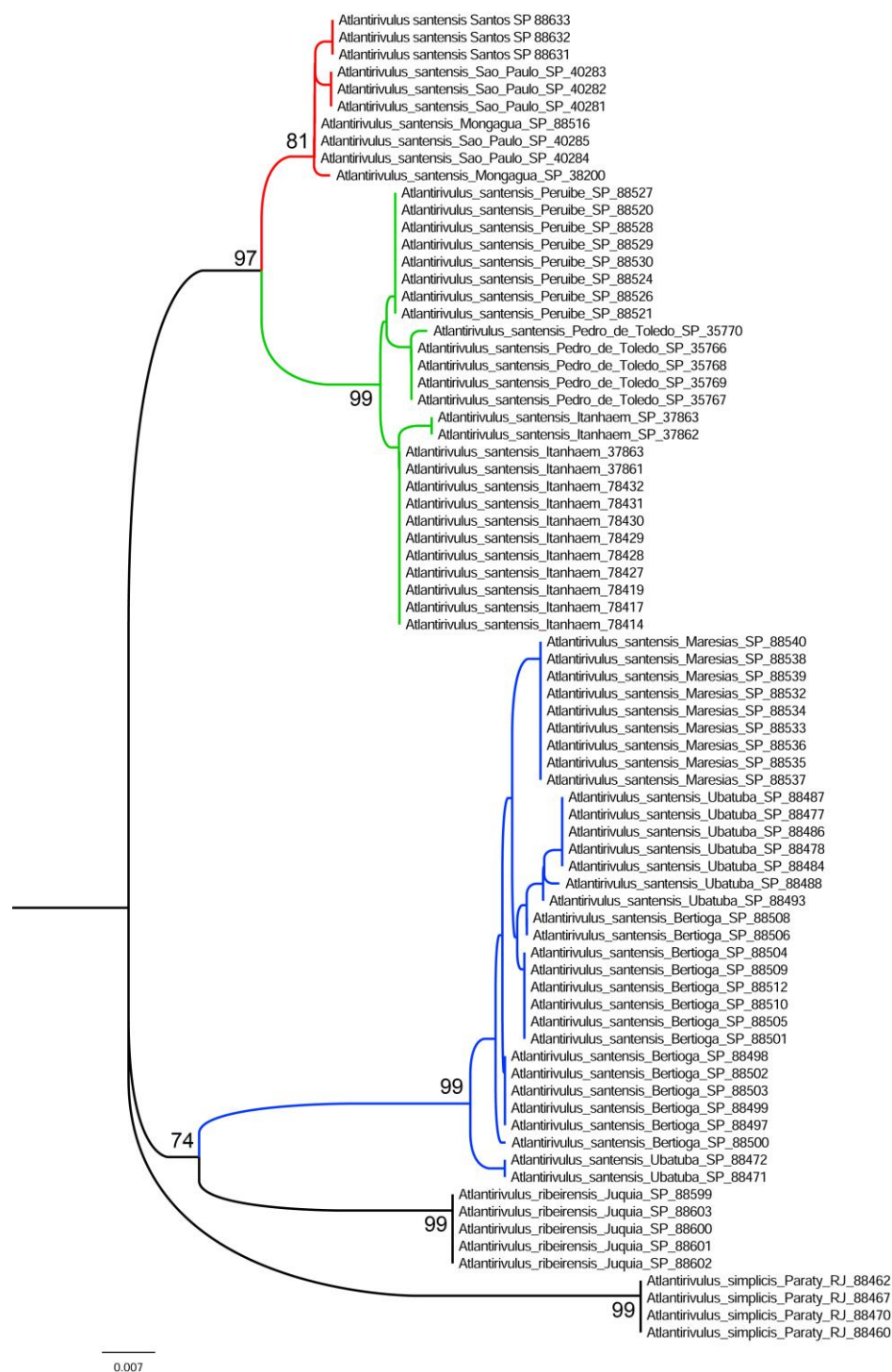


Figura 5: Árvore de Neighbor-Joining utilizando o modelo de evolução T92 (Tamura 3-parâmetros) para as sequências COI de *A. santensis*. Clado em **vermelho**- Baixada Santista/São Paulo, em **verde** – Litoral Sul, em **azul** - Litoral Norte.

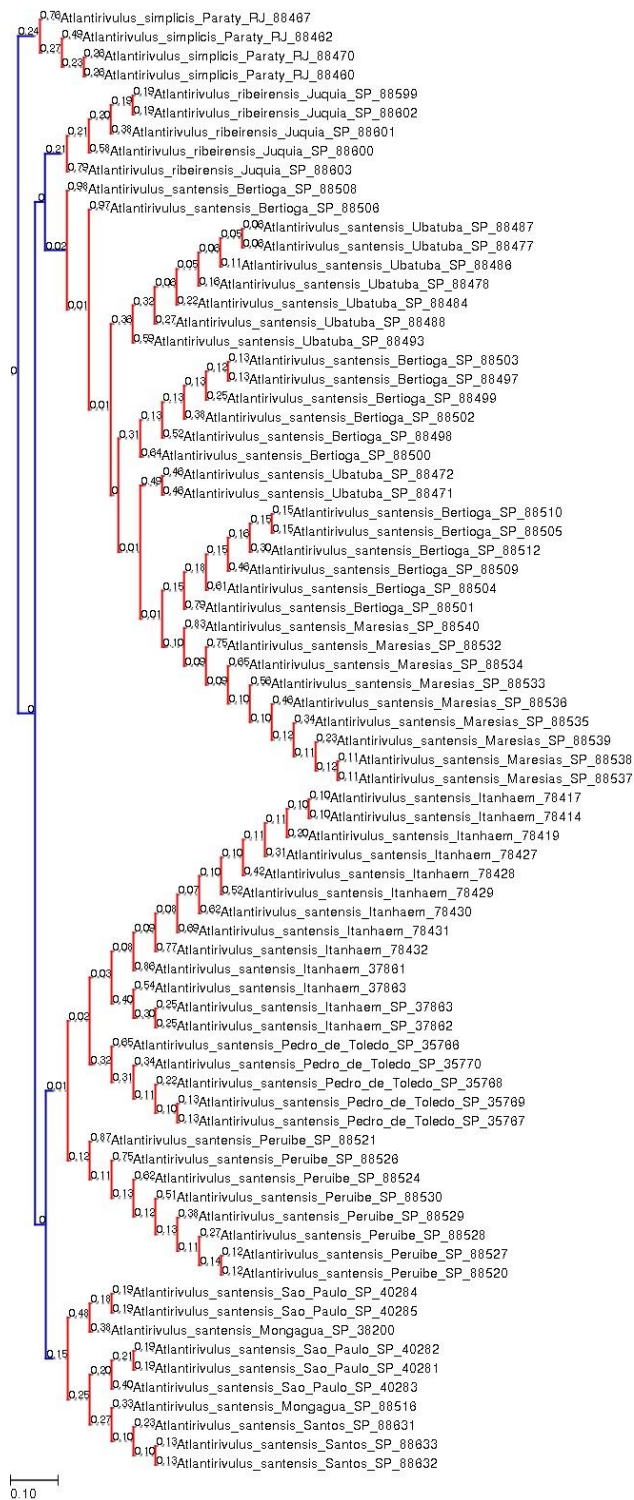


Figura 6: Árvore de máxima verossimilhança gerada pelo método PTP, com “input” de uma árvore ML.

Tabela 2. Distância genética (T92) interespecífica dos grupos.

GRUPO	GRUPO	DISTÂNCIA	DESVIO PADRÃO
Litoral Norte	São Paulo/Baixada Santista	8%	1%
Litoral Norte	Litoral Sul	9%	1%
Litoral Norte	<i>A. simplicis</i>	11%	1%
Litoral Norte	<i>A. ribeirensis</i>	10%	1%
São Paulo/Baixada Santista	Litoral Sul	3%	1%
São Paulo/Baixada Santista	<i>A. simplicis</i>	10%	1%
São Paulo/Baixada Santista	<i>A. ribeirensis</i>	7%	1%
Litoral Sul	<i>A. simplicis</i>	9%	1%
Litoral Sul	<i>A. ribeirensis</i>	7%	1%

Tabela 3. Distância genética (T92) intraespecífica da espécie *Atlantirivulus santensis*.

GRUPO	DISTÂNCIA	DESVIO PADRÃO
Litoral Norte	0,5%	0,1%
São Paulo/Baixada Santista	0,1%	0,1%
Litoral Sul	0,4%	0,1%

Resultados morfológicos

Atlantirivulus santensis - Litoral Norte

Figura 7-8, Tabela 4



Figura 7: Exemplar macho de *A. santensis* coletado em Bertioga – São Paulo.



Figura 8: Exemplar fêmea de *A. santensis* coletado em Bertioga – São Paulo.

Diferenças observadas em relação ao grupo da Baixada Santista (potenciais caracteres diagnósticos):

Ventre amarelo intenso (vs. ventre hialino-amarelado, com amarelo mais forte na região da cabeça), íris amarela-esverdeada clara (vs. íris amarela-alaranjada), nadadeira caudal amarela esverdeada, com faixa cinza escuro a preta na margem distal, apresenta pigmentações junto aos raios e pontuações cinza escuro que se concentram na porção basal e superior da nadadeira (vs. nadadeira caudal amarelo esverdeado a cinza amarelado escuro; faixa cinza escuro a preta nas margens dorsal e ventral da nadadeira, faixa ventral duas ou três vezes mais larga que a faixa dorsal, com faixa dorsal discreta), nadadeira pélvica azulada com margem anterior estreita e amarela (vs. nadadeira pélvica amarelada hialina).

Descrição:

Dados morfométricos aparecem na Tabela 4. Perfis dorsal e ventral fracamente convexos do focinho até extremidade posterior das bases dorsais e da nadadeira anal, aproximadamente em linha reta no pedúnculo caudal. Corpo delgado, sub-cilíndrico anteriormente, ligeiramente mais profundo que largo, comprimido posteriormente. Maior profundidade corporal na vertical em frente à base da nadadeira pélvica. Mandíbulas curtas, focinho sem corte.

Nadadeiras dorsais e anais curtas, extremidades arredondadas, por vezes ligeiramente pontiagudas nos machos. Nadadeira caudal oval, curta. Nadadeira peitoral arredondada, margem posterior atingindo verticalmente aproximadamente 60% do comprimento entre a nadadeira peitoral e a base da pelve. Nadadeira pélvica pequena, oval, ponta atingindo entre a papila urogenital e a base do 2º raio anal nos machos, atingindo o ânus nas fêmeas; as bases da nadadeira pélvica medialmente nas proximidades. Origem da nadadeira dorsal na vertical na base do 11º raio da nadadeira anal, origem da nadadeira dorsal na altura da 24ª-25ª vértebra, origem da nadadeira anal na altura da 17ª-18ª vértebra. Raios da nadadeira dorsal 7 - 9; raios da nadadeira anal 12 - 14; raios da nadadeira caudal 28 - 33; raios da nadadeira peitoral 13; raios da nadadeira pélvica 5.

Escamas pequenas, ciclóides. Corpo e cabeça inteiramente escamadas, exceto a superfície ventral anterior da cabeça. Escamação corporal que se estende sobre 25% da base da nadadeira caudal;

nenhuma escama nas bases das nadadeiras dorsal e anal. Escamamento frontal com padrão E; Escalas E não sobrepostas medialmente. Séries longitudinais de escamas 33; séries transversais de escamas 8; escamas totais ao redor do pedúnculo caudal 16.

Neuromastos cefálicos: supraorbital 3 + 3, parietal 1, rostral anterior 1, rostral posterior 1, infraorbital 1 + 9-10 + 1, pré-orbital 1, otic 1, pós-ótico 2, supratemporal 1, opercular mediano 1, opercular ventral 1, preopercular 2 + 4, mandibular 3 + 1, lateral mandibular 1, paramandibular 1. Linha lateral dividida em 2 cortes, seção anterior entre cabeça e vertical logo anterior ao final da nadadeira peitoral, seção posterior em série longitudinal logo abaixo da seção anterior, entre a vertical através do final da nadadeira peitoral e porção média da base da nadadeira caudal; 1 neuromasto por escama de linha lateral; 2 neuromastos na base da nadadeira caudal. Dermosfenótico presente. Processo ventral de póstemporal ausente. Vértébras totais 33 - 34.

Coloração:

Machos - Lateral do corpo castanho-púrpuro claro com alternância de barras oblíquas de cor verde-amarelada e barras oblíquas rosa pálido, às vezes mal visíveis; dorso marrom claro; ventre amarelo intenso; lado da cabeça marrom claro a cinza escuro acima da linha horizontal através da margem ventral da órbita, amarelo claro abaixo do olho; região opercular esverdeada; mandíbulas cinza claro; íris amarelo-esverdeado claro, com contorno azul esverdeado na parte posterior; nadadeira dorsal amarelo pálido, muitas vezes com três ou quatro estreitas e oblíquas listras marrons pálidas, com porção basal azul claro; nadadeira anal amarela, porção basal azul claro, com margem distal cinza escura a preta; nadadeira caudal amarelo esverdeado, com faixa cinza escuro a preta na margem distal, apresenta pigmentações junto aos raios e pontuações cinza escuro que se concentram na porção basal e superior da nadadeira; nadadeira peitoral amarelada hialina; nadadeira pélvica azulada com margem anterior estreita e amarela.

Fêmeas - Lateral do corpo laranja claro amarronzado, com cinza pálido e pontos azuis claros, mais concentrados entre a pélvica e a caudal; dorso marrom claro; ventre amarelo pálido esbranquiçado; lado da cabeça castanho claro, região pós-orbital castanha escura, porção ventral do opérculo pálido dourado, suborbital amarelo claro; maxilares marrom-claro acinzentados; íris amarelo alaranjado, com contorno azulado na parte ínfero-posterior; nadadeira dorsal amarelada hialina com fileiras transversais

de pequenas manchas cinzentas escuras; nadadeira anal amarelo, com porção basal azul claro; nadadeira caudal amarelo pálido a laranja hialino, levemente azuladas na base, com fileiras transversais de pontos castanhos escuros; mancha circular cinzenta escura na porção dorsal da base da nadadeira caudal, algumas vezes discreta; nadadeiras pareadas amareladas hialinas.

Distribuição e habitat.

As populações do Litoral Norte do Estado de São Paulo foram encontradas em várias drenagens fluviais e nas planícies costeiras (coordenadas encontradas na Tabela do Apêndice) com áreas pantanosas bem próximas das praias (Ubatumirim, Itamambuca, Lázaro, Guaratuba, Maresias). A distribuição geográfica abrange áreas urbanas tanto na cidade de Ubatuba como em outras cidades como São Sebastião (Maresias) e Bertioga, onde os habitats aquáticos foram destruídos nas últimas décadas. No entanto, a espécie também é encontrada em áreas ainda preservadas, incluindo a sua localidade-tipo.

Tabela 4. Dados morfométricos de *Atlantirivulus santensis* - Litoral Norte.

	Holótipo	Parátipo	Parátipo
	Macho	Macho n= 11	Fêmea n= 3
Comprimento padrão (mm)	31,4	27,2-43,1	24,3-31,7
Altura do corpo	18,6	18,0-20,87	19,2-21,7
Altura do pedúnculo caudal	11,6	12,3-15,2	11,5-12,7
Comprimento da Predorsal	76,3	72,4-80,9	74,6-80,4
Comprimento da Prepelvica	51,9	48,2-67,6	48,6-56,4
Comprimento da base da nadadeira dorsal	7,8	6,2-11,2	7,7-9,1
Comprimento da base da nadadeira anal	18,6	17,9-23,1	18,1-19,2
Comprimento da nadadeira Caudal	24,2	21,0-30,0	22,7-28,4
Comprimento da nadadeira peitoral	16,2	15,9-21,3	14,3-21,0
Comprimento da nadadeira pélvica	6	4,2-8,0	4,2-4,9
Comprimento da cabeça	21,4	18,3-24,3	19,9-23,4
Altura da cabeça	71	59,9-84,2	65,7-75,5
Largura da cabeça	80,3	75,8-95,4	77,5-93,5
Comprimento do focinho	27,2	28,84-35,4	26,0-32,9
Comprimento da mandíbula	23,6	18,6-30,2	19,5-21,6
Diâmetro do olho	32,2	31,67-39,44	29,8-34,7
Raios da nadadeira dorsal	7	7-9	7-8
Raios da nadadeira caudal	31	28-33	28-30
Raios da nadadeira anal	14	12-14	13-14
Raios da nadadeira pélvica	5	5	5
Raios da nadadeira peitoral	13	13	13
Escamas na série longitudinal	33	33	33
Escamas na série transversal	8	8	8
Linhas horizontais de escamas ao redor do pedúnculo caudal	16	16	16
Vértebras	33	34	33-34

Atlantirivulus santensis - Baixada Santista e São Paulo

Figura 9-10, Tabela 5



Figura 9: Exemplar macho de *A. santensis* coletado em Mongaguá – São Paulo.



Figura 10: Exemplar fêmea de *A. santensis* coletado em Santos – São Paulo.

Diagnose:

Traduzida de Costa (2008).

“*Rivulus santensis* é semelhante ao *Rivulus haraldsioi* por ter o perfil lateral do focinho suavemente alongado e ligeiramente pontudo (vs mais curto e arredondado em todas as outras espécies do grupo *R. santensis*). *Rivulus santensis* difere de *R. haraldsioi* por ter 16 fileiras de escamas ao redor do pedúnculo caudal (vs 14) e geralmente um, às vezes dois, diminutos órgãos de contato por escama na porção média do flanco em machos (vs. 2-7 órgãos de contato proeminentes por escama). *Rivulus santensis* é distinguido de todas as outras espécies do grupo *Rivulus santensis* pelo padrão de coloração único da nadadeira caudal nos machos, consistindo de uma faixa cinza escura a preta nas margens dorsal e ventral da nadadeira, a faixa ventral duas ou três vezes mais larga que a dorsal (vs faixas de aproximadamente a mesma largura, quando presentes)”.

Descrição:

Dados morfométricos aparecem na Tabela 5. Perfis dorsal e ventral fracamente convexos do focinho até extremidade posterior das bases dorsais e nadadeira anal, aproximadamente em linha reta no pedúnculo caudal. Corpo delgado, sub-cilíndrico anteriormente, ligeiramente mais profundo que largo, comprimido posteriormente. Maior profundidade do corpo na vertical em frente à base da nadadeira pélvica. Mandíbulas curtas, focinho sem corte.

Nadadeiras dorsais e anais curtas, extremidades arredondadas, por vezes ligeiramente pontiagudas nos machos. Nadadeira caudal oval, curta. Nadadeira peitoral arredondada, margem posterior atingindo verticalmente em torno de 60% do comprimento entre a nadadeira peitoral e a base da pelve. Nadadeira pélvica pequena, oval, ponta atingindo entre a papila urogenital e a base do 2º raio anal nos machos, atingindo o ânus nas fêmeas; as bases da nadadeira pélvica medialmente nas proximidades. Origem da nadadeira dorsal na vertical na base do 11º raio da nadadeira anal, origem da nadadeira dorsal na altura da 25ª-26ª vértebra, origem da nadadeira anal na altura da 18ª-19ª vértebra. Raios da nadadeira dorsal 8; raios da nadadeira anal 14; raios da nadadeira caudal 28 - 31; raios da nadadeira peitoral 10-12; raios da nadadeira pélvica 6.

Escamas pequenas, ciclóides. Corpo e cabeça inteiramente escamadas, exceto a superfície ventral anterior da cabeça. Escamação corporal que se estende sobre 25% da base da nadadeira caudal; nenhuma escama nas bases das nadadeiras dorsal e anal. Escamamento frontal com padrão E; Escalas E não sobrepostas medialmente. Séries longitudinais de escamas 35 - 36; séries transversais de escamas 8; escamas totais ao redor do pedúnculo caudal 16. Um ou dois pequenos órgãos de contato por escamas da região ventral da parte média do flanco nos machos; sem órgãos de contato nas nadadeiras.

Neuromastos cefálicos: supraorbital 3 + 3, parietal 1, rostral anterior 1, rostral posterior 1, infraorbital 1 + 6-7 + 1, pré-orbital 1, otic 1, pós-ótico 2, supratemporal 1, opercular mediano 1, opercular ventral 1, preopercular 2 + 4, mandibular 3 + 1, lateral mandibular 1, paramandibular 1. Linha lateral dividida em 2 cortes, seção anterior entre cabeça e vertical logo anterior ao final da nadadeira peitoral, seção posterior em série longitudinal logo abaixo da seção anterior, entre a vertical através do final da nadadeira peitoral e porção média da base da nadadeira caudal; 1 neuromasto por escama de linha lateral; 2 neuromastos na base da nadadeira caudal. Basihyal sub-triangular, maior largura cerca de Seis raios branchiostegal. Dermosfenótico presente. Processo ventral de póstemporal ausente Vértébras totais 35.

Coloração:

Machos - Lateral do corpo castanho-púrpuro claro com alternância de barras oblíquas de cor verde-amarelada e barras oblíquas rosa pálido, às vezes mal visíveis; dorso marrom claro; ventre hialino-amarelado, com amarelo mais forte na região da cabeça; lado da cabeça marrom claro a cinza escuro acima da linha horizontal através da margem ventral da órbita, amarelo claro abaixo do olho, amarelo esverdeado na porção ventral da região opercular; mandíbulas cinza claro; íris amarelo-alaranjado, com contorno azul escuro na parte posterior; nadadeira dorsal amarelo pálido, muitas vezes com três ou quatro estreitas e oblíquas listras marrons pálidas, com porção distal azul claro; nadadeira anal amarela, porção basal azul esverdeado, com margem distal cinza escura a preta; nadadeira caudal amarelo esverdeado a cinza amarelado escuro; faixa cinza escuro a preta nas margens dorsal e ventral da nadadeira, faixa ventral duas ou três vezes mais larga que a faixa dorsal, com faixa dorsal discreta; nadadeira peitoral amarelada hialina; nadadeira pélvica amarelada hialina.

Fêmeas – Lateral do corpo cinza escuro amarronzado, com pontos azuis claros; dorso marrom claro-dourado; ventre esbranquiçado, com amarelo pálido na região da cabeça; lado da cabeça castanho, região pós-orbital castanha escura, porção ventral do opérculo verde-amarelado dourado, suborbital amarelo claro; maxilares marrom claro acinzentados; íris marrom alaranjado, com contorno azulado na parte ínfero-posterior; nadadeira dorsal verde-azulada hialina com fileiras transversais de pequenas manchas cinzentas escuras; nadadeira anal amarelo, com porção basal azul claro; nadadeira caudal amarelo pálido-hialino, levemente azulada na base, com fileiras transversais de pontos castanhos escuros; mancha circular cinzenta escura na porção dorsal da base da nadadeira caudal, algumas vezes discreta; nadadeiras peitorais hialinas; nadadeiras pélvicas hialinas, levemente azuladas e amareladas na porção anterior.

Distribuição e habitat:

Exclusivamente encontrados em Mongaguá e Santos, os demais exemplares que compõe o trabalho foram obtidos na coleção do LBP, os quais foram encontrados na cidade de São Paulo. As saídas para coleta foram feitas em diferentes épocas do ano, das quais, após três tentativas frustradas encontramos dois exemplares da população de Mongaguá e apenas 3 exemplares da localidade-tipo de *Atlantirivulus santensis* (Fig.14 Anexo). Nos últimos anos, a área entre Santos e Mongaguá foi severamente modificada pela intensa expansão das cidades que compõe a Baixada Santista, tornando extinta a maioria das populações conhecidas de *A. santensis* da região. A área de localidade tipo foi amplamente ocupada por propriedades urbanas e rurais, próximas da Serra do Mar. Importante ressaltar que mesmo com evidente perda de habitat, *Atlantirivulus santensis* é considerada uma espécie não ameaçada, porque é erroneamente considerada como distribuída em todo litoral de São Paulo.

Tabela 5. Dados morfométricos de *Atlantirivulus santensis* – Baixada Santista/ São Paulo.

	Holótipo	Parátipo	Parátipo
	Macho	Macho n= 8	Fêmea n= 1
Comprimento padrão (mm)	24,8	20,0-31,3	23,7
Altura do corpo	20,2	15,9-20,9	19,3
Altura do pedúnculo caudal	13,4	11,3-15,1	11,4
Comprimento da Predorsal	76,3	73,0-80,9	74,9
Comprimento da Prepelvica	52,7	47,7-67,6	49,3
Comprimento da base da nadadeira dorsal	8,2	7,2-9,3	7,3
Comprimento da base da nadadeira anal	15,8	16-22,6	17,9
Comprimento da nadadeira Caudal	24,2	23,7-32,8	26,3
Comprimento da nadadeira peitoral	17,3	17,8-22,6	16,8
Comprimento da nadadeira pélvica	5,3	4,7-6,1	4,3
Comprimento da cabeça	21,5	21,7-25,4	22,9
Altura da cabeça	73,6	65,9-70,5	67,2
Largura da cabeça	82,8	77,3-81,4	70,9
Comprimento do focinho	25,8	25,1-28,3	26,3
Comprimento da mandíbula	20,2	16,9-21,8	19,2
Diâmetro do olho	35,0	33,1-39,5	34,6
Raios da nadadeira dorsal	8	8	8
Raios da nadadeira caudal	30	28-31	28
Raios da nadadeira anal	14	14	14
Raios da nadadeira pélvica	6	6	6-
Raios da nadadeira peitoral	12	12	12
Escamas na série longitudinal	35	35-36	36
Escamas na série transversal	8	8	8
Linhas horizontais de escamas ao redor do pedúnculo caudal	16	16	16
Vértebras	35	35	35

Atlantirivulus santensis - Sul

Figura 11-12, Tabela 6



Figura 11: Exemplar macho de *A. santensis* coletado em Peruíbe.



Figura 11: Exemplar fêmea de *A. santensis* coletado em Peruíbe.

Diferenças observadas em relação ao grupo da Baixada Santista (potenciais caracteres diagnósticos):

Mandíbula superior marrom claro, mandíbula inferior amarela (vs. mandíbulas cinza claro), Nadadeira dorsal amarelo-alaranjado pálido, muitas vezes com manchas marrons (vs. nadadeira dorsal amarelo pálido, muitas vezes com três ou quatro estreitas e oblíquas listras marrons pálidas, com porção distal azul claro), nadadeira caudal cinza amarelado escuro; faixa cinza escuro a preta nas margens dorsal e ventral da nadadeira, com larguras similares, ambas curtas fazendo com que sejam discretas (vs. nadadeira caudal amarelo esverdeado a cinza amarelado escuro; faixa cinza escuro a preta nas margens dorsal e ventral da nadadeira, faixa ventral duas ou três vezes mais larga que a faixa dorsal, com faixa dorsal discreta), nadadeira pélvica azulada, com margem anterior estreita e amarela (vs. nadadeira pélvica amarelada hialina).

Descrição:

Dados morfométricos aparecem na Tabela 6. Perfis dorsal e ventral fracamente convexos do focinho até extremidade posterior das bases dorsais e da nadadeira anal, aproximadamente em linha reta no pedúnculo caudal. Corpo delgado, sub-cilíndrico anteriormente, ligeiramente mais profundo que largo, comprimido posteriormente. Maior profundidade do corpo na vertical em frente à base da nadadeira pélvica. Mandíbulas curtas, focinho sem corte.

Nadadeiras dorsais e anais curtas, extremidades arredondadas, por vezes ligeiramente pontiagudas nos machos. Nadadeira caudal oval, curta. Nadadeira peitoral arredondada, margem posterior atingindo verticalmente em torno de 60% do comprimento entre a nadadeira peitoral e a base da pelve. Nadadeira pélvica pequena, oval, ponta atingindo entre a papila urogenital e a base do 2º raio anal nos machos, atingindo o ânus nas fêmeas; as bases da nadadeira pélvica medialmente nas proximidades. Origem da nadadeira dorsal na vertical na base do 11º raio da nadadeira anal, origem da nadadeira dorsal na altura da 25ª-26ª vértebra, origem da nadadeira anal na altura da 18ª-19ª vértebra. Raios da nadadeira dorsal 8; raios da nadadeira anal 13 - 14; raios da nadadeira caudal 30- 32; raios da nadadeira peitoral 14; raios da nadadeira pélvica 6.

Escamas pequenas, ciclóides. Corpo e cabeça inteiramente escamadas, exceto a superfície ventral anterior da cabeça. Escamação corporal que se estende sobre 25% da base da nadadeira caudal; nenhuma escama nas bases das nadadeiras dorsal e anal. Escamamento frontal com padrão E; Escalas E não sobrepostas medialmente. Séries longitudinais de escamas 31; séries transversais de escamas 8; escamas totais ao redor do pedúnculo caudal 16. Um ou dois pequenos órgãos de contato por escamas da região ventral da parte média do flanco nos machos; sem órgãos de contato nas nadadeiras.

Neuromastos cefálicos: supraorbital 3 + 3, parietal 1, rostral anterior 1, rostral posterior 1, infraorbital 1 + 6-7 + 1, pré-orbital 2, otic 1, pós-ótico 2, supratemporal 1, opercular mediano 1, opercular ventral 1, preopercular 2 + 4, mandibular 3 + 1, lateral mandibular 1, paramandibular 1. Linha lateral dividida em 2 cortes, seção anterior entre cabeça e vertical logo anterior ao final da nadadeira peitoral, seção posterior em série longitudinal logo abaixo da seção anterior, entre a vertical através do final da nadadeira peitoral e porção média da base da nadadeira caudal; 1 neuromasto por escama de linha lateral; 2 neuromastos na base da nadadeira caudal. Seis raios branchiostegal. Dermosfenótico presente. Processo ventral de póstemporal ausente. Vértébras totais 35.

Coloração:

Machos - Lado do corpo castanho-púrpuro claro com alternância de barras oblíquas de cor verde-amarelada e barras oblíquas rosa pálido, às vezes mal visíveis; dorso marrom claro; ventre hialino-amarelado, com amarelo mais forte na região da cabeça; lado da cabeça marrom claro a cinza escuro acima da linha horizontal através da margem ventral da órbita, amarelo claro abaixo do olho, amarelo levemente esverdeado na porção ventral da região opercular; mandíbula superior marrom claro, mandíbula inferior amarela; íris amarelo-alaranjado, com contorno azul escuro na parte antero-inferior; nadadeira dorsal amarelo-alaranjado pálido, muitas vezes com manchas marrons; nadadeira anal esverdeada, porção basal azul, com margem distal cinza escura a preta; nadadeira caudal cinza amarelado escuro; faixa cinza escuro a preta nas margens dorsal e ventral da nadadeira, com larguras similares, ambas curtas fazendo com que sejam discretas; nadadeira peitoral amarelada hialina; nadadeira pélvica azulada, com margem anterior estreita e amarela.

Fêmeas - Lateral do corpo cinza escuro amarronzado, com pontos azuis claros; dorso marrom claro-dourado; ventre esbranquiçado, com amarelo pálido na região da cabeça; lado da cabeça castanho, região pós-orbital castanha escura, porção ventral do opérculo amarelo dourado, suborbital amarelo claro; maxilares marrom claro acinzentados; íris marrom alaranjado, com contorno azulado na parte ínfero-posterior; nadadeira dorsal hialina levemente verde-azulada com fileiras transversais de pequenas manchas cinzentas escuras; nadadeira anal amarelado esverdeado, com porção basal azul claro e distal marrom acinzentado; nadadeira caudal hialina amarelada, levemente azulada na base, com fileiras transversais de pontos castanhos escuros; mancha circular cinzenta escura na porção dorsal da base da nadadeira caudal, algumas vezes discreta; nadadeiras peitorais hialinas; nadadeiras pélvicas hialinas, levemente azuladas e amareladas na porção anterior.

Distribuição e habitat:

As populações do sul foram coletadas em Itanhaém, Peruíbe e Pedro de Toledo em riachos rasos, dentro ou próximos a densas florestas. Nestes habitats, a água era de cor amarela clara (chá) e o fundo do habitat era formado por areia ou sedimento lodoso, rico em matéria orgânica.

Tabela 6. Dados morfométricos de *Atlantirivulus santensis* - Litoral Sul.

	Holótipo	Parátipo	Parátipo
	Macho	Macho n= 9	Fêmea n= 2
Comprimento padrão (mm)	32,6	22,5-32,2	20,0-27,7
Altura do corpo	21,3	15,5-19,3	18,1-21,2
Altura do pedúnculo caudal	13,6	10,6-13,5	12,2-14,0
Comprimento da Predorsal	75,3	70,3-78,5	70,3-76,6
Comprimento da Prepelvica	53,6	45,5-52,08	52,4-54,5
Comprimento da base da nadadeira dorsal	7,3	5,0-8,8	6,2-8,8
Comprimento da base da nadadeira anal	18,8	15,2-20,74	13,7-18,7
Comprimento da nadadeira Caudal	20,9	23,0-29,9	21,1-27,9
Comprimento da nadadeira peitoral	16,7	15,4-20,3	16,0-18,6
Comprimento da nadadeira pélvica	5,9	6-7,88	5,9-7,8
Comprimento da cabeça	23,6	19,8-25,2	23,2-23,5
Altura da cabeça	71,4	60-71	62,1-66,4
Largura da cabeça	81,4	62,5-89,0	79,6-80,7
Comprimento do focinho	26	25,1-32,9	26,7-29,8
Comprimento da mandíbula	20,5	15,8-20,9	16,5-20,4
Diâmetro do olho	35,5	31,1-42	31,1-39,8
Raios da nadadeira dorsal	8	8	8
Raios da nadadeira caudal	31	30-32	30
Raios da nadadeira anal	14	13-14	14
Raios da nadadeira pélvica	6	6	6
Raios da nadadeira peitoral	14	14	14
Escamas na série longitudinal	31	31	31
Escamas na série transversal	8	8	8
Linhas horizontais de escamas ao redor do pedúnculo caudal	16	16	16
Vértebras	35	35	35

5. Discussão

5.1 Taxonomia

Em Costa (2008), o autor redescreve a espécie *Atlantirivulus santensis* fazendo uso de populações que se distribuem de Ubatuba-SP até Paranaguá-PR. Ao encontrar em nosso trabalho, diferentes linhagens de *A. santensis*, de Norte de SP ao Sul de SP, fica notável a importância de aplicar a um conjunto de dados de espécies candidatas uma abordagem taxonômica integrativa, o que inclui diferentes ferramentas e análises moleculares como PTP, ABGD, complementares as análises morfológicas para delimitação de espécies (Kekkonen *et al.*, 2014, Costa-Silva *et al.*, 2015).

Ao considerar indivíduos pertencentes a mesma espécie, aqueles que apresentem divergências das sequências de COI menores que 2% (Ward *et al.*, 2005), nota-se que as populações do Litoral Norte e Sul (Fig. 5 - Grupo azul e verde, respectivamente), apresentaram distância muito maior do que esta porcentagem de referência, sendo distantes 9% (Tabela 2), possivelmente representam diferentes espécies. O mesmo segue para as populações do Litoral Norte, que representam uma linhagem, com uma divergência genética de 8,0% em relação as populações da Baixada Santista. Enquanto as da Baixada Santista e Litoral Sul se encontram mais próximas entre si (3%), podendo não se tratar de uma possível nova espécie, e sim de apenas diferentes linhagens. Importante ressaltar que diferentes estudos sugerem valores elevados para uma divergência genética intraespecífica acima de 2%, os quais poderiam indicar novas espécies ou mesmo crípticas dentro do grupo avaliado (Pereira *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2016, Camelier *et al.*, 2018).

Por fim, ao comparar as distâncias genéticas de *A. ribeirensis* e *A. simplicis*, essas espécies são validadas molecularmente, até então não possuíam identificação molecular. Además, reforçamos as distintas linhagens de *A. santensis*, pois as distâncias de algumas linhagens se comparam ou até mesmo superam as distâncias entre uma linhagem e uma espécie do grupo externo. Por exemplo, Litoral Sul x *A. ribeirensis* (7%), enquanto Litoral Norte x Litoral Sul (9%), sendo o Litoral Norte tão distante do Litoral Sul, quanto o Litoral Sul é distante da espécie limite Norte, *A. simplicis*. Destaca-se que o Litoral Norte não deixa de ser distante geneticamente (11%) da espécie limite Norte, *A. simplicis*, mesmo apresentando a menor distância geográfica entre as linhagens de *A. santensis*.

Em linhas gerais, os resultados das análises ABGD e PTP também indicam que *A. santensis* pode

ser um nome utilizado para abrigar mais de uma linhagem e recuperam os três grandes grupos mencionados anteriormente. Portanto, de acordo com estas análises foram reconhecidas três linhagens distintas e bem delimitadas, distribuídas ao longo dos riachos costeiros situados na Mata Atlântica do Estado de São Paulo.

5.2 Biogeografia

Para um melhor entendimento dos resultados moleculares apresentados é importante compreender as relações de grupos irmãos dos gêneros *Atlantirivulus* e *Melanorivulus* encontradas em Costa (2003). O primeiro apresentando alta riqueza de espécies em regiões costeiras (Costa, 2011), enquanto o segundo apresenta alta riqueza de espécies no Escudo Cristalino (Costa 2005), corroborando com a hipótese de que *A. santensis* seja um exemplo do “padrão biogeográfico B” proposto por Ribeiro (2006). De acordo com ele, os táxons incluídos neste padrão apresentam uma história biogeográfica intermediária, resultante do contínuo intercâmbio faunístico entre rios de planalto do escudo cristalino brasileiro e rios costeiros do leste do Brasil ao longo do Terciário. Assim, eventos de captura de cabeceira e recuo do mar teriam permitido a dispersão de um ancestral comum entre as drenagens costeiras, que estariam potencialmente conectadas ao longo da plataforma continental, a ascensão do nível do mar teria promovido a separação destas drenagens e o consequente isolamento das suas populações, possibilitando assim, eventos de especiação (Carvalho *et al.*, 2015).

As pronunciadas atividades tectônicas nos períodos Paleogeno, Neogeno e Quaternário, na região da Serra do Mar, resultaram num recuo erosivo da margem leste da plataforma continental com a captura de rios de planalto, que fluíam para o interior do Escudo do Brasil Central, passando assim a atuar como tributários atlânticos menores (Almeida & Carneiro, 1998; Riccomini *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2006). Neste processo, que ocorreu várias vezes na formação do escudo brasileiro do Sudeste, porções dos afluentes de um rio em uma bacia hidrográfica são capturados por bacias adjacentes, sendo responsáveis pela transferência de estoques ancestrais de terras altas, resultando em populações isoladas e geneticamente diversas (Ribeiro *et al.*, 2006; Roxo *et al.*, 2014; Thomaz *et al.*, 2015b, Souza *et al.*, 2018).

Primeiramente registrada por Menezes (1972), devido a semelhanças faunísticas, a hipótese da história biogeográfica comum menciona a possibilidade de que os principais rios costeiros do leste

brasileiro herdaram grande parte de sua ictiofauna da bacia do rio Paraná. Os rios Tietê e Alto Paraíba do Sul costumavam compor uma drenagem que corria em direção ao Oceano Atlântico, mas, devido a processos geológicos / geomorfológicos na região da Serra do Mar, essa drenagem foi dividida, em uma porção hoje correspondente à parte superior do rio Tietê e outra ao curso superior do rio Paraíba do Sul (Ab'Saber, 1957). Langeani (1989) reconheceu que a fauna de peixes que habita as cabeceiras do atual Tietê é mais parecida com as comunidades de peixes que habitam rios costeiros, mas apontou a falta de dados da composição da ictiofauna do Alto Paraíba do Sul e outras drenagens adjacentes ao alto Tietê. Atualmente, já existem diversos estudos (Montoya-Burgos, 2003; Ribeiro *et al.*, 2006; Roxo *et al.*, 2012) que contribuíram para um melhor conhecimento dessas drenagens. O presente trabalho levanta dados que também corroboram com essa hipótese ao reconhecer diferentes composições de linhagens distribuídas pelas drenagens costeiras na região Sudeste do Brasil.

É de extrema importância o reconhecimento da biodiversidade de riachos, em especial os costeiros desta região, por se tratar da mais desenvolvida e também mais impactada do país (Agostinho, 2005). Thomaz *et al.*, (2015b) propuseram o uso de paleodrenagens para a conservação de espécies e diversidade genética. Ao comparar nossos resultados com a estruturação das paleodrenagens, observamos que na área de número 1 encontramos *Atlantirivulus simplicis*, assim como nas áreas 2, 3 e 4 populações da linhagem Litoral Norte; 5 – Baixada Santista / São Paulo; 6 Litoral Sul e 7 *Atlantirivulus ribeirensis* (Figura 13 do anexo).

O agrupamento dessas linhagens está condizente com a distribuição dessas paleodrenagens. Com excessão da população de Mongaguá, que se encontra na paleodrenagem 6, que também abrange Itanhaém e Peruíbe, mas está molecularmente agrupada com Santos e São Paulo, o que evidencia um evento de captura de cabeceira do Alto Tietê para Mongaguá-Santos. Esperava-se que as populações que compartilham a mesma paleodrenagem seriam geneticamente mais próximas, graças ao fluxo gênico, mas não é isso que acontece, Mongaguá faz parte do cluster Baixada Santista / São Paulo e não Litoral Sul.

6. Conclusão

Os resultados das análises taxonômicas integrativas (morfológicas e moleculares) foram fundamentais para o reconhecimento de duas novas espécies de *Atlantirivulus* no estado de São Paulo. Entender o histórico biogeográfico do grupo se mostrou essencial para reforçar as evidências que levaram aos isolamentos das linhagens e consequente especiação.

Atualmente, *A. santensis* é classificado como “não ameaçado” (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, 2014). Com o reconhecimento de duas novas espécies, o estado de conservação da espécie precisará ser reavaliado, devido a redução da distribuição desta espécie, agora mais restrita.

Referências

- AB' SABER, N.A. O problema das conexões antigas e da separação da drenagem do Paraíba e Tietê. *Bol. Paul. Geogr.* 26:38-49, 1957.
- AGNÈSE, J. F., ZENTZ, F., LEGROS, O. & SELLOS, D. Phylogenetic relationships of the killifish species of the subgenus *Chromaphyosemion* (Radda, 1971) in West Africa, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 332–346, 2006.
- AGOSTINHO, AA., THOMAZ, SM., GOMES, LC. Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. *Conserv. Biol.*, vol. 19, no.3, p. 646-652, 2005.
- ALMEIDA F. F. M.; CARNEIRO C. D. R. Origem e Evolução da Serra do Mar. *Revista Brasileira de Geociências*, 28(2), 135-150, 1998.
- AVISE, J.C., *Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press*, 464p. Cambridge. 2000.
- AVISE J.C. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. 2nd Ed. *Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, EUA*. 16, 2004.
- BARRACLOUGH T.G., HERNIOU E. Why do species exist? Insights from sexuals and asexuals. *Zoology*. 106:275–282, 2003.
- BICKFORD, D., LOHMAN, D. J., SODHI, N. S., NG, P. K.L., MEIER, R., WINKER, K., INGRAM, K. K. & DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22: 148–155, 2007.

- BREMER, K.. The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution*, 42: 795-803, 1988.
- CAMELIER P., MENEZES N. A., COSTA-SILVA G. J., OLIVEIRA C. Molecular and morphological data of the freshwater fish *Glandulocauda melanopleura* (Characiformes: Characidae) provide evidences of river captures and local differentiation in the Brazilian Atlantic Forest. *PLoS ONE* 13(3): e0194247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194247>. 2018.
- CARVALHO, D., D. A. A. OLIVEIRA, P. S. POMPEU, C. G. LEAL, C. OLIVEIRA & R. HANNER. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial DNA*, 22(S1): 80–86. 2011.
- CARVALHO, P. H., LIMA, S. M. Q., ZAWADZKI, C. H., OLIVEIRA, C. & DE PINNA, M. Phylogeographic patterns in suckermouth catfish *Hypostomus ancistroides* (Loricariidae): dispersion, vicariance and species complexity across a Neotropical biogeographic region. *Mitochondrial DNA. The Journal of DNA Mapping, Sequencing, and Analysis Part A*, 27:5, 3590-3596. 2015.
- CASTRO R.M.C. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais.. In: Caramaschi EP, Mazzoni R, Peres-Neto PR (eds.), *Ecologia de Peixes de Riachos. Série Oecologia Brasiliensis*. PPGE-UFRJ. Rio de Janeiro, Brasil. 6: 139-155, 1999.
- .
- COSTA, W. J. E. M. Systematics and distribution of the neotropical annual fish genus *Trigonectes* (Cyprinodontiformes, Rivulidae), with description of two new species. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*. 2(1): 135-150, 1990.
- COSTA, W. J. E. M. & BRASIL, G. C. Description of a new species of *Rivulus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from the coastal plains of eastern Brazil. - *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 1: 379-383, 1991.
- COSTA, W. J. E. M.; NIELSEN, D. T. B. A new genus and species of annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from the Araguaia basin, central Brazil. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*. 1997.
- COSTA, W.J.E.M. The neotropical annual fish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, taxonomic revision and biogeography. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 12: 333–383, 2001.
- COSTA, W. J. E. M. Family Rivulidae (South American annual fishes) In: Reis, R. E., Kullander, S. O., Ferraris Jr., C. J. (Eds.), *Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Edipucrs, Porto Alegre, 526-548, 2003.
- COSTA, W. J. E. M. A new killifish genus and species from the coastal plains of north-eastern (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Zootaxa*, 642: 1-10, 2004a.

- COSTA, W. J. E. M. Relationships and redescription of *Fundulus brasiliensis* Valenciennes (Cyprinodontiformes: Rivulidae) with a description of a new genus and notes on the classification of the Aplocheiloidei. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*. 15: 105-120, 2004b.
- COSTA, W. J. E. M. Seven new species of the killifish genus *Rivulus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae), from the Paraná, Paraguay and upper Araguaia river basins, central Brazil. *Neotropical Ichthyology* 3: 69-82, 2005.
- COSTA, W. J.E.M. The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa*, 1213: 1–162, 2006a.
- COSTA, W. J. E. M. *Rivulus Illuminatus*, a new Killifish from the serra dos Caiap s, upper rio Paraná basin, Brazil (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 18: 193-198, 2007.
- COSTA, W. J.E.M. Taxonomy of the plesiolebiasine killifish genera *Pituna*, *Plesiolebias* and *Maratecoara* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae), with descriptions of nine new species. *Zootaxa*, 1410: 1–41, 2007a.
- COSTA W. J. E. M. *Atlantirivulus*, a new subgenus of the genus *Rivulus* from the eastern Brazilian coastal plains (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae) *Vertebrate Zoology*, 58: 45-48, 2008a.
- COSTA W. J. E. M. Redescription of *Rivulus santensis* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae), a killifish species from the Atlantic forest of southeastern Brazil. *Aqua, International Journal of Ichthyology*, 14(4): 195-202, 2008b.
- COSTA, W. J.E.M. Species delimitation among populations of the eastern Tanzanian seasonal killifish *Nothobranchius korthausae* (Cyprinodontiformes: Nothobranchiidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 20: 111–126, 2009.
- COSTA, W. J. E. M., Phylogenetic position and taxonomic status of *Anablepsoides*, *Atlantirivulus*, *Cynodonichthys*, *Laimosemion* and *Melanorivulus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 22(3): 233-249, 2011.
- COSTA, W. E. J. M. Historical biogeography of aplocheiloid killifishes (Teleostei: Cyprinodontiformes). *Vertebrate Zoology* 63:139-154, 2013.
- COSTA, W. J. E. M. Relationships and taxonomy of the killifish genus *Rivulus* (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei: Rivulidae) from the Brazilian Amazonas river basin, with notes on historical ecology. *Aqua Journal of Ichthyology and Aquatic Biology*, 11: 133-175, 2006a.
- COSTA, W. J. E. M. Four new species of the genus *Atlantirivulus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from the Brazilian Atlantic Forest. *Vertebrate Zoology*, 64 (1): 9–21, 2014.
- COSTA-SILVA GJ, RODRIGUEZ MS, ROXO FF, FORESTI F, OLIVEIRA C. Using Different

- Methods to Access the Difficult Task of Delimiting Species in a Complex Neotropical Hyperdiverse Group. *PLoS ONE* 10(9): e0135075, 2015.
- DESALLE, R. Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: response to Rubinoff. *Conservation Biology*, v. 20, n. 5, p. 1545–1547, 2006.
- DRUMMOND A.; RAMBAUT A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol.*, 8(7): 214, 2007.
- FARRIS, J. S.; KALLERSJO, M., KLUGE, A. G.; BULT, C. Constructing a significance test for incongruence. *Syst. Biol.*, 44: 570-572, 1995.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791, 1985.
- FONTANETO, D., E. HERNIOU, C. BOSCHETTI, M. CAPRIOLI, G. MELONE, C. RICCI & T. G. BARRACLOUGH. Independently evolving species in asexual bdelloid rotifers. *PLoS Biology*, 5:e87. PMID: 17373857. 2007.
- FRANKHAM R.; BALLOU J. D.; BRISCOE D. A. Fundamentos de genética da conservação. (Ed). *Sociedade Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, Brasil, 2008.
- FRICKE, R., ESCHMEYER, W. N. & FONG, J. D. SPECIES BY FAMILY/SUBFAMILY. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Electronic version accessed 20 Setembro , 2018.
- FUJISAWA T., BARRACLOUGH T.G. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic Biology*, 62, 707–724. 2013.
- GALETTI JR P. M.; RODRIGUES F. P.; SOLÉ-CAVA A. M.; MIYAKI A. M.; CARVALHO D. E.; VEASEY E.; SANTOS E. A.; FARIAS F. R.; VIANNA I. P.; OLIVEIRA J. A.; WEBER L. R.; ALMEIDA-TOLEDO L. F.; FRANCISCO M. R.; REDONDO R. A. F.; SICILIANO S.; DEL LAMA S. N.; FREITAS T. R. O.; MOLINA W. F. Genética da conservação na biodiversidade brasileira. In: Frankham R., Ballou J. D, Briscoe D. A (eds.), *Fundamentos de Genética da Conservação*. Editora SBG. Ribeirão Preto, Brasil. 199-229, 2008.
- GRAÇA, W. J.; PAVANELLI C. S. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. Maringá: *EDUEM*, 308, 2007.
- HEBERT, P. D. N, A. CYWINSKA, S. L. BALL, J. R. WAARD. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society*, 270: 313-322. 2003.
- HEBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W. Ten species

- in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 101, p. 14812-14817, 2004b.
- HIRSCHMANN, A., MALABARBA, L. R., THOMAZ, A. T. & FAGUNDES, N. J. R. Riverine habitat specificity constrains dispersion in a Neotropical fish (Characidae) along Southern Brazilian drainages. *Zoologica Scripta*, 44(4): 374-382. 2015.
- HOEDEMAN, J. J. The frontal scalation pattern in some groups of tooth carps. *Bulletin of Aquatic Biology* 1: 23-28, 1958.
- HUBER J. H. Reappraisal of the Phylogeny of *Rivulus* and its Allied Focused on External Characters. *Killi-Data Series*, 9-25, 2012.
- IVANOVA, N. V., ZELMAK, T.S., HANNER, R.H. & HEBERT, P.D.N. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7, 544–548, 2007.
- KEKKONEN, MARI, AND PAUL D N HEBERT. DNA Barcode-Based Delineation of Putative Species: Efficient Start for Taxonomic Workflows. *Molecular Ecology Resources* 14.4: 706–715. 2014.
- 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., MENTJIES, P., & DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649, 2012.
- KULLMANN, H. AND KLEMME, B. Female mating preference for own males on species and population level in Chromaphyosemion killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae). *Zoology*, 110: 377–386, 2007.
- KUMAR S; TAMURA K.; NEI M. mega3: integrated software for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics*, 5: 150-163, 2004.
- LANGEANI, F. Ictiofauna do Alto Curso do rio Tietê (SP): Taxonomia. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.
- LÉVEQUE, C.; OBERDORFF, T.; PAUGY, D.; STIASSNY, M. L. J. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595: 545-567, 2008.
- LIMA, S.M., BERBEL-FILHO, W.M., ARAÚJO, T.F., LAZZAROTTO, H., TATARENKOV, A. & AVISE, J.C. Headwater Capture Evidenced by Paleo-Rivers Reconstruction and Population Genetic Structure of the Armored Catfish (*Pareiorhaphis garbei*) in the Serra do Mar Mountains of Southeastern Brazil. *Frontiers in Genetics*, 2017.
- LIPSCOMB, D.; PLATNICK, N.; WHEELER, Q. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends Ecol. Evol.*, v. 18, p. 65–66, 2003.

- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H., K. O. WINEMILLER & R. L. HONEYCUTT. Multilocus phylogeny and rapid radiations in Neotropical cichlid fishes (Perciformes: Cichlidae: Cichlinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55: 1070-1086, 2010.
- MELO, B. F., OCHOA L. E., VARI R. P. & OLIVEIRA C.. Cryptic species in the Neotropical fish genus *Curimatopsis* (Teleostei, Characiformes). *Zoologica Scripta*, doi:10.1111/zsc.12178. 2016.
- MENEZES, N.A. Distribuição e origem da fauna de peixes de água doce das grandes bacias fluviais do Brasil. In Comissão Internacional da Bacia Paraná/Uruguai. Poluição e Piscicultura, Faculdade e Saúde Pública da USP e Instituto de Pesca, São Paulo, p.79-108. 1972.
- MENEZES N. A.; RIBEIRO A. C.; WEITZMAN S.; TORRES R. A. Biogeography of Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae) revisited: phylogenetic patterns, historical geology and genetic connectivity. *Zootaxa*, 1726: 33-48, 2008.
- MONTOYA-BURGOS, J. I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Mol. Ecol.* 12:1855–1867, 2003.
- MORITZ C.; PATTON J. L.; SCHNEIDER C. J.; SMITH T. B. Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 31: 533-563, 2000.
- MURPHY W. J.; THOMERSON J. E.; COLLIER G. E. Phylogeny of the neotropical killifish family Rivulidae (Cyprinodontiformes, Aplocheiloidei) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular and Phylogenetic Evolution*, 13: 289-301, 1999.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B. & KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 408: 853-858, 2000.
- PEREIRA, L. H. G., R. HANNER, F. FORESTI & C. OLIVEIRA. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetic*, 14: 20. 2013.
- PEREIRA T. L., SANTOS U., SCHAEFER C. E., SOUZA G. O. & PAIVA S. R.. Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. *J Biogeogr* 40: 905–914. 2013.
- PONS J.; BARRACLOUGH T. G. GOMEZ-ZURITA J.; CARDOSO A.; DURAN D. P.; HAZELL S. & VOGLER A. P. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic biology*, 55(4): 595-609, 2006.
- PONZETTO, J. M. *Relações filogenéticas e filogeografia molecular das espécies de peixes anuais do gênero *Simpsonichthys* (Cyprinodontiformes: Rivulidae)*. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP. (Dissertação - mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular), 2012.

- POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818, 1998.
- PUILLANDRE, N.; LAMBERT, A.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular ecology*. 21. 1864-77. 10., 2011.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing, 2013.
- REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARI JR., C. J. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. *Edipurcs*, Porto Alegre, Brasil, 729, 2003.
- REIS R. E., ALBERT J. S., DI DARIO F., Mincarone M. M., Petry P., Rocha L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. *Ecology and Evolution*. *Hoboken: Wiley-blackwell*, 89(1): 12-47, 2016.
- RIBEIRO A. C.; LIMA F.C. T.; RICCOMINI C.; MENEZES N. A. Fishes of the Atlantic Rainforest of Boracéia: testimonies of the Quaternary fault reactivation within a Neoproterozoic tectonic province in Southeastern Brazil. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 17 (2): 157-164, 2006.
- RIBEIRO, A. C. 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. *Neotrop. Ichthyol.* 4: 225-246, 2006.
- RICCOMINI C. L.; SANT'ANNA L. G.; FERRARI A. L. Evolução geológica do rift continental do sudeste do Brasil. In: Mantesso-Neto V, Bartorelli A, Carneiro CDR, Brito-Neves BB (Eds.). *Geologia do continente Sul-Americano: Evolução da obra de Fernando Flávio Marques de Almeida*. Editora Beca, São Paulo, Brasil. 383-405, 2004.
- ROSENBERG, N. A. Statistical tests for taxonomic distinctiveness from observations of monophyly. *Evolution*, v. 61, p. 317–323, 2007.
- ROXO F. F., ZAWADZKI C. H., ALEXANDROU M. A., COSTA SILVA G.J., CHIACHIO M.C., FORESTI F., OLIVEIRA C. Evolutionary and biogeographic history of the subfamily Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Ecology and Evolution*. *Hoboken: Wiley-blackwell*, 10(2): 2438-2449, 2012.
- ROXO, F. F., L. E. OCHOA, G. J. COSTA-SILVA & C. OLIVEIRA. Species delimitation in *Neoplecostomus* (Siluriformes: Loricariidae) using morphologic and genetic approaches. *DNA Barcodes*, 3: 110-117. 2015.
- ROXO, F. F., J. S. ALBERT, G. S. C. SILVA, C. H. ZAWADZKI, F. FORESTI & C. OLIVEIRA. Molecular Phylogeny and Biogeographic History of the Armored Neotropical Catfish Subfamilies Hypoptopomatinae, Neoplecostominae and Otothyrinae (Siluriformes: Loricariidae). *PLoS One*, 9(8): e105564. doi:10.1371/journal.pone.0105564. 2014.

- SABAJ PÉREZ, M. H. Standard symbolic codes for institutional resource collections in herpetology and ichthyology: an Online Reference. Version 5.0 (22 September 2014). Acessível em: <http://www.asih.org/>, *American Society of Ichthyologists and Herpetologists*, Washington, DC, 2014.
- SERRA J. P.; CARVALHO F. R.; LANGEANI F. Ictiofauna do rio Itatinga in Parque das Neblinas, Bertioga, Estado de São Paulo: composition and biogeography. *Biota Neotropica*, 7(1): 131-136, 2007.
- SOUZA C. S., COSTA-SILVA G. J., ROXO F. F., FORESTI F., OLIVEIRA C. Genetic and Morphological Analyses Demonstrate That *Schizolecis guntheri* (Siluriformes: Loricariidae) Is Likely to Be a Species Complex. *Frontiers in Genetics* 9:69 ,2018.
- SONNENBERG, R. Description of three new species of the genus *Chromaphysemon* Radda, 1971 (Cyprinodontiformes: Nothobranchiidae) from the coastal plains of Cameroon with a preliminary review of the *Chromaphysemon splendopleure* complex. *Zootaxa*, 1591: 1–38, 2007.
- SCHÖNROGGE, K., BARR, B., WARDLAW, J. C., NAPPER, E., GARDNER, M. G., BREEN, J., ELMES, G. W. & THOMAS, J. A. When rare species become endangered: cryptic speciation in myrmecophilous hoverflies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 75: 291–300, 2002.
- KUMAR S., STECHER G., TAMURA K.. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 33, Issue 7, 1, Pages 1870–1874, 2016. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- TAMURA K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9 (4): 678–687, 1992.
- THOMAZ AT, MALABARBA LR, BONATTO SL, KNOWLES LL. 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. *J Biogeogr* [serial on the internet].1-13, 2015b. Available from: <https://doi.org/10.1111/jbi.12597>
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22: 4673-4680, 1994.
- TORRES R. A., RIBEIRO J. The remarkable species complex *Mimagoniates microlepis* (Characiformes: Glandulocaudinae) from the Southern Atlantic Rain forest (Brazil) as revealed by molecular systematic and population genetic analyses. *Hydrobiologia*, 617: 157-170, 2008.
- TSCHÁ M. K., BACHMANN L., ABILHOA V. & BOEGER W. A.. Past connection and isolation of catchments: The sea-level changes affect the distribution and genetic variability of coastal freshwater fishes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 190, 31-39. 2017.
- VARI, R. P. The Curimatidae, a Lowland Neotropical fish family (Pisces: Characiformes): distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. In: Vanzolini, P. E. & Heyer, W. R. (Eds.). *Proceedings*

- of a workshop on Neotropical distribution patterns. Rio de Janeiro, *Academia Brasileira de Ciências*, 343-377. 1988.
- WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST, P. R.; HEBERT, P. D. DNA barcode Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 360, n. 1462, p. 1847-57, Oct 29. 2005.
- WARD, R. D. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular Ecology Resources*, v. 9, p. 1077-1085, 2009.
- WATERS J. M.; ESA Y. B.; WALLIS G. P. Genetic and morphological evidence for reproductive isolation between sympatric populations of Galaxias (Teleostei: Galaxiidae) in South Island, New Zealand. *Biological Journal of the Linnean Society*, 73: 287-298, 2001.
- WATERS, J. M., ROWE, D. L., APTE, S., KING, T. M., WALLIS, G. P., ANDERSON, L., NORRIS, R. J., CRAW, D. & BURRIDGE, C. P. Geological dates and molecular rates: rapid divergence of rivers and their biotas. *Systematic Biology*, 56: 271-28. 2007.
- WILDEKAMP, R. H., SHIDLOVSKIY, K. M. & WATTERS, B. R. Systematics of the *Nothobranchius melanospilus* species group (Cyprinodontiformes: Nothobranchiidae) with description of two new species from Tanzania and Mozambique. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 20: 237-254, 2009.
- WILSON, D.E., REEDER, D.M. Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference, 3ª edição. *Johns Hopkins University Press*, Baltimore, Maryland, 2.142 pp., 2 volumes, 2005.
- XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity* 92: 371-373, 2001.
- XIA, X., Z. XIE, M. SALEMI, L. CHEN, Y. WANG. An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26:1-7, 2003.
- XIA, X. AND LEMEY, P. Assessing substitution saturation with DAMBE. Philippe Lemey, Marco Salemi and Anne-Mieke Vandamme, eds. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*. 2nd edition, *Cambridge University Press*, p. 615-630, 2009.
- ZAMUDIO K. R.; ROBERTSON J. M.; CHAN L. M.; SAZIMA I. Population structure in the catfish *Trichogenes longipinnis*: drift offset by asymmetrical migration in a tiny geographic range. *Biological Journal of the Linnean Society*, 97: 259-274, 2009.
- ZHANG J, KAPLI P, PAVLIDIS P, STAMATAKIS A. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29, 2869-2876., 2013.

7. Apêndice

Lista do material (espécimes) examinado no presente estudo: abreviatura institucional (LBP) com número de tombo de cada exemplar.

Tecido	Voucher	Espécie	Localidade	Coordenadas Geográficas
LBP 25423	88471	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Ubatumirim, Ubatuba-SP	23°20'6.63"S 44°53'18.26"O
LBP 25424	88472	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Ubatumirim, Ubatuba-SP	23°20'6.63"S 44°53'18.26"O
LBP 25424	88477	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Itamambuca, Ubatuba-SP	24°12'3.93"S 46°50'5.67"O
LBP 25424	88478	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Itamambuca, Ubatuba-SP	24°12'3.93"S 46°50'5.67"O
LBP 25424	88484	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Itamambuca, Ubatuba-SP	24°12'3.93"S 46°50'5.67"O
LBP 25424	88486	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Itamambuca, Ubatuba-SP	24°12'3.93"S 46°50'5.67"O
LBP 25424	88487	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Itamambuca, Ubatuba-SP	24°12'3.93"S 46°50'5.67"O
LBP 25425	88488	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia do Lázaro, Ubatuba-SP	23°30'6.54"S 45° 8'12.58"O
LBP 25425	88493	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia do Lázaro, Ubatuba-SP	23°30'6.54"S 45° 8'12.58"O
LBP 25432	88532	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Maresias - SP	23°47'29.88"S 45°33'15.42"O
LBP	88533	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Maresias - SP	23°47'29.88"S

25432				45°33'15.42''O
LBP 25432	88534	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Maresias - SP	23°47'29.88''S 45°33'15.42''O
LBP 25432	88535	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Maresias - SP	23°47'29.88''S 45°33'15.42''O
LBP 25432	88536	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Maresias - SP	23°47'29.88''S 45°33'15.42''O
LBP 25432	88537	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Maresias - SP	23°47'29.88''S 45°33'15.42''O
LBP 25432	88538	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Maresias - SP	23°47'29.88''S 45°33'15.42''O
LBP 25432	88539	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Maresias - SP	23°47'29.88''S 45°33'15.42''O
LBP 25432	88540	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Maresias - SP	23°47'29.88''S 45°33'15.42''O
LBP 25426	88497	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Guaratuba - Bertioga - SP	23°43'53.45''S 45°50'23.65''O
LBP 25426	88498	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Guaratuba - Bertioga - SP	23°43'53.45''S 45°50'23.65''O
LBP 25426	88499	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Guaratuba - Bertioga - SP	23°43'53.45''S 45°50'23.65''O
LBP 25426	88500	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Guaratuba - Bertioga - SP	23°43'53.45''S 45°50'23.65''O
LBP 25426	88501	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Guaratuba - Bertioga - SP	23°43'53.45''S 45°50'23.65''O
LBP 25426	88502	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Guaratuba - Bertioga - SP	23°43'53.45''S 45°50'23.65''O

LBP 25426	88503	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Guaratuba - Bertioga - SP	23°43'53.45"S 45°50'23.65"O
LBP 25426	88504	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Guaratuba - Bertioga - SP	23°43'53.45"S 45°50'23.65"O
LBP 25426	88505	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Guaratuba - Bertioga - SP	23°43'53.45"S 45°50'23.65"O
LBP 25426	88506	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Guaratuba - Bertioga - SP	23°43'53.45"S 45°50'23.65"O
LBP 25426	88508	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Guaratuba - Bertioga - SP	23°43'53.45"S 45°50'23.65"O
LBP 25426	88509	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Guaratuba - Bertioga - SP	23°43'53.45"S 45°50'23.65"O
LBP 25426	88510	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Guaratuba - Bertioga - SP	23°43'53.45"S 45°50'23.65"O
LBP 25426	88512	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Praia de Guaratuba - Bertioga - SP	23°43'53.45"S 45°50'23.65"O
LBP	40281	<i>Atlantirivulus santensis</i>	São Paulo-SP	23°46'16.80"S 46°45'56.40"O
LBP	40282	<i>Atlantirivulus santensis</i>	São Paulo-SP	23°46'16.80"S 46°45'56.40"O
LBP	40283	<i>Atlantirivulus santensis</i>	São Paulo-SP	23°46'16.80"S 46°45'56.40"O
LBP	40284	<i>Atlantirivulus santensis</i>	São Paulo-SP	23°46'16.80"S 46°45'56.40"O
LBP	40285	<i>Atlantirivulus santensis</i>	São Paulo-SP	23°46'16.80"S 46°45'56.40"O
LBP 25431	88520	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Peruíbe - SP	24°25'44.07"S

				47° 4'22.15''O
LBP 25431	88521	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Peruíbe - SP	24°25'44.07''S 47° 4'22.15''O
LBP 25431	88524	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Peruíbe - SP	24°25'44.07''S 47° 4'22.15''O
LBP 25431	88526	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Peruíbe - SP	24°25'44.07''S 47° 4'22.15''O
LBP 25431	88527	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Peruíbe - SP	24°25'44.07''S 47° 4'22.15''O
LBP 25431	88528	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Peruíbe - SP	24°25'44.07''S 47° 4'22.15''O
LBP 25431	88529	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Peruíbe - SP	24°25'44.07''S 47° 4'22.15''O
LBP 25431	88530	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Peruíbe - SP	24°25'44.07''S 47° 4'22.15''O
LBP 25428	88516	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Mongaguá-SP	24°4'57.64''S 46°37'11.03''O
LBP	38200	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Mongaguá-SP	24°4'57.64''S 46°37'11.03''O
LBP 25419	78414	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Itanhaém - SP	24°12'3.93''S 46°50'5.67''O
LBP 25419	78417	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Itanhaém - SP	24°12'3.93''S

				46°50'5.67''O
LBP 25419	78419	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Itanhaém - SP	24°12'3.93''S 46°50'5.67''O
LBP 25419	78427	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Itanhaém - SP	24°12'3.93''S 46°50'5.67''O
LBP 25419	78428	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Itanhaém - SP	24°12'3.93''S 46°50'5.67''O
LBP 25419	78429	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Itanhaém - SP	24°12'3.93''S 46°50'5.67''O
LBP 25419	78430	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Itanhaém - SP	24°12'3.93''S 46°50'5.67''O
LBP 25419	78431	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Itanhaém - SP	24°12'3.93''S 46°50'5.67''O
LBP 25419	78432	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Itanhaém - SP	24°12'3.93''S 46°50'5.67''O
LBP	37863	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Itanhaém - SP	24°12'3.93''S 46°50'5.67''O
LBP	37862	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Itanhaém - SP	24°12'3.93''S 46°50'5.67''O
LBP	37861	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Itanhaém - SP	24°12'3.93''S 46°50'5.67''O
LBP	88631	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Santos - SP	23°50'53.95''S

				46°24'6.45''O
LBP	88632	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Santos - SP	23°50'53.95''S 46°24'6.45''O
LBP	88633	<i>Atlantirivulus santensis</i>	Santos - SP	23°50'53.95''S 46°24'6.45''O
LBP 25422	88460	<i>Atlantirivulus simplisis</i>	Paraty - RJ	23° 11' 27.5'' S 44° 43' 31.05' 'O
LBP 25422	88462	<i>Atlantirivulus simplisis</i>	Paraty - RJ	23° 11' 27.5'' S 44° 43' 31.05' 'O
LBP 25422	88467	<i>Atlantirivulus simplisis</i>	Paraty - RJ	23° 11' 27.5'' S 44° 43' 31.05' 'O
LBP 25422	88470	<i>Atlantirivulus simplisis</i>	Paraty - RJ	23° 11' 27.5'' S 44° 43' 31.05' 'O
LBP	88599	<i>Atlantirivulus ribeirensis</i>	Juquiá - SP	24°21'3.63''S 47°41'0.63''O
LBP	88600	<i>Atlantirivulus ribeirensis</i>	Juquiá - SP	24°21'3.63''S 47°41'0.63''O
LBP	88601	<i>Atlantirivulus ribeirensis</i>	Juquiá - SP	24°21'3.63''S 47°41'0.63''O
LBP	88602	<i>Atlantirivulus ribeirensis</i>	Juquiá - SP	24°21'3.63''S 47°41'0.63''O
LBP	88603	<i>Atlantirivulus ribeirensis</i>	Juquiá - SP	24°21'3.63''S 47°41'0.63''O

8. Anexo



Figura 1: Exemplar macho de *A. santensis* coletado em Bertioga.



Figura 2: Exemplar macho de *A. santensis* coletado em Maresias.



Figura 3 Exemplar macho de *A. santensis* coletado em Mongaguá.



Figura 4: Exemplar macho de *A. santensis* coletado em Peruíbe.



Figura 5: Exemplar fêmea de *A. santensis* coletado em Bertioga.



Figura 6: Exemplar fêmea de *A. santensis* coletado em Maresias.



Figura 7: Exemplar fêmea de *A. santensis* coletado em Santos.



Figura 8: Exemplar fêmea de *A. santensis* coletado em Peruíbe.

Partition with prior maximal distance $P=1.29e-02$

Distance K8o Kimura MinSlope=1.500000

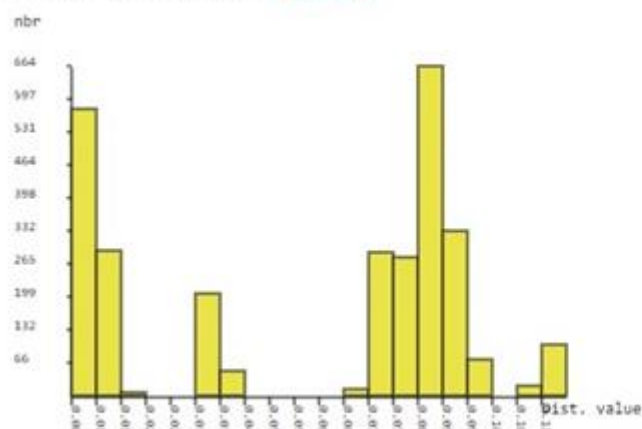
Download (left click and save) or see below the tree file corresponding to this partition: click [here](#)



Group[1] n: 4 ;id: Atlantirivulus_simplicis_Paraty_RJ_88462 Atlantirivulus_simplicis_Paraty_RJ_88467 Atlantirivulus_simplicis_Paraty_RJ_88470 Atlantirivulus_simplicis_Paraty_RJ_88460
Group[2] n: 32 ;id: Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88540 Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88538 Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88539 Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88532
 Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88534 Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88533 Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88536 Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88535
 Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88537 Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88472 Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88471 Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88500
 Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88498 Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88502 Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88503 Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88499
 Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88497 Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88484 Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88478 Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88486
 Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88487 Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88477 Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88488 Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88508
 Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88506 Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88504 Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88509 Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88512
 Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88510 Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88505 Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88501 Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88493
Group[3] n: 5 ;id: Atlantirivulus_ribeirensis_Juquia_SP_88599 Atlantirivulus_ribeirensis_Juquia_SP_88603 Atlantirivulus_ribeirensis_Juquia_SP_88600 Atlantirivulus_ribeirensis_Juquia_SP_88601
 Atlantirivulus_ribeirensis_Juquia_SP_88602
Group[4] n: 10 ;id: Atlantirivulus_santensis_Santos_SP_88631_(reversed) Atlantirivulus_santensis_Santos_SP_88633_(reversed) Atlantirivulus_santensis_Santos_SP_88632_(reversed)
 Atlantirivulus_santensis_Mongagua_SP_38200 Atlantirivulus_santensis_Sao_Paulo_SP_40283 Atlantirivulus_santensis_Sao_Paulo_SP_40282 Atlantirivulus_santensis_Sao_Paulo_SP_40281
 Atlantirivulus_santensis_Sao_Paulo_SP_40284 Atlantirivulus_santensis_Sao_Paulo_SP_40285 Atlantirivulus_santensis_Mongagua_SP_88516
Group[5] n: 26 ;id: Atlantirivulus_santensis_Pedro_de_Toledo_SP_35770 Atlantirivulus_santensis_Pedro_de_Toledo_SP_35766 Atlantirivulus_santensis_Pedro_de_Toledo_SP_35768
 Atlantirivulus_santensis_Pedro_de_Toledo_SP_35769 Atlantirivulus_santensis_Pedro_de_Toledo_SP_35767 Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_SP_37863 Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_SP_37862
 Atlantirivulus_santensis_Periibe_SP_88521 Atlantirivulus_santensis_Periibe_SP_88526 Atlantirivulus_santensis_Periibe_SP_88524 Atlantirivulus_santensis_Periibe_SP_88530
 Atlantirivulus_santensis_Periibe_SP_88529 Atlantirivulus_santensis_Periibe_SP_88528 Atlantirivulus_santensis_Periibe_SP_88527 Atlantirivulus_santensis_Periibe_SP_88520
 Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_37863 Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_37861 Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78432 Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78431 Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78430
 Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78429 Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78428 Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78427 Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78419 Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78417
 Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78414

Figura 9: Análise ABGD para as sequências COI, resultando em 3 grupos de *Atlantirivulus santensis*, mais dois grupos externos, *Atlantirivulus simplicis* e *Atlantirivulus ribeirensis*.

Histogram of distances [save]



Ranked distances [save]

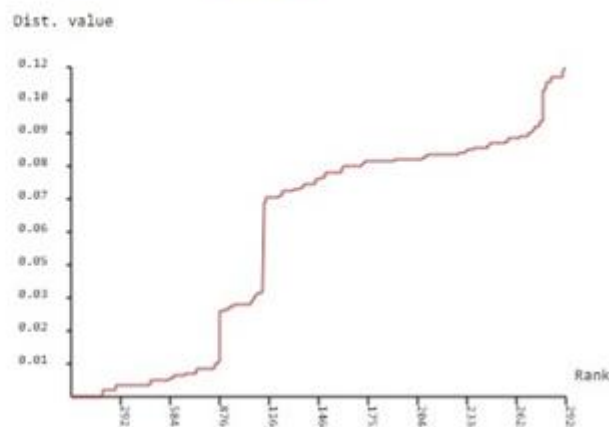


Figura 10: Análise ABGD para as sequências COI, demonstrando as distâncias entre os grupos analisados e ranqueando-as.

Test of substitution saturation (Xia et al. 2003; Xia and Lemey 2009)

Testing whether the observed Iss is significantly lower than Iss.c.

Part I. For a symmetrical tree.

```
=====
Prop. invar. sites      0,0000
Mean H                  0,2022
Standard Error          0,0172
Hmax                    1,8721
Iss                     0,1080
Iss.c                   0,7107
T                       34,9556
DF                      540
Prob (Two-tailed)       0,0000
95% Lower Limit         0,0742
95% Upper Limit         0,1419
=====
```

Part II. For an extreme asymmetrical (and generally very unlikely) tree.

```
=====
Iss.c                   0,4038
T                       17,1556
DF                      540
Prob (Two-tailed)       0,0000

95% Lower Limit         0,0742
95% Upper Limit         0,1419
=====
```

Interpretation of results:

	Significant Difference	
	Yes	No
Iss < Iss.c	Little saturation	Substantial saturation
Iss > Iss.c	Useless sequences	Very poor for phylogenetics

Figura 11: Índice de saturação de substituição (ISS) (Xia *et. al.*, 2003; Xia & Lemey, 2009).

```
# Max likelihood partition
Species 1 (support = 0.260)
  Atlantirivulus_simplicis_Paraty_RJ_88462,Atlantirivulus_simplicis_Paraty_RJ_88467,Atlantirivulus_simplicis_Paraty_RJ_88470,Atlantirivulus_simplicis_Paraty_RJ_88460

Species 2 (support = 0.365)
  Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88487,Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88477,Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88486,Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88478,Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88484,Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88488,
  Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88493,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88508,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88506,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88504,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88509,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_8
  8512,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88510,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88505,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88501,Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88530,Atlantirivulus_santensis_Maresia
  s_SP_88539,Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88532,Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88534,Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88533,Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88536,Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88535,Atlantirivulus_santensis_M
  aresias_SP_88537,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88498,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88502,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88503,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88499,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88497,Atlantirivulus_sante
  nsis_Bertioga_SP_88500,Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88472,Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88471

Species 3 (support = 0.185)
  Atlantirivulus_ribeirensis_Juquia_SP_88599,Atlantirivulus_ribeirensis_Juquia_SP_88603,Atlantirivulus_ribeirensis_Juquia_SP_88600,Atlantirivulus_ribeirensis_Juquia_SP_88601,Atlantirivulus_ribeirensis_Juquia_SP_88602

Species 4 (support = 0.309)
  Atlantirivulus_santensis_Santos_SP_88633,Atlantirivulus_santensis_Santos_SP_88632,Atlantirivulus_santensis_Santos_SP_88631,Atlantirivulus_santensis_Sao_Paulo_SP_40283,Atlantirivulus_santensis_Sao_Paulo_SP_40282,Atlantirivulus_santensis_Sao_Paulo_SP_402
  81,Atlantirivulus_santensis_Mongagua_SP_88516,Atlantirivulus_santensis_Sao_Paulo_SP_40285,Atlantirivulus_santensis_Sao_Paulo_SP_40284,Atlantirivulus_santensis_Mongagua_SP_38200

Species 5 (support = 0.124)
  Atlantirivulus_santensis_Peruipe_SP_88527,Atlantirivulus_santensis_Peruipe_SP_88520,Atlantirivulus_santensis_Peruipe_SP_88528,Atlantirivulus_santensis_Peruipe_SP_88529,Atlantirivulus_santensis_Peruipe_SP_88530,Atlantirivulus_santensis_Peruipe_SP_88524,
  Atlantirivulus_santensis_Peruipe_SP_88526,Atlantirivulus_santensis_Peruipe_SP_88521,Atlantirivulus_santensis_Pedro_de_Toledo_SP_35770,Atlantirivulus_santensis_Pedro_de_Toledo_SP_35769,Atlantirivulus_santensis_Pedro_de_Toledo_SP_35768,Atlantirivulus_san
  tensis_Pedro_de_Toledo_SP_35769,Atlantirivulus_santensis_Pedro_de_Toledo_SP_35767,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_SP_37863,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_SP_37862,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_SP_37861,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78431,Atla
  ntirivulus_santensis_Itanhaem_78432,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78431,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78430,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78429,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78428,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78427,Atlantirivulus_s
  antis_Itanhaem_78419,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78417,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78414
```

Figura 11: Agrupamentos de espécies feito pelo método PTP com “input” NJ.

```
# Max likelihood partition
Species 1 (support = 0.243)
  Atlantirivulus_simplicis_Paraty_RJ_88467,Atlantirivulus_simplicis_Paraty_RJ_88462,Atlantirivulus_simplicis_Paraty_RJ_88470,Atlantirivulus_simplicis_Paraty_RJ_88460

Species 2 (support = 0.218)
  Atlantirivulus_ribeirensis_Juquia_SP_88599,Atlantirivulus_ribeirensis_Juquia_SP_88602,Atlantirivulus_ribeirensis_Juquia_SP_88601,Atlantirivulus_ribeirensis_Juquia_SP_88600,Atlantirivulus_ribeirensis_Juquia_SP_88603

Species 3 (support = 0.022)
  Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88508,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88506,Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88487,Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88477,Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88486,Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_8847
  8,Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88484,Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88488,Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88493,Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88491,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88509,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_8
  8509,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88502,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88508,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88500,Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88477,Atlantirivulus_santensis_Ubatuba_SP_88471,Atlantirivulus_santensis_Bertioga
  SP_88510,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88505,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88512,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88509,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88504,Atlantirivulus_santensis_Bertioga_SP_88501,Atlantirivulus_santensis_Mar
  esias_SP_88530,Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88532,Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88534,Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88533,Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88536,Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88535,Atlantirivulus_santens
  is_Maresias_SP_88539,Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88538,Atlantirivulus_santensis_Maresias_SP_88537

Species 4 (support = 0.010)
  Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78417,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78414,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78419,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78427,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78428,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78429,Atlantirivul
  us_santensis_Itanhaem_78430,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78431,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_78432,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_37863,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_37862,Atlantirivulus_santensis_Itanhaem_37861,Atlantirivulus_santen
  sis_Itanhaem_SP_37862,Atlantirivulus_santensis_Pedro_de_Toledo_SP_35766,Atlantirivulus_santensis_Pedro_de_Toledo_SP_35770,Atlantirivulus_santensis_Pedro_de_Toledo_SP_35768,Atlantirivulus_santensis_Pedro_de_Toledo_SP_35769,Atlantirivulus_santensis_Pedro
  _de_Toledo_SP_35767,Atlantirivulus_santensis_Peruipe_SP_88521,Atlantirivulus_santensis_Peruipe_SP_88526,Atlantirivulus_santensis_Peruipe_SP_88524,Atlantirivulus_santensis_Peruipe_SP_88530,Atlantirivulus_santensis_Peruipe_SP_88529,Atlantirivulus_santens
  is_Peruipe_SP_88528,Atlantirivulus_santensis_Peruipe_SP_88527,Atlantirivulus_santensis_Peruipe_SP_88520

Species 5 (support = 0.147)
  Atlantirivulus_santensis_Sao_Paulo_SP_40284,Atlantirivulus_santensis_Sao_Paulo_SP_40285,Atlantirivulus_santensis_Mongagua_SP_38200,Atlantirivulus_santensis_Sao_Paulo_SP_40282,Atlantirivulus_santensis_Sao_Paulo_SP_40281,Atlantirivulus_santensis_Sao_Paul
  o_SP_40283,Atlantirivulus_santensis_Mongagua_SP_88516,Atlantirivulus_santensis_Santos_SP_88631,Atlantirivulus_santensis_Santos_SP_88633,Atlantirivulus_santensis_Santos_SP_88632
```

Figura 12: Agrupamentos de espécies feito pelo método PTP com “input” ML.

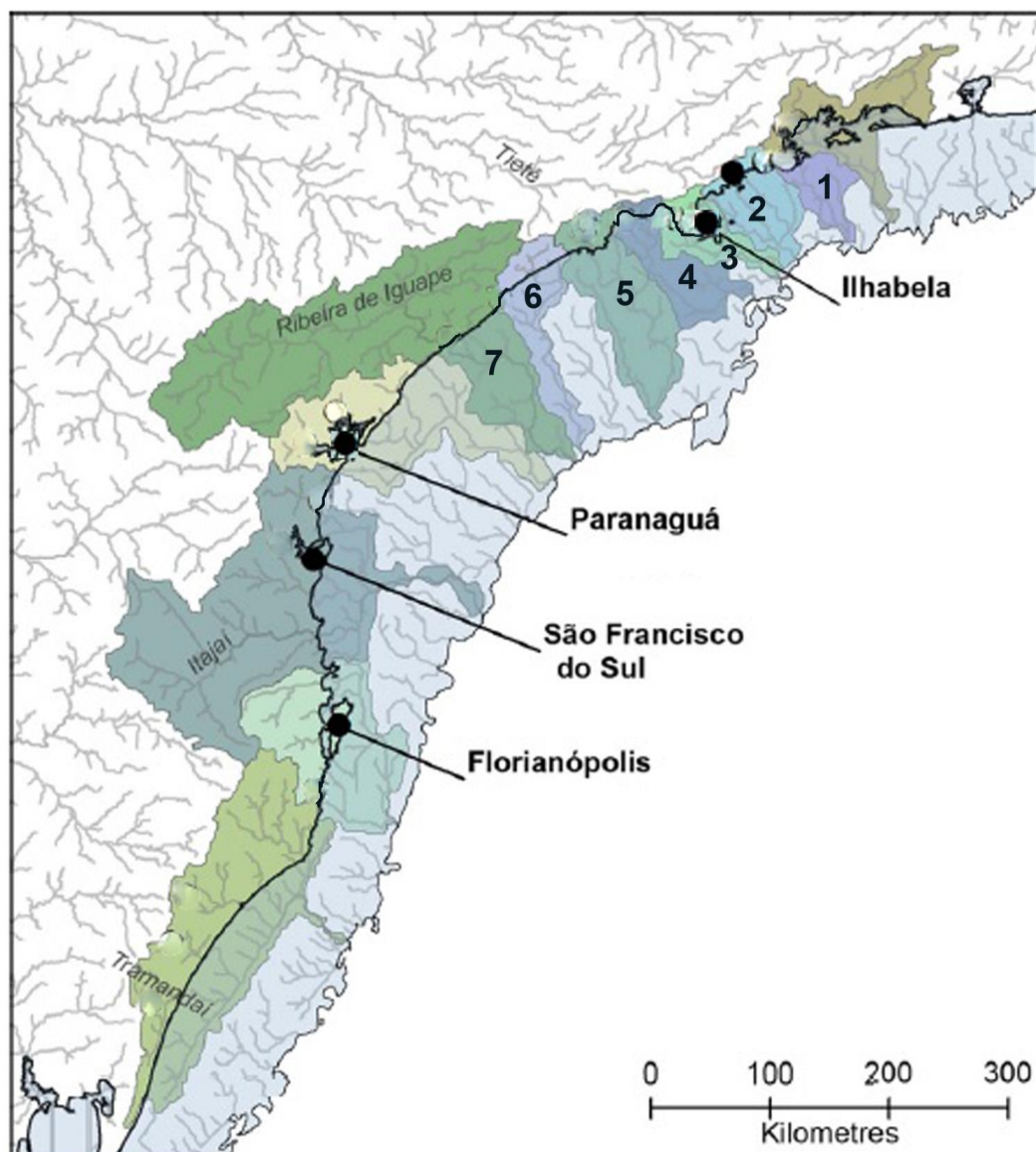


Figura 13: Mapa das paleodrenagens da costa sudeste do Brasil. Enumeradas aquelas que se destacam por abranger áreas de distribuição atual das populações avaliadas nesse estudo. Adaptado de Thomaz (2015).



Figura 14: Habitat da população de *Atlantirivulus santensis*, localidade tipo – Santos.