

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE  
MESTRADO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE

JOSE EDUARDO MEJIA DE LOAYZA

ANALISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE *Otocinclus cocama*  
REIS, 2004 (LORICARIIDAE, SILURIFORMES) NA AMAZÔNIA PERUANA

Porto Alegre

2021

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA

BIODIVERSIDADE

MESTRADO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE

**ANALISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE POPULAÇÕES DE *Otocinclus***

***cocama* REIS, 2004 (LORICARIIDAE, SILURIFORMES) NA AMAZÔNIA**

**PERUANA**

**Jose Eduardo Mejia de Loayza**

**Orientador: Dr. Roberto E. Reis**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**PORTO ALEGRE - RS – BRASIL**

**2021**

Sumário	
Agradecimentos .....	IV
Resumo .....	V
Abstract.....	VI
1. Introdução.....	7
2. Material e Métodos.....	11
2.1. Coleta do material biológico .....	11
2.2. Morfometria geométrica.....	12
2.3. Dados moleculares .....	17
2.3.1. Extração, amplificação e sequenciamento do DNA.....	17
2.3.2. Alinhamento das sequências, partição e seleção de modelos de substituição de nucleotídeos .....	19
2.3.3. Parâmetros populacionais e de diversidade gênica .....	20
2.3.4. Análises e reconstrução filogenética .....	20
2.3.5. Delimitação de espécies .....	21
3. Resultados .....	22
3.1. Análise dos Componentes Principais .....	22
3.2. Análise de variáveis canônicas.....	25
3.3. Parâmetros populacionais e de diversidade gênica .....	28
3.4. Reconstrução filogenética .....	32
3.5. Delimitação de espécies .....	34
4. Discussão.....	37
5. Conclusão.....	39
6. Referências Bibliográficas .....	40

## Relação Figuras

<b>Figura 1:</b> Relações filogenéticas do gênero <i>Otocinclus</i> .	9
<b>Figura 2:</b> Distribuição e zonas de coleta dos espécimes de <i>Otocinclus cocama</i> para este estudo.	12
<b>Figura 3:</b> <i>Otocinclus cocama</i> , morfótipo Jenaro Herrera	14
<b>Figura 4:</b> <i>Otocinclus cocama</i> , morfótipo Tigre	15
<b>Figura 5:</b> Configuração dos marcos anatômicos	16
<b>Figura 6:</b> Análise dos Componentes Principais entre exemplares da população do Tigre e Jenaro Herrera.	23
<b>Figura 7:</b> Análise dos Componentes Principais entre exemplares machos e fêmeas das duas populações de <i>Otocinclus cocama</i> .	24
<b>Figura 8:</b> Análise de variáveis canônicas entre exemplares do morfótipo do Tigre e do morfótipo de Jenaro Herrera.	25
<b>Figura 9:</b> Distribuição do tamanho centróide para indivíduos da população de Jenaro Herrera e indivíduos da população do Tigre.	27
<b>Figura 10:</b> Comparação da forma média entre exemplares do morfótipo Jenaro Herrera do morfótipo Tigre.	27
<b>Figura 11:</b> Rede de haplótipos concatenada (coI, cytb, 16S, nd2) entre morfótipos de <i>Otocinclus cocama</i> .	29
<b>Figura 12:</b> Rede de haplótipos por gene mitocondrial.	30
<b>Figura 13:</b> Reconstrução filogenética por máxima verossimilhança com base nos genes mitocondriais concatenados (coI, cytb, 16S, nd2) para as populações de <i>Otocinclus cocama</i> .	32
<b>Figura 14:</b> Reconstrução filogenética por máxima verossimilhança (MV), com base no gene coI para as populações de <i>Otocinclus cocama</i> .	33
<b>Figura 15:</b> Árvore de inferência Bayesiana enraizada calibrada com relógio molecular relaxado resultante de sequências parciais do gene coI de <i>Otocinclus cocama</i> .	34
<b>Figura 16:</b> Árvore de delimitação de espécies de <i>Otocinclus</i> pelo bPTP.	36

## Relação Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Lista dos marcos anatômicos utilizados para as análises de morfometria geométrica e sua respectiva descrição. A coluna Tipo indica o tipo de ponto de acordo com sua homologia.....	17
<b>Tabela 2:</b> Região, nome do primer utilizado e sua respectiva sequência foward e reverse. ....	18
<b>Tabela 3:</b> Esquema de partição e modelo de substituição selecionado pelo Partitionfinder usando Bayesian information criterion. a=primeira posição, b= segunda posição, c= terceira posição. ....	19
<b>Tabela 4:</b> Porcentagem de variação dos eixos da Análise dos Componentes Principais. ....	24
<b>Tabela 5:</b> Validação cruzada entre exemplares da população de Jenaro Herrera e da população do Tigre e suas respectivas porcentagens.....	26
<b>Tabela 6:</b> MANOVA par a par comparando os exemplares entre áreas. df = grau de liberdade; SS = soma dos quadrados; MS = média dos quadrados; Rsq = valor de R quadrado; F = valor do teste de F; Z = escore de Z; p = valor de significância. ....	26
<b>Tabela 7:</b> Número amostral de espécimes de <i>Otocinclus cocama</i> utilizados na análise (N), e parâmetros populacionais e de diversidade genéticas considerando cada gene individualmente: 16s, coI, cytb e nd2.....	28
<b>Tabela 8:</b> Distância genética percentual entre os morfótipos de <i>Otocinclus cocama</i> para os genes mitocondriais concatenados. O erro standard é apresentado na diagonal acima da distância genética.....	31
<b>Tabela 9:</b> Distância genética percentual entre os morfótipos de <i>Otocinclus cocama</i> para o gene coI. O erro standard é apresentado na diagonal acima da distância genética. A análise usou o modelo Kimura 2 parâmetros. ....	31
<b>Tabela 10:</b> Resultados do análises de delimitação de espécies pelo método bPTP.....	35

## **Agradecimentos**

Ao Roberto Reis, por ter me aceitado como orientado sabendo que eu apenas estava iniciando meu caminho na ictiologia, obrigado por todo tempo e paciência durante esses dois anos de mestrado, agradeço pelo exemplo de pesquisador, e acima de tudo, pela confiança no meu trabalho.

Agradeço aos meus colegas e amigos do Museu de Ciência e Tecnologia da PUCRS, com os quais convivi durante esses dois anos. Álvaro Neto, Christian Schobel, Arthur Capelli, e Suelen Gamarra pelas conversas, pelos almoços e ideias trocadas e por terem me ajudado sempre que precisei. Em especial para a Bárbara Calegari, por sua paciência e ter me ajudado a resolver muitas dúvidas no andamento de toda parte molecular do trabalho; a Vanessa Meza por ter me ensinado os protocolos na realização da PCR, e também pelos conselhos e por ter me ajudado sempre que precisei; a Maria Laura por todas as conversas e ajuda, assim como por todo auxílio nesses dois anos.

Ao Carlos Lucena curador da Coleção ictiológica e Diretor do Museu da PUCRS, por toda ajuda e auxílio sempre que precisei de dados, planilhas e materiais da coleção científica. Também agradeço ao Charles Fernando dos Santos, Pos-doutorando do Laboratório de Abelhas do MCT, por toda ajuda no entendimento de análises de morfologia geométrica. ambos contribuíram de maneira significativa para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao Hernán Ortega, curador da coleção de peixes do Museu de História Natural, Lima - Perú, muito obrigado pelo apoio e ajuda no depósito e empréstimo de material científico.

Aos meus pais, Kember e Sonia, que, com muito amor, compreensão e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida, sem dúvida esta oportunidade não tivesse sido possível sem sua confiança e ajuda permanente.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, através do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade, pela oportunidade concedida e formação acadêmica. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

## Resumo

*Otocinclus cocama* Reis, 2004, uma espécie de peixe da subfamília Hypoptopomatinae descrita originalmente de Jenaro Herrera na bacia do rio Ucayali, Peru, se diferencia das demais espécies de *Otocinclus* por dois caracteres autopomórficos: o padrão de coloração, que consiste em marcas grossas alongadas verticalmente desde a linha média dorsal até a porção ventral dos flancos, e por uma linha lateral completa. A espécie é conhecida só da localidade tipo e estima-se ser de distribuição restrito, sendo considerada Em Perigo pela IUCN. No entanto no comércio ornamental de peixes é conhecido um segundo morfótipo de *O. cocama* coletada da bacia do rio Tigre com um maior número de manchas alongadas verticalmente ao longo do corpo. Ambos morfótipos são conhecidos e muito populares no comércio internacional de peixes de aquários, pelo menos desde o ano 2000, e são exportados sob o nome de *Otocinclus* "zebra". O objetivo neste trabalho foi avaliar as relações filogenéticas e variações significativas entre espécimes das diferentes áreas geográficas, testando a ocorrência de divergência e especiação biológica entre as diferentes populações de *O. cocama*, mediante o uso da morfometria geométrica e sequências parciais de DNA de quatro genes mitocondriais. Foram analisados 61 exemplares depositados nas coleções de peixes do Museo de História natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru (MHNSM) e do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Porto Alegre (MCP). As análises de morfometria geométrica com base em 11 landmarks homólogos visando encontrar as possíveis variações em quanto à forma e tamanho centróide não permitiram identificar diferença entre as populações das duas bacias. As análises filogenéticas baseadas na reconstrução de árvores de máxima verossimilhança, distância genética, delimitação de espécies pelo modelo GMYC (Generalized Mixed Yule-Coalescence) e análises de redes de haplótipos corroboraram que *O. cocama* é formado por um único grupo genético com dois morfótipos que são bem diferenciados pelo padrão bandas alongadas ao longo do corpo para cada bacia hidrográfica. Estes resultados contribuem para futuras investigações que tenham por objetivo avaliar variação morfológica que poderia ocorrer entre as diferentes populações das espécies de *Otocinclus*.

Palavras-chave: biodiversidade; marcadores moleculares; delimitação de espécie.

## Abstract

*Otocinclus Cocama*, Reis, 2004, is placed in the subfamily Hypoptopomatinae originally described from Jenaro Herrera in the Ucayali River, Peru, is distinguish from all its congeners by two autapomorphies: a unique color pattern, consisting of vertically elongated blotches spanning from a dorsal midline to the ventral portion of flanks, and by a complete lateral line. The species is known only from the type locality and is estimated to have a restricted distribution, being assessed as Endangered by the IUCN. However, in the ornamental fish trade, a second morphotype of *O. cocama* collected in the Tigre River basin is known, with a greater number of vertically elongated blotches spanning along the body. Both morphotypes are known and very popular in the international aquarium fish trade, at least since 2000, and are exported under the name *Otocinclus* "zebra". The aim of this work was to assess the phylogenetic relationships and significant variations between specimens from different geographic areas, testing the occurrence of divergence and biological speciation between different populations of *O. cocama*, through the use of geometric morphometry and partial DNA sequences of four mitochondrial genes. 61 specimens deposited in the fish collections of the Natural History Museum of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru (MHNSM) and the Museum of Science and Technology PUCRS, Porto Alegre (MCP) were analyzed. The geometric morphometric analysis based on 11 homologous landmarks in order to find possible variations in terms of shape and size of the centroid did not allow to identify differences between the populations of the two basins. Phylogenetic analyzes based on the reconstruction of maximum likelihood trees, genetic distance, species delimitation by the GMYC (Generalized Mixed Yule-Coalescence) model, and haplotype network analysis confirmed that *O. cocama* is formed by a single genetic group with two morphotypes that are well differentiated by the number of elongated blotches throughout the body for each hydrographic basin. These results contribute to future research that aims to evaluate the morphological variation that could occur between different populations of *Otocinclus* species.

Keywords: biodiversity; molecular markers; species delimitation.



## 1. Introdução

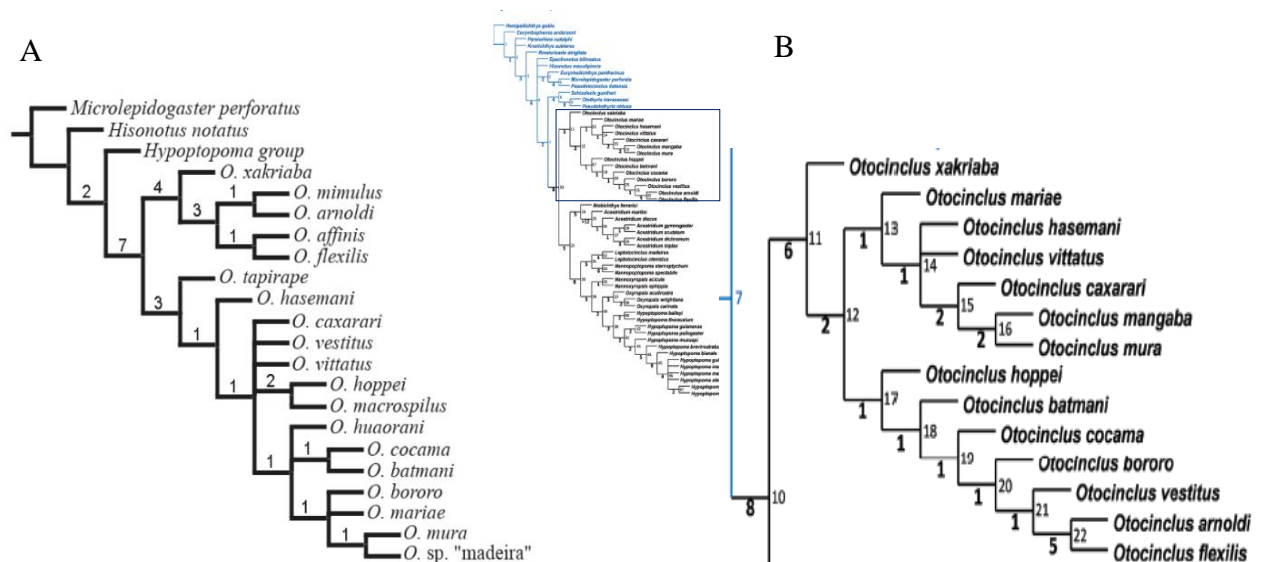
Loricariidae constitui a maior família de Siluriformes com mais de 1.000 espécies válidas alocadas em seis subfamílias: Delturinae, Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Loricariinae e Rhinelepineae. Hypoptopomatinae é a terceira subfamília com maior número de espécies dentro Loricariidae com 249 espécies validas alocadas em 31 gêneros e três tribos: Otothyriini, Neoplecostomini e Hypoptopomatini (Reis *et al.*, 2006a; Lujan *et al.*, 2015; Eschmeyer *et al.*, 2020). Sendo Hypoptopomatini conhecida popularmente como a tribo dos cascudinhos por apresentar espécies de porte pequeno a moderado (25 a 105 mm de comprimento padrão), com uma cintura peitoral que está total ou parcialmente exposta na porção ventral do tronco e possui extensões laminares do cleitro e do coracóide que cobrem em grande parte ou totalmente as fossas dos músculos adutores da nadadeira peitoral (Schaefer, 1991, 1997; Aquino & Schaefer, 2010). Baseado em caracteres morfológicos Schaefer (1997, 1998) considerou Hypoptopomatinae composta de duas tribos monofiléticas: Hypoptopomatini pela ausência de uma crista do *levator arcus palatini* na hiomandíbula como consequência do músculo *levator* reduzido; a presença de poucas e relativamente grandes placas na margem anterior do focinho; e uma dobra lateroventral da placa com canal da bochecha; e Otothyriini pela presença de um arco neural expandido no sétimo centro vertebral, a terceira placa da linha lateral reduzida, com a área posterior do pterótico composto alargada, expondo as fenestras da bexiga natatória. Baseados em dados moleculares Chiachio *et al.* (2008) elevaram Otothyriini à subfamília, sendo mais proximamente relacionada com Neoplecostominae do que com Hypoptopomatini. Cramer *et al.* (2011), usando marcadores nucleares e mitocondriais, analisaram as relações entre todos os gêneros de Hypoptopomatinae, Neoplecostominae e Otothyriinae, concluindo que todos formavam um único clado composto pelas três subfamílias (agora tratadas como tribos), mas nenhum sendo suportado como monofilético. Finalmente, Lujan *et al.* (2015) encontrou uma relação próxima entre os três táxons sendo tratados novamente como tribos de Hypoptopomatinae.

Dentro de Hypoptopomatini, um dos gêneros mais estudados é *Otocinclus* (Schaefer, 1997; Britto, Moreira, 2002; Axenrot, Kullander, 2003; Reis, 2004; Lehmann *et al.*, 2010), com espécies de tamanho corporal moderadamente pequeno, de comprimento

padrão menor que 60 mm, as quais estão amplamente distribuídas na América do sul cis-andina desde o norte da Venezuela até o norte da Argentina, habitualmente vivendo em pequenos e médios corpos de água (Reis, 2004). *Otocinclus* é reconhecido como monofilético (Lehmann *et al.*, 2010) baseado em cinco sinapomorfias exclusivas: borda ventral do etmoidal lateral ausente; dentes faringianos reduzidos e dispostos em série única; *spinelet* da nadadeira dorsal em forma de V; divertículo esofágico expandido em bexiga natatória acessória; e órgão de contato presente na base da nadadeira caudal nos machos; além de quatro sinapomorfias não exclusivas: superfície anteroventral do mesetmoide com um par de processos uncinados; cápsula da bexiga natatória aumentada; porção anterior do basiptyrgium aberta, com um par de fenestras; e lacunas entre os poros do canal da série média de placas laterais (Delapieve *et al.*, 2017). Assim, *Otocinclus* representa o maior clado e o terceiro gênero mais rico entre os hypoptopomatini, após *Hisonotus* e *Parotocinclus*, dois gêneros recuperados como parafiléticos por estudos morfológicos e moleculares (Lehmann, *et al.*, 2013; Cramer *et al.*, 2011; Lehmann, 2006; Gauger & Buckup, 2005; Chiachio *et al.*, 2008).

Durante as últimas décadas, *Otocinclus* recebeu forte interesse científico por parte de muitos pesquisadores (Schaefer, 1997; Britto & Moreira, 2002; Axenrot & Kullander, 2003; Lehmann *et al.*, 2010). A primeira análise filogenética de *Otocinclus* foi elaborada por Schaefer (1997) incluindo 23 caracteres morfológicos e as 13 espécies reconhecidas até aquele momento. Britto & Moreira (2002) descreveram *O. tapirape* de um tributário do rio Pintado, no estado de Goiás, Brasil, e realizaram uma nova filogenia das espécies baseados em 27 caracteres morfológicos, obtendo relações não bem resolvidas, e agrupando as espécies nos clados *vestitus* e *orbis*. Axenrot & Kullander (2003) descreveram *Otocinclus mimulus* de um pequeno riacho no rio Paraná no departamento Caaguazú no Paraguai, e incluíram *O. mimulus* no clado formado por *O. flexilis* e *O. affinis*. A hipótese filogenética mais completa para *Otocinclus* foi fornecida por Lehmann *et al.* (2010), que descreveu *O. mangaba* e demonstrou que *Otocinclus* estaria formado por um clado bem suportado composto por espécies do escudo brasileiro (*O. xakriaba*, *O. mimulus*, *O. arnoldi*, *O. affinis* e *O. flexilis*) e outro clado que inclui todas as demais espécies de *Otocinclus* distribuídas nas bacias do Amazonas, Paraguai e Orinoco. No entanto, apesar da adição de seis novos caracteres morfológicos aos 28 caracteres avaliados em outros estudos, as relações filogenéticas entre as espécies de

*Otocinclus* não ganharam muito mais resolução do que nos trabalhos prévios (Schaefer, 1997; Britto & Moreira, 2002; Axenrot & Kullander, 2003) encontrando-se politomias e baixos valores de suporte dos ramos internos (Fig. 1A). A hipótese de *Otocinclus* estar formado por um clado com espécies do escudo brasileiro e outro clado com espécies de ampla distribuição na bacia Amazônica não obteve suporte na filogenia de Hypoptopomatini apresentada por Delapieve *et al.* (2017). Nesta avaliação das relações filogenéticas da subtribo Hypoptopomatini, *Otocinclus xakriaba* foi reconhecida como a linhagem irmã de um grupo com as demais espécies estando divididas em dois clados (Figura 1B), que não estariam obedecendo a um padrão biogeográfico como o sugerido por Lehmann *et al.* (2010).



**Figura 1:** Relações filogenéticas do gênero *Otocinclus* segundo (A) Lehmann *et al.* (2010), e (B) Delapieve *et al.* (2017).

Dessa forma, torna-se importante reavaliar a história e as relações biogeográficas do gênero, por apresentar espécies distribuídas nas principais bacias de drenagem nas terras baixas da América do Sul desde a Colômbia até o norte da Argentina, nas bacias do Amazonas, Paraguai e Orinoco (Axenrot & Kullander, 2003; Lehmann *et al.*, 2010). O fato das espécies de *Otocinclus* serem peixes relativamente pequenos e com área de vida limitada, restritos a córregos e rios menores de água clara e bem oxigenada, condiciona a maioria das espécies a ter uma capacidade limitada para a dispersão a longa distância. Esse último fator sugere uma forte probabilidade de que padrões de endemismo de

espécies regionais de pequena escala sigam sendo representativos neste gênero. Por outro lado, a taxonomia de algumas espécies de *Otocinclus*, como as do clado *vestitus*, que apresenta uma ampla distribuição geográfica, permanece confusa, podendo ser diferenciadas apenas sob escrutínio rigoroso, as vezes com o limitante de não estar bem representados em coleções de museus (Schaefer, 1997). A delimitação de espécies é uma tarefa complexa, a combinação de dados fenotípicos com marcadores moleculares em um enfoque integrativo, tem sido usados como uma ferramenta eficiente em estudos de populações de peixes, e seu uso tem contribuído à identificação de espécies crípticas (Prizon *et al.*, 2017; Fagundes *et al.*, 2020). A taxonomia integrativa permite fornecer melhores inferências sobre os limites das espécies (Padial *et al.*, 2010). Entretanto, esta delimitação entre as linhagens envolve o fato de que cada pesquisador aplica o conceito que entende como o mais adequado (De Queiroz, 2007). Durante os dois últimos séculos muitos conceitos de espécie foram propostos baseados em diferentes propriedades biológicas, como: morfologia, isolamento reprodutivo, filogenia, ecologia, etc., no entanto, todos convergem em que as espécies são linhagens de metapopulações evoluindo separadamente (De Queiroz, 2007).

*Otocinclus cocama* Reis, 2004, foi descrita da localidade de Jenaro Herrera, Peru, na bacia do rio Ucayali, e se distingue das demais espécies de *Otocinclus* por dois caracteres autopomórficos, o padrão de coloração muito diferente, que consiste em marcas alongadas verticalmente, e por uma linha lateral completa. Durante o curso de uma coleta de peixes ornamentais do Projeto PIAP-2-P-098-14 do Instituto de Pesquisas da Amazônia Peruana—IIAP na bacia do rio Tigre, alguns lotes (cerca de 20 indivíduos) foram provisoriamente identificados como *Otocinclus* cf. *cocama*. O morfótipo proveniente da bacia do rio Tigre apresenta algumas diferenças em relação à descrição original da espécie. Foram notadas diferenças no padrão de coloração, observando-se um maior número de bandas alongadas verticalmente desde a linha média dorsal até a porção ventral dos flancos, em relação às quatro bandas que geralmente são reconhecidas nos indivíduos da bacia do rio Ucayali. Ao mesmo tempo as bandas do morfótipo do rio Tigre são mais finas do que as bandas grossas do morfótipo de Jenaro Herrera. Os exemplares da bacia do Tigre são transportados por coletores artesanais de peixes ornamentais desde a lagoa Huangana até a cidade de Iquitos, na província de Loreto, para exportação. Ambos

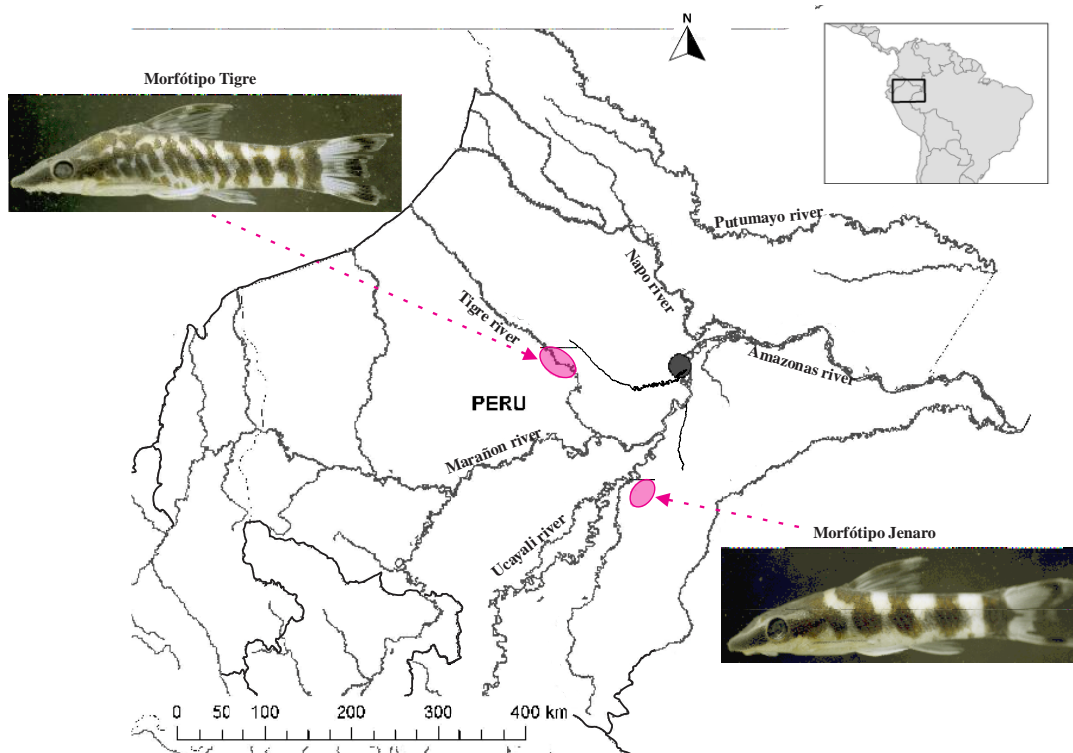
os morfótipos são conhecidos e muito populares no comércio de aquários, pelo menos desde 2000, e são exportados sob o nome de *Otocinclus* "zebra".

Um estudo integrativo de delimitação de espécies usando dados moleculares e morfometria geométrica foi aplicado visando avaliar o reconhecimento de espécies de populações isoladas. A hipótese a ser testada neste trabalho é a coespecificidade das duas populações de *Otocinclus cocama*, e estudar a sua real distribuição geográfica e as relações filogenéticas das populações de *O. cocama* na Amazônia Peruana. A hipótese nula é que os indivíduos da bacia do rio Ucayali e os indivíduos bacia do rio Tigre constituem a mesma espécie, enquanto a hipótese alternativa é que o morfótipo da drenagem do rio Tigre represente uma espécie não descrita. É esperado que através de diferentes análises morfológicas e moleculares sejam constatadas variações significativas entre espécimes das diferentes áreas geográficas, desta forma gerando evidencia que suporte a ocorrência de divergência e especiação biológica entre eles.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Coleta do material biológico**

Durante julho de 2019 e janeiro de 2020, foram coletados 62 indivíduos dos dois morfótipos de *Otocinclus cocama* reportados na Amazônia Peruana. 31 exemplares do morfótipo "Tigre", provenientes da bacia baixa do rio Tigre (aprox. 03°03'S, 75°18'W) e 30 exemplares do morfótipo "Jenaro Herrera" provenientes da quebrada Yanayacu (aprox. 05°4'S, 73°43'W) em Jenaro Herrera, Província Requena, Departamento Loreto (Figura 2). As coletas foram realizadas com redes de arrasto de 210 cm e com puçá. Todos os peixes coletados foram anestesiados e sacrificados por imersão em água gelada (Ashley, 2007). Amostras de tecido muscular foram extraídas de cada indivíduo e posteriormente conservadas em etanol 96%. Os espécimes foram fixados em formol 10% e conservadas em etanol 70% para ser depositados na coleção ictiológica do Museo de História natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru (MUSM) e no Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (MCP), Porto Alegre, Brasil. Todos os indivíduos depositados foram emprestados para a realização dos trabalhos de morfológicos e moleculares no MCP.



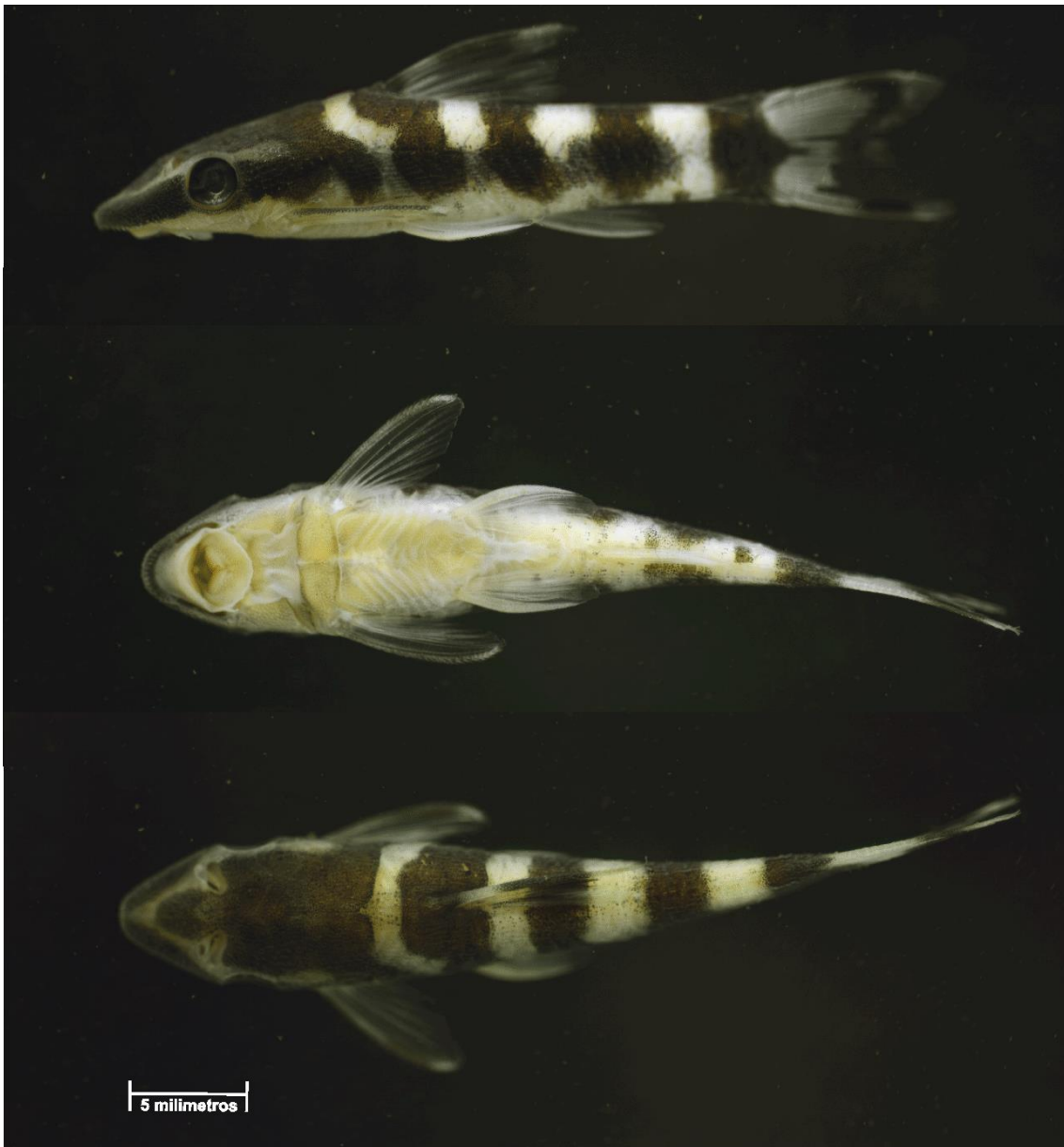
**Figura 2:** Distribuição e zonas de coleta dos espécimes de *Otocinclus cocama* para este estudo. a) Morfótipo coletado por pescadores artesanais na bacia do rio Tigre, 50,1 mm SL; b) Morfótipo Jenaro Herrera, localidade-tipo = rio Ucayali, 43,5 mm SL.

## 2.2. Morfometria geométrica

Com a finalidade de capturar a informação relacionada à forma dos organismos foi utilizada um conjunto de pontos cartesianos, denominados de *landmarks* ou marcos anatômicos que são baseados em pontos homólogos dos organismos, utilizados neste estudo em duas dimensões. A morfometria geométrica permite identificar as variações da forma geométrica sendo este o componente mais informativo para definir entidades biológicas, permitindo assim analisar o local da mudança de forma, como e em que magnitude ela ocorre (Monteiro-filho *et al.*, 2002). Os marcos anatômicos podem ter três tipos de classificação, de acordo com seu grau de confiabilidade quanto a homologia dos pontos: Pontos do tipo 1 possuem homologia altamente confiável, sendo formados pela intersecção de membros (p. ex. a intersecção do primeiro raio da nadadeira dorsal de um peixe, com o seu dorso); Pontos do tipo 2 possuem homologia medianamente confiável,

sendo definidos por formações geométricas locais, como a extremidade de um processo (p. ex. a ponta do focinho ou a extremidade anterior do olho); Pontos do tipo 3 possuem homologia de baixa confiabilidade, são dependentes de outros pontos ou medidas adjacentes (p. ex. o ponto na região mais alta do dorso do peixe) (Rohlf & Marcus, 1993; Fornel, 2010; Fornel & Estrela, 2012; Aguirre & Jiménez-Prado, 2018).

Foram analisadas um total de 61 indivíduos de *Otocinclus cocama*, do morfótipo Jenaro Herrera (n=31; Figura 3) e do morfótipo Tigre (n=30; Figura 4). As imagens da vista lateral dos espécimes foram obtidas com a câmera digital (Canon EOS REBEL T5, Canon 18–55 mm lens set at 55 mm). Foram selecionados um total de 11 marcos anatômicos (MA) seguindo o trabalho de Schaefer (1997). Os MA foram utilizados para capturar a forma do corpo de cada morfótipo, sendo representados em duas dimensões (Figura 5, Tabela 1). As linhas entre os MA foram utilizadas para elaboração do gráfico do tipo “wireframe”, permitindo uma melhor visualização das diferenças morfológicas entre as populações das áreas analisadas. Todas as análises posteriores se realizaram utilizando unicamente o componente assimétrico (Klingenberg *et al.*, 2002) no MorphoJ versão 1.06 (Klingenberg, 2011). O software tpsUtil versão 1.76 (Rohlf, 2008) foi utilizado para conversão e ordenação das imagens digitalizadas em um mesmo arquivo no formato TPS. Os pontos homólogos foram digitalizados usando o software TPSdig2 v.2.17 (Rohlf, 2013). Para as análises de morfometria geométrica foram utilizados os pacotes GEOMORPH (Adams *et al.*, 2018); MORPHO (Schlager, 2017) e APE (Paradis & Schliep, 2018) no software R versão 3.6.1 ([www.R-project.org/](http://www.R-project.org/)) e o software MorphoJ. O tamanho geométrico de cada espécime foi estimado pelo tamanho do centroide, que é definido como a raiz quadrada da soma das distâncias ao quadrado entre cada marco anatômico e o centroide ou centro de gravidade da forma (Bookstein, 1991). Os espécimes analisados foram submetidos a um alinhamento generalizado de Procrustes (GPA) para remover os efeitos do tamanho, posição e orientação dos espécimes nos pontos de referência selecionados, resultando em variáveis de forma que são independentes do tamanho em ausência de alometria (Rohlf & Slice, 1990).



**Figura 3:** *Otocinclus cocama*, morfotipo Jenaro Herrera, MUSM 69232, 29.3 mm SL, Macho. Quebrada Yanayau, Jenaro Herrera, Loreto, Peru.



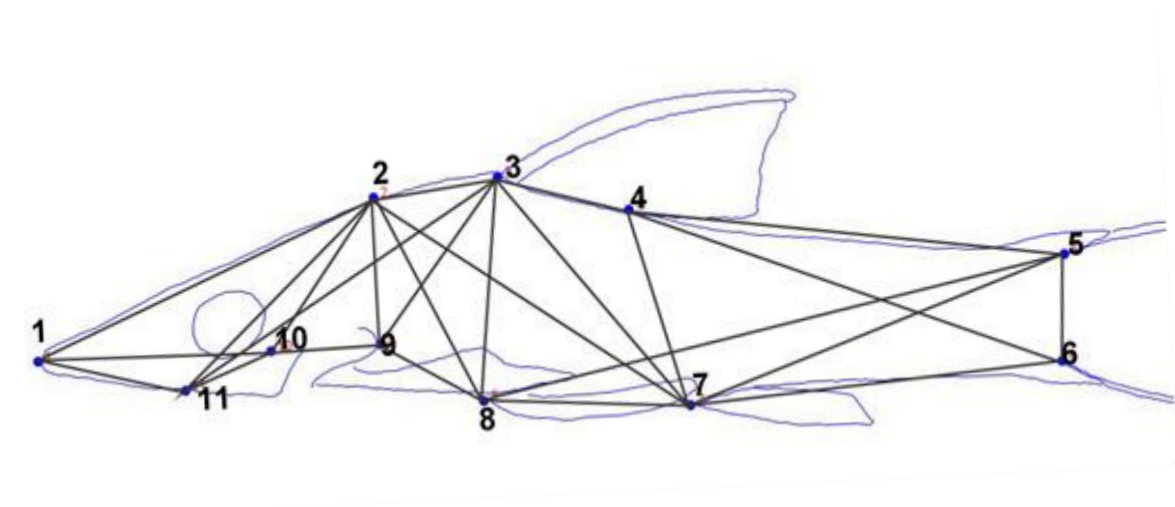


**Figura 4:** *Otocinclus cocama*, morfótipo Tigre, MUSM 69233; 41.3 mm SL, Fêmea. quebrada Huangana, rio Tigre, Loreto, Peru.

Foram avaliados o tamanho centroide e a medida do tamanho geométrico para cada espécimen (Bookstein, 1991). A MANOVA foi utilizada para verificar se as variações de forma entre os grupos possuem diferenças significativas, bem como a confiabilidade no resultado de P significativo por meio do valor do teste F. O Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada na matriz das coordenadas de forma dos dois morfótipos avaliados, a fim de identificar os padrões e conjunto de características morfológicas que poderiam ser responsáveis pela separação dos morfótipos. A Análise de Variáveis Canônica (CVA) foi utilizada para descrever as diferenças de forma entre os morfótipos e a direção na qual a média de cada uma delas difere, sendo feito um cálculo de validação cruzada para avaliar a robustez da atribuição morfométrica dos indivíduos. Todas as

análises foram realizadas nos programas MorphoJ e Rstudio sob os pacotes geomorf e morpho anteriormente mencionados.

Para comparar as variações de forma entre as populações sem interferência do tamanho foi realizada uma regressão multivariada seguida de testes de significância de permutação (com 1000 repetições) colocando as coordenadas de Procrustes de cada organismo como variável dependente e o tamanho do centroide como independente, os resíduos da regressão foram utilizados para as análises posteriores. Nas comparações realizadas na CVA foram computados os valores de probabilidade a partir do teste de permutações ( $n = 10.000$ ) para a distância de Procrustes e distância de Mahalanobis. A distância de Procrustes e a de Mahalanobis são referentes à similaridade das formas analisadas, a primeira é a distância absoluta da média da forma do indivíduo para a média geral da amostra e a segunda é a distância relativa, colocando ênfase na distância da média da forma do indivíduo para a tendência de variação geral da amostra.



**Figura 5:** Configuração dos marcos anatômicos representado por números, e as respectivas linhas para representação gráfica.

**Tabela 1:** Lista dos marcos anatômicos utilizados para as análises de morfometria geométrica e sua respectiva descrição. A coluna Tipo indica o tipo de ponto de acordo com sua homologia.

<b>Marco anatômico</b>	<b>tipo</b>	<b>Descrição</b>
1	II	ponta do focinho na linha media
2	I	ponta posterior do supraoccipital
3	I	borda anterior do primeiro espinho da nadadeira dorsal
4	I	origem do último raio da nadadeira dorsal
5	II	contado do segundo raio procorrente dorsal da nadadeira caudal com as demais placas do corpo
6	II	contado do segundo raio procorrente ventral da nadadeira caudal com as demais placas do corpo
7	I	origem da nadadeira anal
8	I	origem da nadadeira pélvica
9	II	ponta posterior do processo lateral do cleitro
10	II	vértice anterodorsal do opérculo
11	I	união da placa com canal com a placa anterior, na margem do focinho

### 2.3. Dados moleculares

#### 2.3.1. Extração, amplificação e sequenciamento do DNA

A extração do DNA foi realizada com o uso de kit de extração de DNA total DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), a partir de tecido muscular preservado em álcool 70%, seguindo o protocolo do fabricante. Com base na sua utilização em estudos filogenéticos anteriores e para maximizar a resolução da filogenia, foram amplificadas sequencias parciais dos genes mitocondriais Cytochrome c oxidase subunit I (coI), Cytochrome b (cytb), 16s rRNA, e NADH subunidade2 (nd2). Os primers previamente publicados (Tabela 2) foram usados para amplificação mediante a reação em cadeia da polimerase PCR (Polymerase Chain Reaction). As amplificações foram realizadas em um volume de 12,5 µl de Master Mix, com um volume de concentração de 1,25 µl para cada primer

(Forward e Reverse) e 6,0 µl de água Mili-Q, totalizando 23 µl. Foram utilizados 2 µl do DNA de cada amostra para a amplificação, completando 25 µl de reação final.

**Tabela 2:** Região, nome do primer utilizado e sua respectiva sequência forward e reverse.

Região	Fragmento	Sequência do primer	Referência
coI	LCOI490	F-5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	Folmer <i>et al.</i> , 1994
	HCO2198	R-5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	
cytb	<i>cytbFa</i>	F-5'-TCCCACCCGGACTCTAACCGA-3'	Lujan <i>et al.</i> , 2015
	<i>cytbRa</i>	R-5'-CCGGATTACAAGACCCGGCGCT-3'	
16S	16Sa	F-5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'	Palumbi <i>et al.</i> , 1991
	16Sb	R-5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'	
ND2	nd2_Dist_f	F-5'-AGCTTTTGGGCCCATACCCCA-3'	Arroyave <i>et al.</i> , 2013
	nd2_Dist_r	R-5'-AGGRACTAGGAGATTTTCACTCCTGCT-3'	

As reação de PCR para os genes mitocondriais foram rodadas nas seguintes condições: Para o gene coI: desnaturação inicial de 94°C por 2 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 54°C por 30 s, extensão de 72°C por 50 s, e extensão final de 72°C por 10 min. Para o gene cytb: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 58°C, 56°C e 54°C por 20 s para cada, extensão a 72°C por 50 s, e extensão final a 72°C por 10 min. Para o gene 16S: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 50°C e 48°C por 30 s para cada, extensão a 72°C por 90 s, e extensão final a 72°C por 10 min. Para o gene ND2: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 60 s, anelamento a 58°C por 60 s, extensão a 72°C por 120 s, e extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos amplificados de DNA foram visualizados em gel de agarose 1% e comparados com tamanhos conhecidos de DNA ladder 100 pb (Invitrogen) para verificar e registrar a qualidade de amplificação do DNA antes do envio para o sequenciamento na empresa Funcional Biosciences Inc, nos Estados Unidos.

### 2.3.2. Alinhamento das sequências, partição e seleção de modelos de substituição de nucleotídeos

As sequências amplificadas foram inicialmente editadas manualmente para cada região mitocondrial no programa BioEdit (Hall, 1999) e alinhadas com o algoritmo Clustal W (Thompson et al., 1994) disponível no programa Mega X (Kumar; Stecher; Tamura, 2018). Os dados foram organizados em duas matrizes, uma só para o gene *coI* e outra para os dados concatenados (os quatro genes), que foram utilizadas para análises filogenéticas e delimitação das espécies. O programa PartitionFinder (Lanfear et al., 2012) foi utilizado para determinar objetivamente os modelos ótimos de evolução e esquema de particionamento simultaneamente para ambas matrizes. Os modelos de melhor ajuste foram selecionados usando critérios de informação Bayesianos sob um esquema de pesquisa “ganancioso” usando um subconjunto de modelos específicos para cada programa usado os programas RAxML, Garli, e BEAST. A matriz de dados concatenados foi definida em blocos dividindo as sequencias de cada gene em subconjuntos refletindo a posição do códon. Informações adicionais sobre cada esquema de particionamento específico são apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3:** Esquema de partição e modelo de substituição selecionado pelo Partitionfinder usando Bayesian information criterion. a=primeira posição, b= segunda posição, c= terceira posição.

Partições	Modelo de substituição selecionado
16s	HKY
COI <sub>a</sub> + CYTB <sub>a</sub>	TRNEF+I
COI <sub>b</sub>	F81+I
COI <sub>c</sub>	K81UF
CYTB <sub>b</sub>	HKY+I
CYTB <sub>c</sub> + ND2 <sub>c</sub>	TRN+G
ND2 <sub>a</sub>	TIM+I
ND2 <sub>b</sub>	TRN+I

### 2.3.3. Parâmetros populacionais e de diversidade gênica

Após a edição das sequências foram obtidos haplótipos únicos no programa DNAsp 5.0 (Librado & Rozas, 2009) para as análises de delimitação posteriores. As diferenças genéticas entre as populações geograficamente distintas foram estimadas baseadas nos quatro genes mitocondriais sequenciados neste estudo (coI, cytb, 16S, nd2). A variabilidade foi estimada utilizando os parâmetros de diversidade genética: número de sítios polimórficos (s), o número de haplótipos (n), a diversidade haplotípica (hd), a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), e os desvios padrão, através do programa Arlequin v3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). O programa Network v5.3 foi utilizado para construção da rede de haplótipos, utilizando o algoritmo median-joining que identifica os haplótipos mais proximamente relacionados, com o critério de parcimônia e favorecendo conexões mais curtas (Bandelt *et al.*, 1999). Segundo Bandelt *et al.* (1999) o método utiliza “median vectors (mv)”, que representam sequências consenso, podendo ser interpretadas como sequências que não foram amostradas no estudo ou ainda, possíveis sequências ancestrais extintas. Para a estimativa da distância genética entre as linhagens foi usado o programa Mega X, para calcular as médias das distâncias genéticas intra e interespecífica, usando o modelo de substituição Kimura 2-Parâmetros (K2P) (Kimura, 1980), e a opção pairwise deletion para o Tratamento de dados faltantes.

### 2.3.4. Análises e reconstrução filogenética

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando os métodos de máxima verossimilhança (MV) e inferência bayesiana (IB). As análises de MV e o teste de bootstrap foram realizadas no programa RaxML (Stamatakis, 2014) empregando a matriz de dados concatenados e utilizando o modelo de evolução GTRCAT e 1000 réplicas de bootstrap. Uma segunda análise filogenética usando MV foi empregada usando o programa Garli (Bazin *et al.*, 2014) (<http://garli.nescent.org>) e dividindo as sequências de cada gene em subconjuntos refletindo a posição do códon.

Para a realização das análises de inferência Bayesiana (IB) foi utilizada a matriz dos dados dos haplótipos do gene COI com o uso dos programas BEAUTi v2 e BEAST v2 (Bouckaert *et al.*, 2014). Foram realizadas duas corridas independentes com quatro

cadeias de 100 milhões de gerações cada. O modelo de substituição nucleotídica foi selecionado com uso do programa Partitionfinder (Lanfear *et al.*, 2012) utilizando o Bayesian Information Criterion (BIC). O modelo de substituição nucleotídica com a melhor probabilidade foi HKY+G. A árvore ultramétrica foi reconstruída utilizando o relógio relaxado do tipo log normal e como prior da árvore foi testado o modelo de Yule. As cadeias de Markov (MCMC) foram amostradas a intervalos de 1000 gerações. Um tamanho de amostra efetivo (ESS) para todas as métricas foi verificado no software Tracer v1.7 (Rambaut *et al.*, 2018) e a combinação das corridas foi realizada a partir dos arquivos log e trees utilizando LogCombiner v.2.5.0, com burn-in de 25%. Finalmente o TreeAnnotator (Rambaut & Drummond, 2015) foi utilizado para construir uma árvore de consenso, com 10% das primeiras árvores geradas descartadas. Esta configuração foi usada para obter a árvore ultramétrica empregada para a análise mista de coalescência generalizada de Yule (Generalized Mixed Yule Coalescent). Para todas as análises, *Otocinclus mura* e *O. hoppei* foram usadas como grupo externo.

### **2.3.5. Delimitação de espécies**

Para testar se os morfótipos de *Otocinclus cocama* formam uma única unidade molecular, foram utilizadas duas abordagens: Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) e o bayesian Poisson Tree Processes (bPTP). o modelo bPTP busca delimitar as espécies usando diretamente o número de substituições sem precisar de uma árvore ultramétrica (Zang *et al.*, 2013). A análise de PTP foi rodada no servidor (<https://species.h-its.org/ptp/>) usando a filogenia gerada na análise filogenética com o software RaxML com a matriz das sequências do gene COI. O método GMYC (Pons *et al.*, 2006; Fujisawa & Barraclough, 2013) também analisa dados de um único locus, mas requer uma estimativa ultramétrica da árvore genética. O GMYC utiliza os comprimentos de ramos de uma árvore ultramétrica, isto é, que considera que os táxons estão igualmente distantes da raiz para estabelecer as relações intra (eventos de coalescência) e interespecíficas (eventos de extinção e especiação). Utiliza o enfoque de probabilidade “likelihood” para identificar o limite entre um processo de especiação de Yule e a coalescência intraespecífica. Isso é feito com referência aos tempos dos nós relativos em uma árvore ultramétrica (a árvore construída usando o Beasts2, na seção da reconstrução filogenética). Apesar de haver sido desenvolvidas versões de limiar múltiplo de GMYC (Monaghan *et al.*, 2009), neste

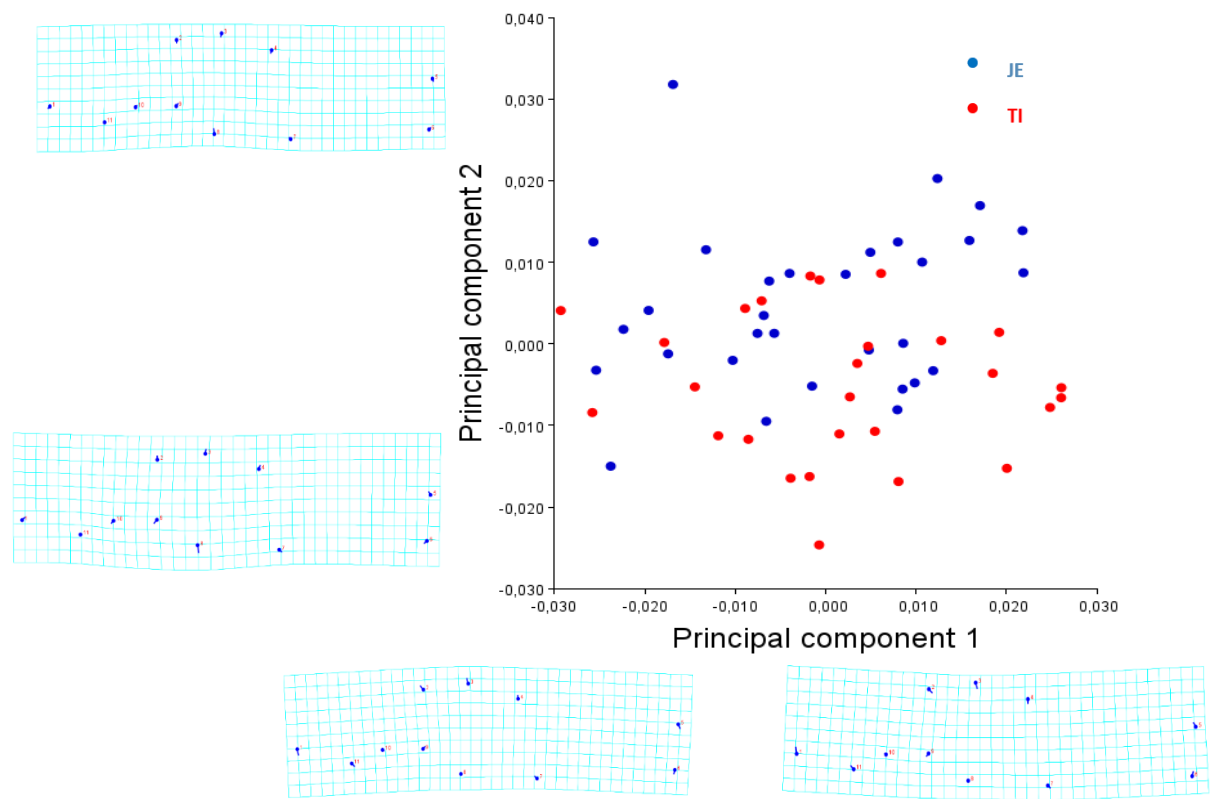
trabalho só usamos a versão do limiar único de GMYC que supera a versão limiar múltiplo segundo trabalhos prévios (Fujisawa & Barraclough, 2013; Talavera *et al.*, 2013). A análise pelo GMYC foi realizada utilizando o pacote SPLITS (SPecies LLimits by Threshold Statistics) (Ezard *et al.*, 2009) na plataforma R (<http://R-Forge.R-project.org>), utilizando um único threshold e parâmetro de intervalo padrão (intervalo = c(1,10)). Para definir o número de OTU (unidade taxonômica operacional) seguimos o enfoque integrativo usando o modelo GMYC, bPTP e morfometria geométrica como linhas independentes de evidencia para inferir o número de espécies dentro de *O. cocama* seguindo o conceito unificado de espécie proposto por De Queiroz, 2007.

### **3. Resultados**

#### 3.1. Análise dos Componentes Principais

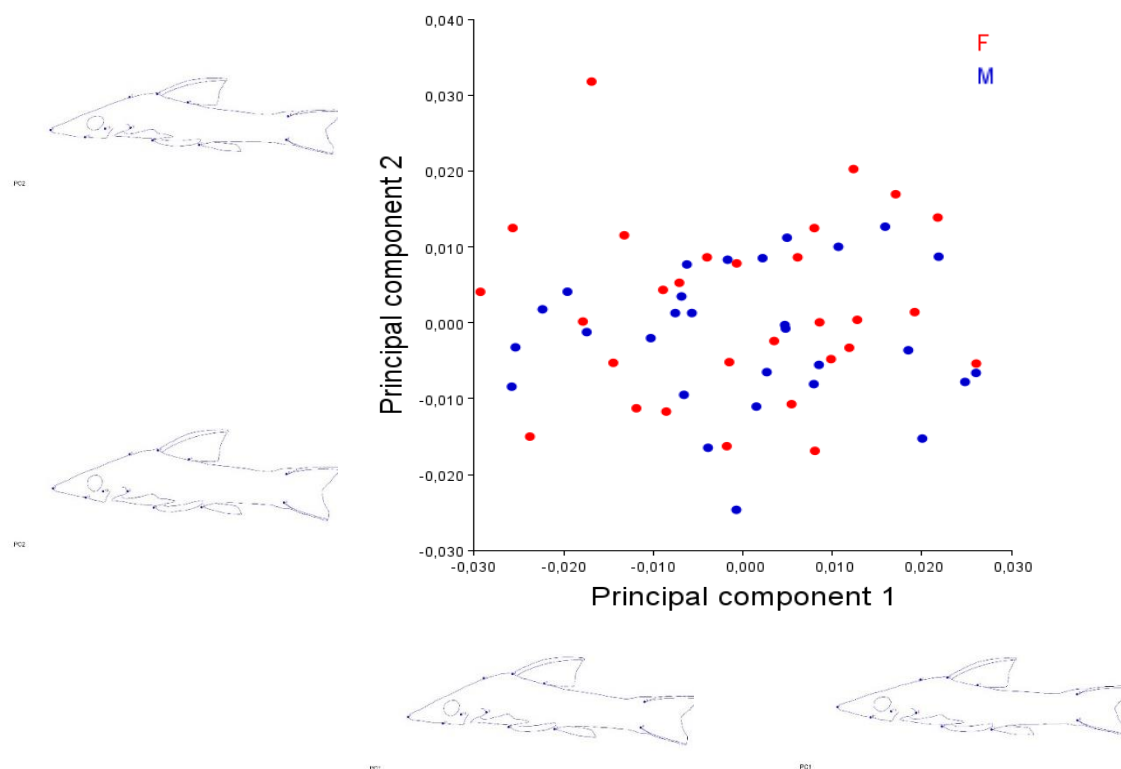
Dos 61 indivíduos incluídos nas análises morfológicas, três foram excluídos das análises por aparecerem como outliers. A Análise de Componentes Principais (ACP) para a forma lateral dos morfótipos das duas localidades de *Otocinclus cocama* não permitiu observar uma separação nítida entre as populações. Na abcissa, o PC1 inclui 28.4% da variação, e na ordenada o PC2 inclui 14.7% da variação que ocorrem na forma lateral dos indivíduos avaliados (Tabela 4). Os gráficos de agrupamento por população e sexo (Figuras 6 e 7) não evidenciaram nenhum tipo de separação com relação as condições avaliadas.





**Figura 6:** Análise dos Componentes Principais entre exemplares da população do Tigre (vermelho) e Jenaro Herrera (azul). Para cada componente principal são mostradas as grades de deformação correspondentes aos extremos negativo e positivo dos escores do PC1 e PC2.

Nenhum dos gráficos gerados por PCA obteve algum padrão de separação entre as populações avaliadas. Os pontos que, em média, mais influenciaram na variação dos eixos, foram para o PC1, a ponta posterior do processo lateral do cleitro e a borda anterior do primeiro espinho da nadadeira dorsal, e para o PC2, a ponta posterior do segundo raio procorrente ventral da cauda e a origem da nadadeira pélvica.



**Figura 7:** Análise dos Componentes Principais entre exemplares entre machos (M, azul) e fêmeas (F, vermelho) das duas populações de *Otocinclus cocama*. Os contornos de forma representam a variação da forma correspondente aos extremos negativo e positivo dos escores do PC1 e PC2.

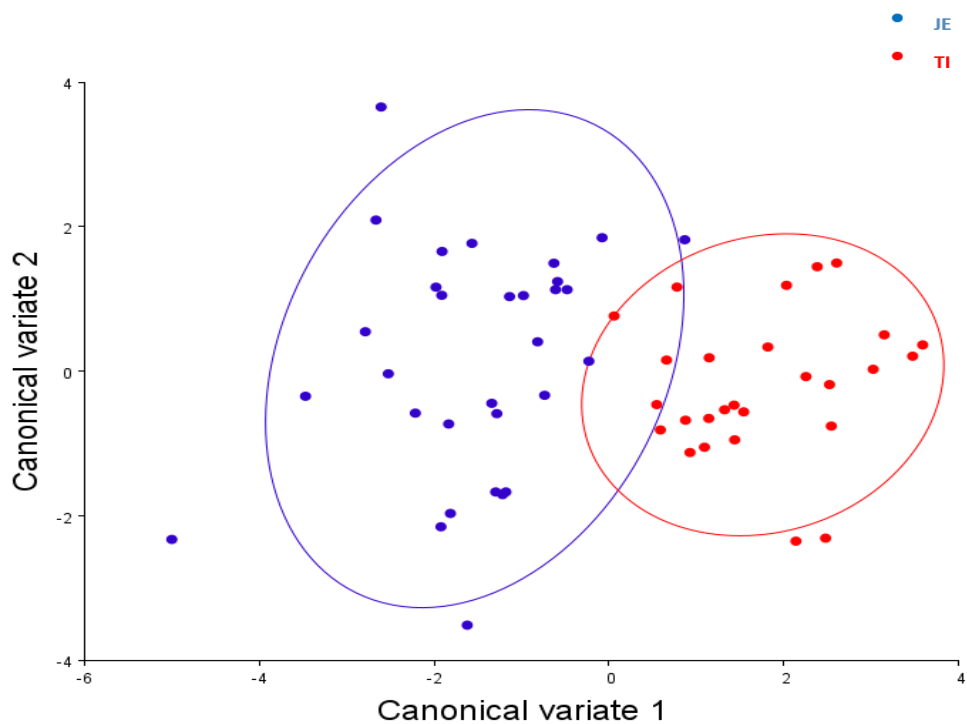
**Tabela 4:** Porcentagem de variação dos eixos da Análise dos Componentes Principais.

	Eigenvalues	% Variance	Cumulative %
1.	0,00021123	28,417	28,417
2.	0,00010981	14,773	43,189
3.	0,00010254	13,795	56,984
4.	0,00006494	8,736	65,720
5.	0,00005314	7,148	72,869
6.	0,00004723	6,354	79,222
7.	0,00002958	3,979	83,202
8.	0,00002657	3,574	86,776
9.	0,00002296	3,089	89,865
10.	0,00001743	2,345	92,210
11.	0,00001249	1,681	93,891
12.	0,00001191	1,602	95,492

13.	0,00000981	1,319	96,812
14.	0,00000682	0,917	97,729
15.	0,00000605	0,814	98,543
16.	0,0000049	0,659	99,202
17.	0,00000315	0,424	99,626
18.	0,00000278	0,374	100

### 3.2. Análise de variáveis canônicas

No gráfico da análise de variáveis canônicas para a vista lateral da forma do corpo, obteve-se o primeiro eixo canônico separando as duas populações avaliadas (Figura 8). Os indivíduos da população do Tigre representam escores mais altos no primeiro eixo canônico em relação aos indivíduos da população de Jenaro Herrera. Na função discriminante, 10 indivíduos foram classificados erroneamente (seis do morfótipo Jenaro Herrera e quatro do morfótipo do Tigre), ou seja, 16% dos 58 indivíduos que formam a amostra final (Tabela 5).



**Figura 8:** Análise de variáveis canônicas entre exemplares do morfótipo do Tigre (TI, vermelho) e entre exemplares do morfótipo de Jenaro Herrera (JE, azul).

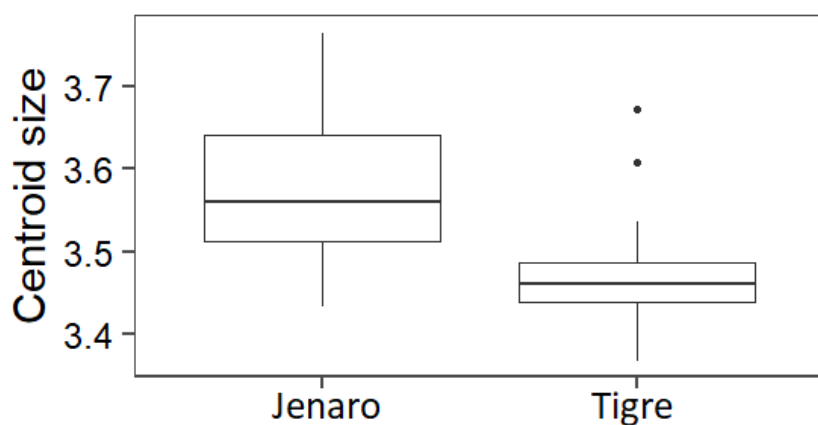
**Tabela 5:** Validação cruzada entre exemplares da população de Jenaro Herrera e da população do Tigre e suas respectivas porcentagens. Grupos originais nas linhas, agrupamentos pela Análise Discriminante nas colunas. Números em negrito correspondem aos indivíduos identificados erroneamente.

	<i>Grupos preditos</i>			<i>%</i>	
	Jenaro Herrera	Tigre	Total	JE	TI
<i>Grupos identificados</i>	Jenaro	27	<b>4</b>	31	JE 87.1 <b>12.9</b>
	Tigre	<b>6</b>	21	27	TI <b>22.2</b> 77.8
<i>Total</i>		33	25	58	

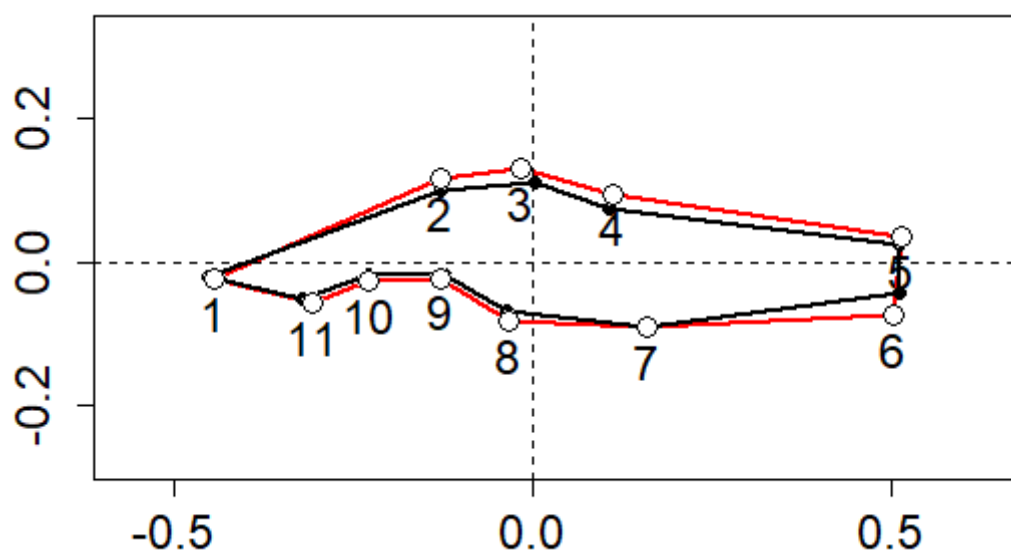
Os resultados da MANOVA (Tabela 6) evidenciaram diferenças significativas na forma do corpo dos morfótipos ( $p < 0,001$ ). O valor de F foi de 23,414 o que significa que o tamanho estaria explicando o 23.4 % da diferenciação entre os morfótipos com base no tamanho centroide. A variação do tamanho centroide médio (Figura 9) entre exemplares do morfótipo Jenaro Herrera e exemplares do morfótipo Tigre permitiu observar que exemplares da bacia do rio Tigre são menores do que os de Jenaro Herrera quanto ao tamanho centroide (Figura 9, 10).

**Tabela 6:** MANOVA par a par comparando os exemplares entre áreas. *df* = graus de liberdade; *SS* = soma dos quadrados; *MS* = média dos quadrados; *Rsq* = valor de R quadrado; *F* = valor do teste de F; *Z* = escore de Z; *p* = valor de significância.

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>Rsq</i>	<i>F</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>
<i>Populações</i>	1	0.15148	0.15148	0.29483	23.414	19.764	1e-04 ***
<i>Residuais</i>	56	0.36231	0.15148	0.70517			
<i>Total</i>	57	0.51379					



**Figura 9:** Distribuição do tamanho centróide para indivíduos da população de Jenaro Herrera e indivíduos da população do Tigre. Linha horizontal, média; linhas verticais, intervalo de confiança de 95%.



**Figura 10:** Comparação da forma média entre exemplares do morfótipo Jenaro Herrera (linhas vermelhas) e exemplares do morfótipo Tigre (linhas pretas). Números representam os marcos anatômicos.

### 3.3. Parâmetros populacionais e de diversidade gênica

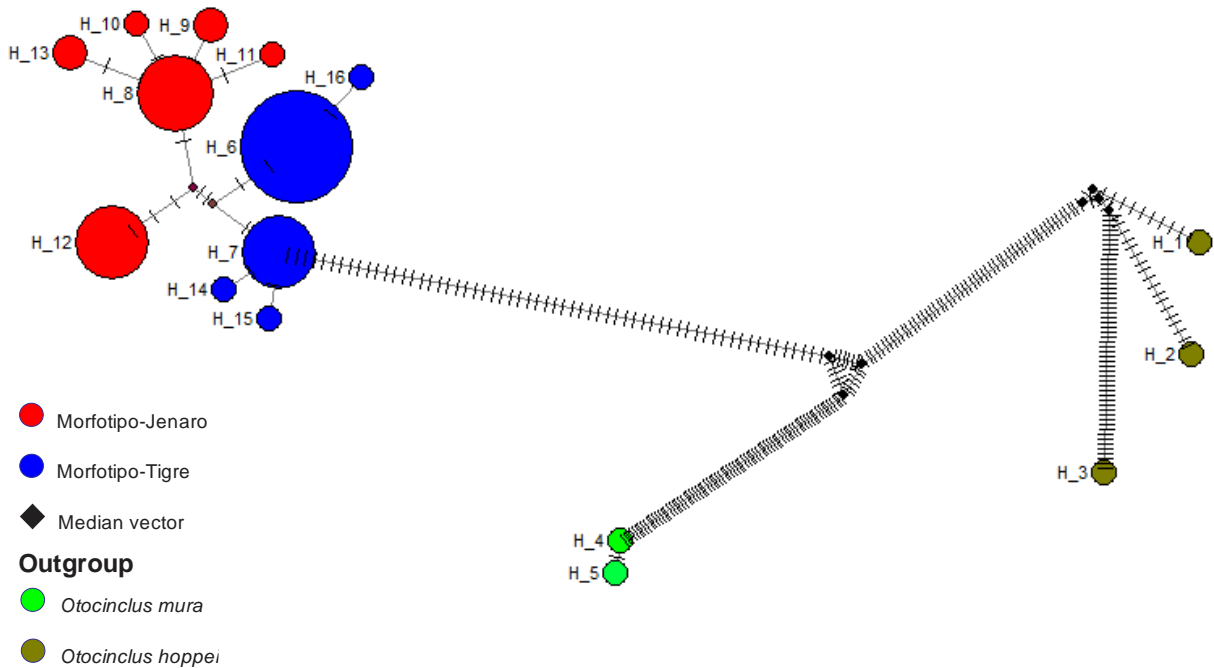
Foram obtidas 56 sequências parciais a partir de três regiões mitocondriais codificantes (coI, cytb e nd2) e uma não codificante (16s), resultando em uma matriz combinada de 3320 pares de bases (bp) (coI, 651 bp; nd2, 990 bp; 16s, 587 bp; e cytb, 1092 bp). A diversidade nucleotídica (Pi) e de haplótipos (Hd) para os dados concatenados foi de 0.00288 e 0.83247, respectivamente e foram encontrados um total de 35 sítios variáveis dos quais 21 foram informativos para parcimônia (Tabela 7).

**Tabela 7:** Número amostral de espécimes de *Otocinclus cocama* utilizados na análise (N), e parâmetros populacionais e de diversidade genéticas considerando cada gene individualmente: 16s, coI, cytb e nd2. Exemplares com muitos dados faltantes não foram considerados na análise.

<b>Parâmetros Genéticos</b>	<b>16S</b>	<b>COI</b>	<b>CYTB</b>	<b>ND2</b>	<b>Concatenado</b>
<b>N° de sequências (N)</b>	56	56	56	56	56
<b>N° de haplótipos (H)</b>	5	4	8	10	11
<b>Diversidade haplotípica (Hd)</b>	0,7174	0,6798	0,7721	0,7682	0,83247
<b>N° de bases nucleotídicas</b>	587	651	1092	990	3320
<b>N° total de sítios (excluindo gaps/ missing data)</b>	585	651	1092	990	3318
<b>N° de sítios variáveis</b>	4	4	14	13	35
<b>N° de sítios conservados</b>	579	647	1078	977	3281
<b>Sítios informativos parcimônia (P)</b>	4	3	13	9	29
<b>Diversidade nucleotídica (Pi)</b>	0,0021	0,0021	0,0041	0,0023	0,00288
	5	8	5	8	

A rede de haplótipos concatenada (Figura 11), considerando os quatro genes mitocondriais, apresentou um total de 11 haplótipos e uma estrutura genética relacionada a área geográfica de cada morfótipo, com haplótipos exclusivos e não compartilhados. Apesar de cada área geográfica ter seu próprio grupo de haplótipos, ambos morfótipos

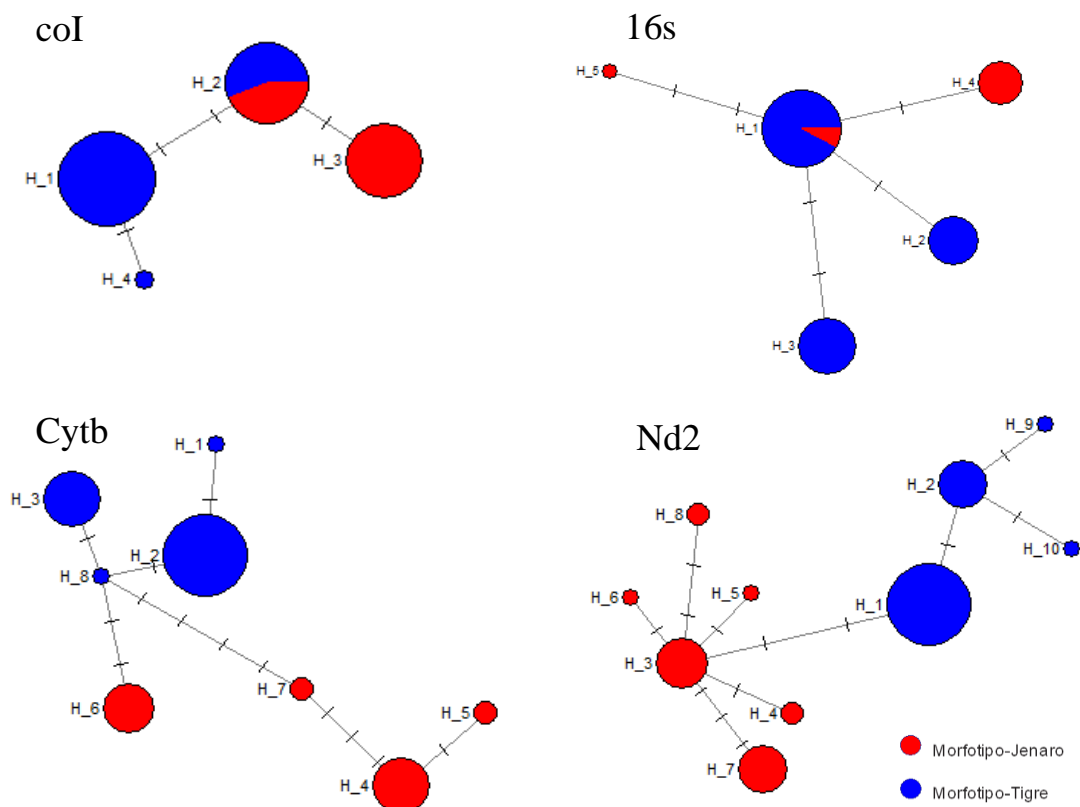
estiveram mais relacionados entre si do que com as espécies do grupo externo (*Otocinclus mura* e *O. hoppei*). As espécies do grupo externo apresentaram um número considerável de mutações separando-as do grupo interno (62 passos mutacionais), e indivíduos de *O. hoppei* apresentaram um grande número de passos mutacionais entre os exemplares avaliados, sugerindo a possibilidade de incluir mais de uma espécie.



**Figura 11:** Rede de haplótipos concatenada (coI, cytb, 16S, nd2) entre morfótipos de *Otocinclus cocama*. As barras entre os haplótipos indicam o número de mutações que os separam; o tamanho do círculo é proporcional ao número de exemplares agrupados em cada haplótipo; H = haplótipo; vetores médios = sequências não amostradas. Exemplares com muitos dados faltantes não foram considerados na análise.

A observação da rede de haplótipos para cada gene (Figura 11), possibilitou analisar o quanto cada gene mitocondrial contribuiu para a rede concatenada. De forma geral, foi observado o compartilhamento de haplótipos entre exemplares dos dois morfótipos (coI,16s), apesar de também portarem haplótipos exclusivos (cytb, nd2). Observou-se uma baixa diferenciação entre as populações, com poucas mutações separando-as. Para o gene coI (Figura 12A) obteve-se um total de 650 pb, encontrando-se quatro sítios polimórficos representados por quatro haplótipos diferentes (Hap1 e Hap4: representando

só indivíduos da população do Tigre; Hap2: representado por exemplares das populações de Jenaro Herrera e do Tigre; e hap3: representando só por exemplares da população de Jenaro Herrera). Para a região 16s (Figura 12B) obteve-se um total de 587 pb com quatro sítios polimórficos e cinco haplótipos (Hap1: representado por indivíduos do morfótipo Tigre e dois indivíduos do morfótipo Jenaro Herrera; Hap2 e Hap5: representado somente por indivíduos do Tigre; Hap3 e Hap4: representado somente por indivíduos de Jenaro Herrera). Para a região cytb (Figura 12C) obteve-se um total de 1092 pb com 14 sítios polimórficos e oito haplótipos (Hap1, Hap2, Hap3 e Hap8 representados por exemplares do morfótipo Tigre apenas; Hap4, Hap5, Hap6 e Hap7 representados por exemplares do morfótipo Jenaro Herrera apenas). Finalmente, para a região nd2 (Figura 12D) obteve-se 990 pb com 13 sítios polimórficos e 10 haplótipos (Hap1, Hap2, Hap9 e hap10 foram representados por indivíduos apenas da população do Tigre; Hap3, Hap4, Hap5, Hap6, Hap7 e Hap8 representados por indivíduos apenas da população de Jenaro Herrera).



**Figura 12:** Rede de haplótipos por gene mitocondrial. As barras entre os haplótipos indicam o número de mutações que os separam; o tamanho do círculo é proporcional ao número de exemplares agrupados em cada haplótipo; H = haplótipo.



A distância genética entre os morfótipos Tigre e Jenaro Herrera para os dados concatenados (Tabela 8), aponta que ambas as populações de *Otocinclus cocama* tem uma porcentagem de diferenciação genética de apenas 0.4%. Igualmente, a distância genética unicamente para o gene *coI* (Tabela 9), apresentou porcentagem de diferenciação genética de 0.3%. Adicionalmente, a diferenciação genética entre as espécies usadas como grupo externo (*O. hoppei* e *O. mura*) e as populações de *O. cocama* variou entre 7.4% e 8.2%.

**Tabela 8:** Distância genética percentual entre os morfótipos de *Otocinclus cocama* para os genes mitocondriais concatenados. O erro standard é apresentado na diagonal acima da distância genética. A análise usou o modelo Kimura 2 parâmetros.

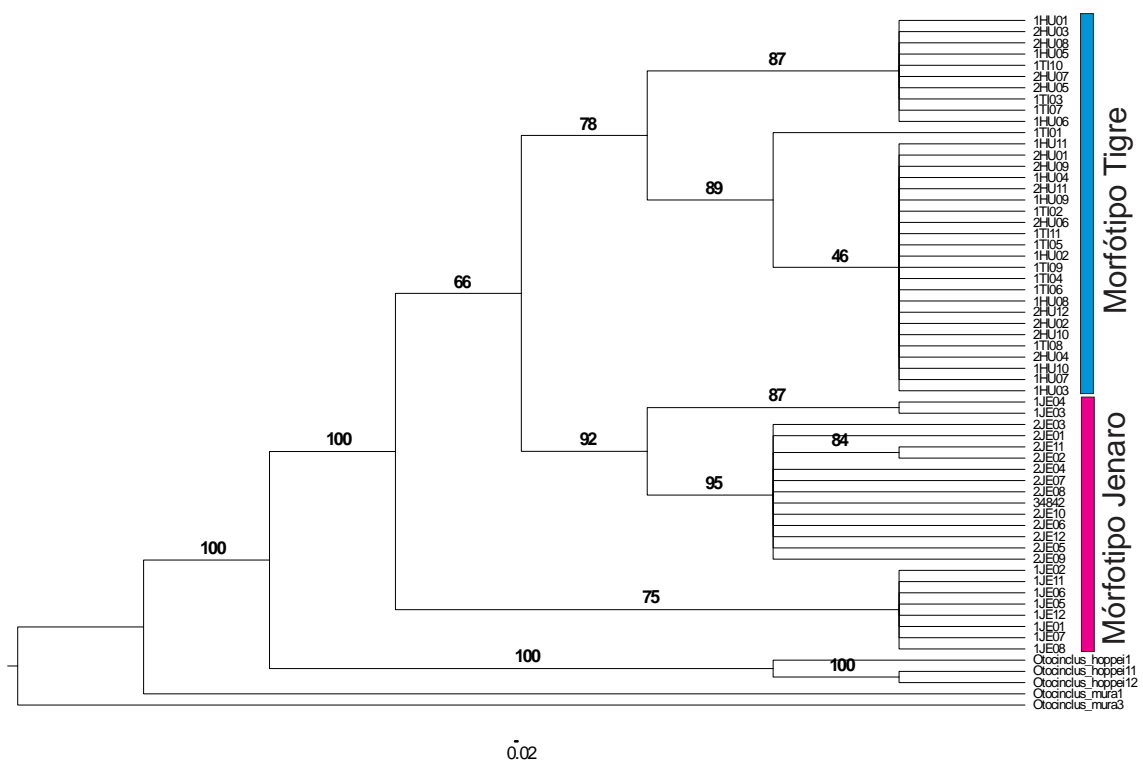
	<i>O. hoppei</i>	<i>O. mura</i>	Morfótipo Tigre	Morfótipo Jenaro
<i>O. hoppei</i>	-	0,00479	0,00423	0,00420
<i>O. mura</i>	8,257	-	0,00474	0,00481
Morfótipo Tigre	7,414	7,675	-	0,00085
Morfótipo Jenaro	7,446	7,723	<b>0,426</b>	-

**Tabela 9:** Distância genética percentual entre os morfótipos de *Otocinclus cocama* para o gene *coI*. O erro standard é apresentado na diagonal acima da distância genética. A análise usou o modelo Kimura 2 parâmetros.

	<i>O. hoppei</i>	<i>O. mura</i>	Morfótipo Tigre	Morfótipo Jenaro
<i>O. hoppei</i>	-	1,411	1,267	1,265
<i>O. mura</i>	10,137	-	1,254	1,272
Morfótipo Tigre	8,883	7,647	-	0,187
Morfótipo Jenaro	8,852	7,756	0,324	-

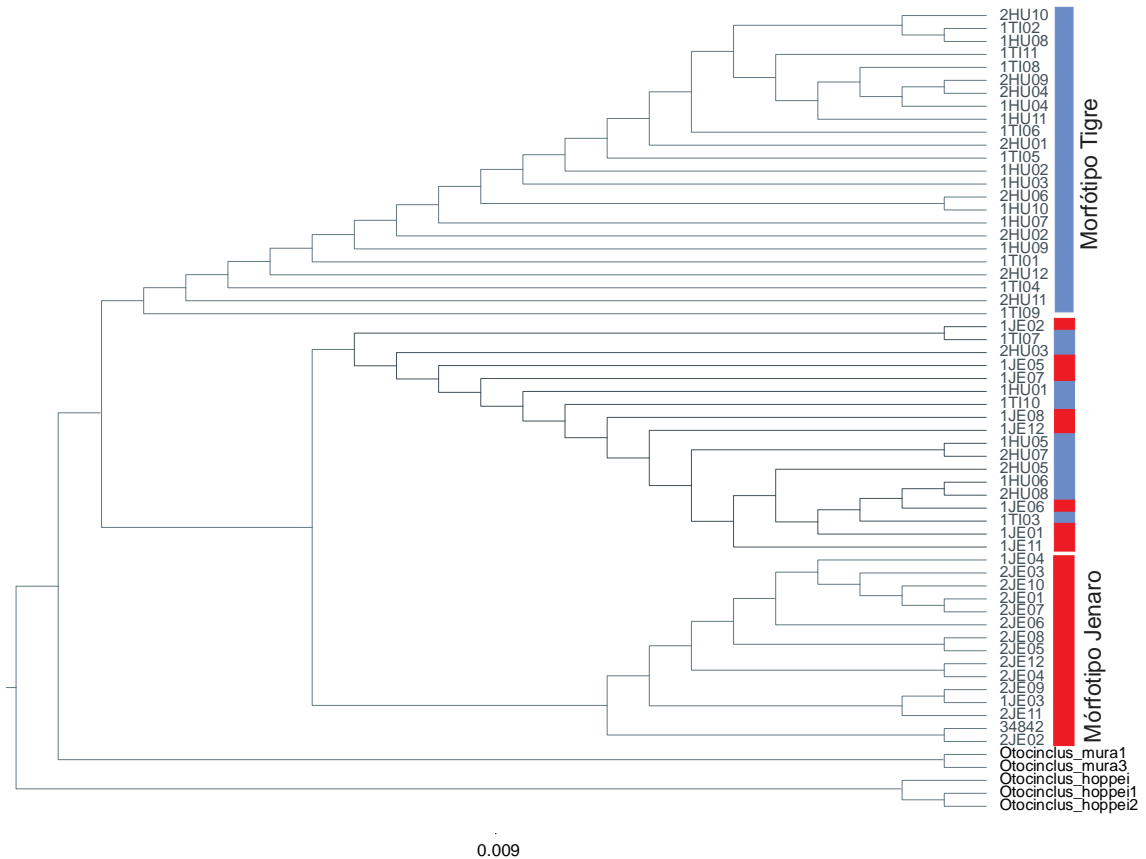
### 3.4. Reconstrução filogenética

A análise filogenética por máxima verossimilhança para os genes concatenados permitiu observar uma estruturação na relação entre os exemplares de *Otocinclus cocama* nas populações do Tigre e de Jenaro Herrera. Observou-se uma diferenciação entre os dois morfótipos: o primeiro clado formado por todos os indivíduos da bacia do rio Tigre (Barra azul na Figura 13) e mais dois clados formados pelos indivíduos da bacia do rio Ucayali (barra vermelha na Figura 13). O suporte de Bootstrap para a relação entre os exemplares do morfótipo Tigre e o parte do morfótipo Jenaro Herrera foi de 66%, e deste clado com o restante foi de 100%. Ao mesmo tempo foram observadas politomias muito grandes dentro de cada clado (Figura 13).



**Figura 13:** Reconstrução filogenética por máxima verossimilhança com base nos genes mitocondriais concatenados (coI, cytb, 16S, nd2) para as populações de *Otocinclus cocama*. Os números dos nós correspondem ao suporte de Bootstrap.

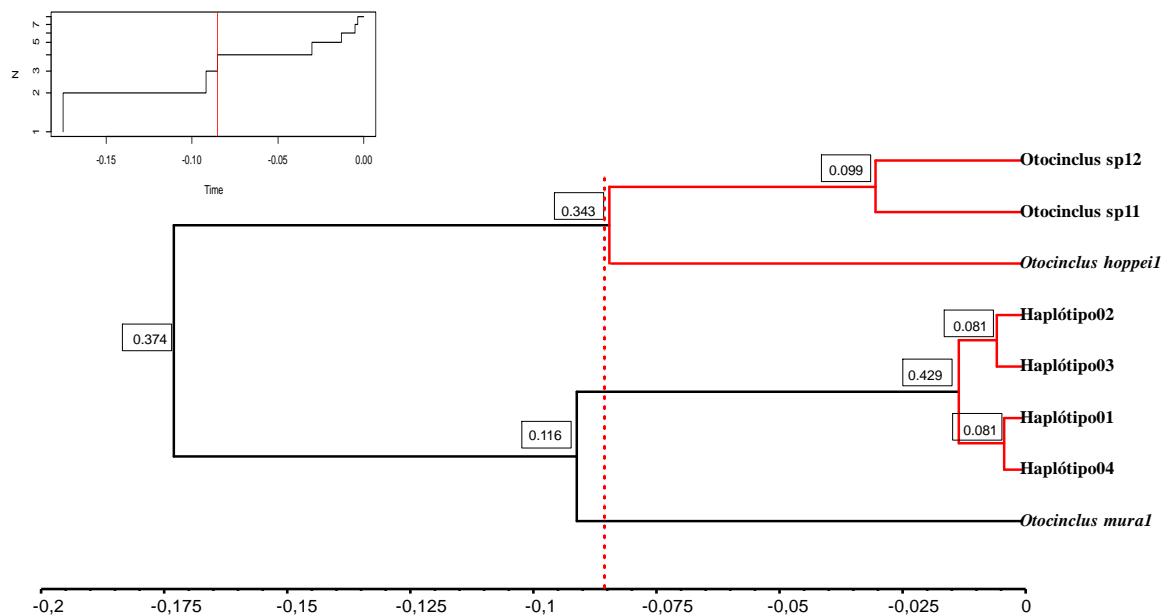
A filogenia realizada para o gene *coI* (Figura 14), apresentou dois grandes clados: o primeiro formado somente por exemplares do morfótipo Tigre, e o segundo formado por dois subclados, um deles formado somente por exemplares do morfótipo Jenaro Herrera e o segundo subclado formado por exemplares dos dois morfótipos.



**Figura 14:** Reconstrução filogenética por máxima verossimilhança (MV), com base no gene *coI* para as populações de *Otocinclus cocama*. A bacia de procedência dos exemplares está representada por barras de cor vermelho para bacia do Ucayali e barras de cor azul para a bacia do rio Tigre.

### 3.5. Delimitação de espécies

A árvore de genes obtida da análise inicial por inferência bayesiana no BEAST foi usada como base para a elaboração de uma árvore de haplótipos, eliminando terminais idênticos que induziriam a distância de ramos igual a zero. A árvore de haplótipos por inferência bayesiana foi usado na análise por GMYC para avaliar a hipótese de que cada morfótipo representa uma linhagem evolutiva independente da outra. O resultado da análise por GMYC para o gene *coI* sugeriu a existência de um único clado para *Otocinclus cocama* com máxima verossimilhança do modelo GMYC superior ao nulo e não estatisticamente significante (Lobs = 23.49013, L0 = 21.99301; P = 0.2237747n.s.), com um intervalo de confiança de 1-2 clusters. A árvore ultramétrica estimada sob o modelo de coalescência de Yule para as taxas de ramificação mostrou que o tempo limite foi de -0.08522043, sendo que o tempo antes dos nós refletem eventos de diversificação (especiação) e após os nós refletem os eventos coalescentes (Figura 15).

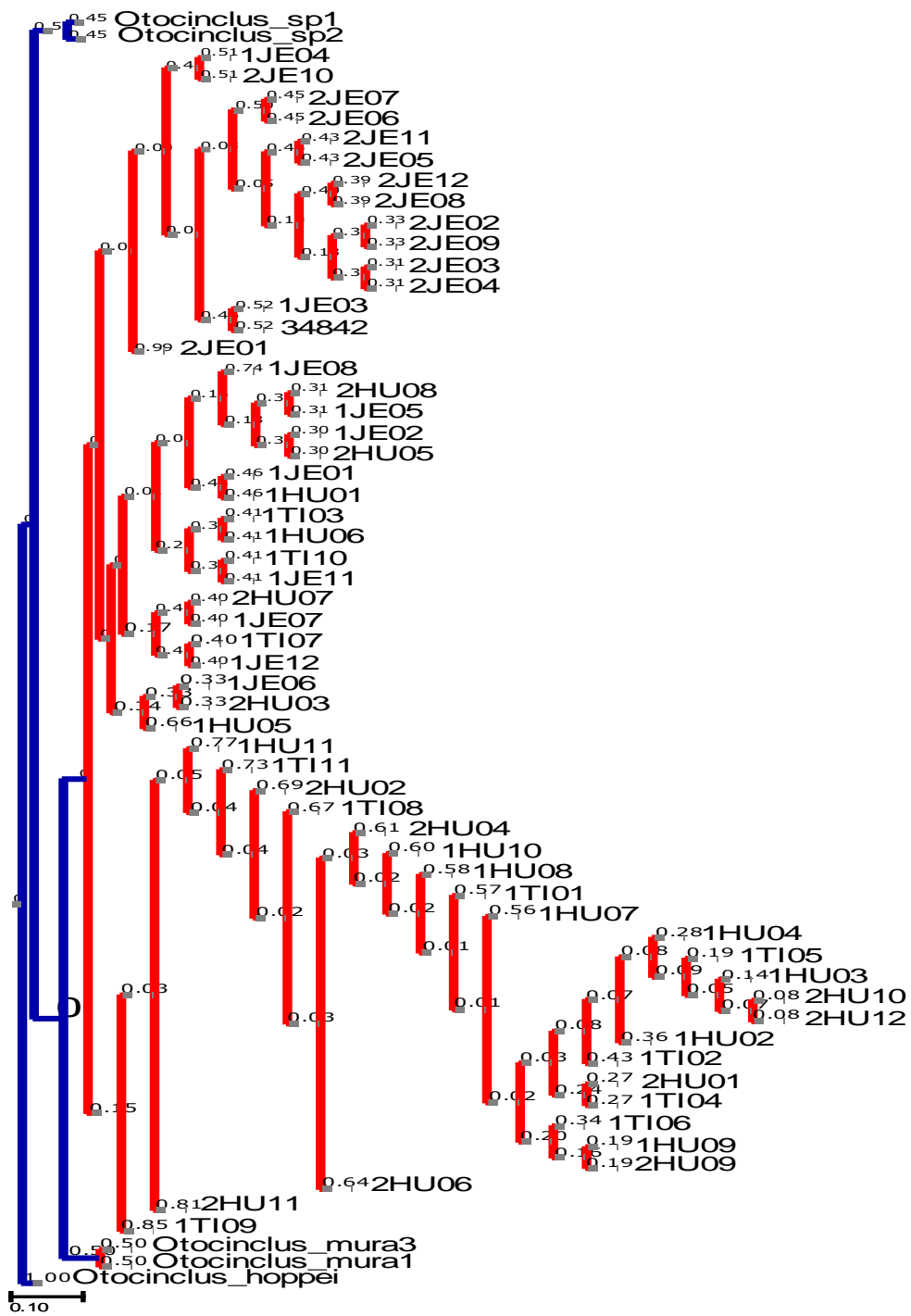


**Figura 15:** Árvore de inferência Bayesiana enraizada calibrada com relógio molecular relaxado resultante de sequências parciais do gene *coI* de *Otocinclus cocama*. Valores acima dos ramos indicam a probabilidade posterior; linha preta representa OTU distintas, linha vermelha representa a mesma OTU.

A análise de delimitação de espécies pelo método PTP demonstrou que, para a matriz do gene *coI* por máxima verossimilhança, os exemplares dos dois morfótipos de *Otocinclus cocama* foram recuperados como uma única espécie, apresentando um valor de suporte nulo (Figura 16). Adicionalmente, os três exemplares do grupo externo *O. hoppei* foram recuperadas como três diferentes espécies, enquanto que os dois exemplares de *O. mura* foram considerados uma única espécie (Tabela 10).

**Tabela 10:** Resultados do análises de delimitação de espécies pelo método bPTP.

<b>Espécies recuperadas</b>	<b>Codificação de indivíduos</b>
<b>Espécie 1</b> (support = 1.000)	<i>Otocinclus hoppei</i>
<b>Espécie 2</b> (support = 0.000)	1JE04,2JE10,2JE07,2JE06,2JE11,2JE05,2JE12,2JE08,2JE02,2JE09,2JE03,2JE04,1JE03, 34842,2JE01,1JE08,2HU08,1JE05,1JE02,2HU05,1JE01,1HU01,1TI03,1HU06, 1TI10, 1JE11,2HU07,1JE07,1TI07,1JE12,1JE06,2HU03,1HU05,1HU11,1TI11,2HU02, 1TI08, 2HU04,1HU10,1HU08,1TI01,1HU07,1HU04,1TI05,1HU03,2HU10,2HU12,1HU02,1TI02, 2HU01,1TI04,1TI06,1HU09,2HU09,2HU06,2HU11,1TI09
<b>Espécie 3</b> (support = 0.496)	<i>Otocinclus mura 3, Otocinclus mura 1</i>
<b>Espécie 4</b> (support = 0.450)	<i>Otocinclus hoppei 1</i>
<b>Espécie 5</b> (support = 0.450)	<i>Otocinclus hoppei 2</i>



**Figura 16:** Árvore de delimitação de espécies de *Otocinclus* pelo bPTP. A cor azul representa OTU distintas, enquanto que a cor vermelha representa a mesma OTU.

#### 4. Discussão

Loricariidae, como documentado em muitos estudos (Lujan *et al.*, 2011, 2015; Silva *et al.*, 2016; Roxo *et al.*, 2019), é um grupo de classificação controversa. A plasticidade fenotípica dos grupos dificulta o estabelecimento de caracteres diagnósticos que permita a delimitação de espécies baseados na morfologia (Armbruster, 2004; Armbruster & Page, 2006; Ferraris, 2007). Nestes casos, as análises moleculares tem sido utilizadas para delimitar espécies crípticas e validar táxons na medida em que os Motu são consideradas entidades taxonômicas segundo o conceito de espécie, portanto, métodos e análises integrativos são recomendados (Padial *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2018).

Em geral, as análises de morfometria geométrica revelaram que tanto o tamanho como a forma do corpo variam dentro de cada população de *Otocinclus cocama*. Mesmo que esta variação na forma não tenha sido detectada na Análise dos Componentes Principais (ACP), pela sobreposição de indivíduos da população de Jenaro Herrera e indivíduos da população do Tigre, a Análise de Variáveis Canônicas (AVC) recuperou os dois morfótipos como unidades distintas (95% de confiança nas elipses AVC), permitindo observar uma separação entre as duas populações. Essa separação poderia ser explicada pelas características ambientais de cada habitat no local de coleta, o riacho Yanayacu na bacia do rio Ucayali e os pequenos corpos de água na bacia do rio Tigre. A distância geográfica e o isolamento de duas populações de uma mesma espécie fazem com que cada população, restrita à sua localidade, desenvolva ao longo do tempo características próprias e distintivas. O distanciamento geográfico também impede ou limita o fluxo gênico entre populações, reforçando ainda mais o seu isolamento e estruturação (Lowe-McConnell, 1969; Frankham *et al.*, 2002). De fato, estudos em outros loricarídeos mostraram a estreita relação entre a diversidade morfológica e as características da paisagem (Roxo *et al.*, 2017). Em particular, a maioria das diferenças marcantes na forma nos morfótipos estão relacionadas a mudanças na altura do corpo (desde a margem anterior do primeiro espinho da nadadeira dorsal até origem da nadadeira peitoral) e principalmente na altura do pedúnculo caudal (desde a ponta posterior do segundo raio procorrente dorsal até ponta posterior do segundo raio procorrente ventral) (Fig. 10), a diferença de outros estudos em loricarídeos que assinalam as mudanças na conformação

da cabeça como as mais marcantes (Lujan & Conway, 2015; Silva *et al.*, 2016; Roxo *et al.*, 2017). Os valores da função discriminante não superaram os 90% de indivíduos corretamente identificados. Para a população de Jenaro Herrera foram identificados corretamente 87% dos indivíduos, mas apenas 78% dos indivíduos da população do Tigre foram identificados corretamente. Isso indicaria que a forma do corpo possivelmente seria um caráter robusto para separar as populações de *Otocinclus cocama*. Estudos realizados em populações de *Ancistrus* indicam que a forma do corpo foi um caráter robusto para separar populações que vivem em diferentes microbacias (Reis *et al.*, 2006b). A morfometria geométrica determinou que o morfótipo do Tigre e o morfótipo de Jenaro Herrera representariam duas espécies relacionadas, o que foi refutado pela inclusão de outros métodos de discriminação de espécies que evidenciaram a similaridade das duas populações de *Otocinclus cocama*. Existe uma complexa interação entre genótipo, fenótipo e o ambiente em que uma população se encontra. Alguns trabalhos demonstram alterações fenotípicas em diferentes populações de uma mesma espécie quando amostradas em diferentes locais como, por exemplo, ambientes lóticos e lênticos (Haas *et al.* 2010; Franssen, 2011; Cureton & Broughton, 2014).

Os métodos de delimitação molecular de espécies (GMYC e bPTP) recuperaram o morfótipo Tigre e o morfótipo Jenaro como uma única unidade taxonômica, apontando a presença de uma única unidade molecular, com uma distância entre grupos de 0.4% para os dados concatenados. Na realidade, esses métodos são mais refinados do que as abordagens baseadas na distância porque levam em consideração o tempo de diversificação entre linhagens (GMYC) ou o número de substituições ao longo dos ramos (bPTP, PTP) (Kapli *et al.*, 2017). No entanto, deve ser apontado que os valores da distância genética entre as populações de *Otocinclus cocama* foram muito próximos, a divergência nas sequências *coI* entre ambos os morfótipos foi de 0,3%, sendo inferior aos valores de corte tradicionalmente usado para discriminar espécies por código de barras de DNA (Hebert *et al.*, 2003; Ratnasingham & Hebert, 2013). Diversos trabalhos com peixes neotropicais indicam que as distâncias intraespecíficas médias não ultrapassam 1% (Lara *et al.*, 2010; Rosso *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2011, 2013; Gomes *et al.*, 2015; Anjos *et al.*, 2020; Fagundes *et al.*, 2020). A notável falta de divergência genética entre populações de *Otocinclus cocama* de localidades geograficamente isoladas pela distância poderia dever-se a uma diversificação explosiva e taxas de especiação rápidas. Como foi



documentado em outros grupos (Lujan *et al.*, 2011, 2015; Silva *et al.*, 2016; Roxo *et al.*, 2019), o que deveria ser confirmado por estudos adicionais com outras populações e espécies de *Otocinclus* avaliando o modelo de diversificação explosiva proposto para *Hypostomus* em outras bacias neotropicais (Silva *et al.*, 2016). Por outro lado cabe destacar a possibilidade de que as duas populações *O. cocama* talvez não estejam completamente isoladas. Ao menos mais uma população é conhecida pelos coletores ornamentais da boca do Ucayali (na confluência com o rio Marañon e Amazonas), havendo a possibilidade de existirem outras populações intermediárias não descobertas entre Jenaro Herrera e o Tigre. De forma geral a pesar de ter encontrado certa diferenciação morfológica na forma dos espécimes dentro das populações avaliadas, *Otocinclus cocama* ainda conserva haplótipos antigos comuns às duas bacias hidrográficas, considerando alguns genes mitocondriais, mostrando pouca diferenciação genética entre seus espécimes quanto às áreas geográficas, se esses espécimes estivessem separados por tempo suficiente, provavelmente haveria maiores diferenças fenotípicas e divergência genética entre as populações resultando em diferentes espécies distribuídas ao longo das duas bacias hidrográficas.. Segundo De Queiroz (2007) a confusão entre a delimitação de espécies está associada ao fato a que diferentes métodos, incluindo diferentes propriedades (morfológico o molecular), estão focados em diferentes estados do processo de especiação. Não podemos considerar as duas populações de *O. cocama* como duas linhagens evoluindo separadamente pela possibilidade de ter possíveis populações intermediárias ainda não descobertas que poderiam manter o fluxo de genes entre as populações.

## 5. Conclusão

Com base nas várias linhas de evidência apresentadas neste estudo, e mesmo com essas barreiras geológicas evidentes, os espécimes de cada morfótipo correspondem à mesma espécie, com uma leve estruturação populacional representada pelos haplótipos comuns dos genes *coI* e *16s* entre as duas bacias hidrográficas. Os dois morfótipos de *Otocinclus cocama* são diagnosticáveis fenotipicamente apenas pelo colorido, com cada fenótipo sendo endêmico de pequenas áreas de drenagem na bacia do rio Ucayali e do rio Tigre, com divergências no número de bandas transversais ao longo do corpo. A complexidade da história de dispersão das espécies e a falta de estudos que avaliem a biogeografia do

gênero pode dar conta de casos de plasticidade fenotípica das espécies. Provavelmente, estudos com *Otocinclus* aplicando datação molecular poderão resultar em informações relevantes para a biogeografia das bacias hidrográficas da Amazônia peruana e da América do sul, devido a sua ampla distribuição e congruência com eventos geológicos.

## 6. Referências Bibliográficas

Adams, D.C.; Collyer, M.; Kaliontzopoulou, A.; Sherratt, E. 2016. Geomorph: Software for geometric morphometric analyses.

Aguirre W.; & Jiménez-Prado, P. 2018. Guía práctica de Morfometría Geométrica. Aplicaciones en la Ictiología. Pontifica Universidad Católica del Ecuador Sede Esmeralda (PUCESE). Esmeraldas, Ecuador. 104 pp.

Anjos, M.S.; Bitencourt, J.A.; Nunes, L.A.; Sarmiento-Soares, L.M.; Carvalho, D.C.; Armbruster, J.W.; Affonso, P.R. 2020. Species delimitation based on integrative approach suggests reallocation of genus in Hypostomini catfish (Siluriformes, Loricariidae). *Hydrobiologia*, 847(2), 563-578.

Aquino, A.E.; & Schaefer, S.A. 2010. Systematics of the Genus Hypoptopoma Günther, 1868 (Siluriformes, Loricariidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 336: 1-110.

Armbruster, J.W. 2004. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 141(1), 1-80.

Armbruster, J.W.; & Page, L.M. 2006. Redescription of *Pterygoplichthys punctatus* and description of a new species of *Pterygoplichthys* (Siluriformes: Loricariidae). *Neotropical Ichthyology*, 4(4), 401-410.

Arroyave, J.; Denton, J.S.; Stiassny, M.L. 2013. Are characiform fishes Gondwanan in origin? Insights from a time-scaled molecular phylogeny of the Citharinoidei (Ostariophysi: Characiformes). *PLoS One*, 8(10).

Ashley, P.J. 2007. Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, Amsterdam, v. 104, n. 3-4, p. 199-235.

Axenrot, T.E. & Kullander, S.O. 2003. *Corydoras diphyes* (Siluriformes: Callichthyidae) and *Otocinclus mimulus* (Siluriformes: Loricariidae), two new species of catfishes from Paraguay, a case of mimetic association. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 14(3): 249-272.

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

Bazinnet, A.L.; Zwickl, D.J.; Cummings, M.P. 2014. A gateway for phylogenetic analysis powered by grid computing featuring GARLI 2.0. *Systematic biology*, 63(5), 812-818.

Bookstein, F.L. 1991. Thin-plate splines and the atlas problem for biomedical images. In Biennial International Conference on Information Processing in Medical Imaging (pp. 326-342). Springer, Berlin, Heidelberg.

Bouckaert, R.; Heled, J.; Kühnert, D.; Vaughan, T.; Wu, C.H.; Xie, D.; ... & Drummond, A.J. 2014. BEAST2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput Biol*, 10(4).

Britto, M.R.; & Moreira, C.R. 2002. *Otocinclus tapirape*: a new hypoptopomatine catfish from central Brazil (Siluriformes: Loricariidae). *Copeia*, 1063-1069.

Chiachio, M.C.; Oliveira, C.; Montoya-Burgos, J.I. 2008. Molecular Systematics and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49: 606-617.

Cramer, C.A.; Bonatto, S.L.; Reis, R.E. 2011. Molecular phylogeny of the Neoplecostominae and Hypoptopomatinae (Siluriformes: Loricariidae) using multiple genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59:43-52

Cureton, J.C.; & Broughton, R.E. 2014. Rapid morphological divergence of a stream fish in response to changes in water flow. *Biology Letters*, 10(6).

De Queiroz K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*; 56:879–886.

Delapieve, M.L.S.; Lehmann, A.; Reis, R.E. 2017. An appraisal of the phylogenetic relationships of Hypoptopomatini cascudinhos with description of two new genera and three new species (Siluriformes: Loricariidae). *Neotropical Ichthyology*, 15(4).

Eschmeyer, W.N.; & Fong, J.D. 2013. Species of Fishes by family/subfamily. On-line version dated 10.12.2020.

Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47–50.

Ezard, T.; Fujisawa, T.; Barraclough, T. 2009. splits: SPecies' LLimits by Threshold Statistics. Rpackage version 1.0-11/r29. Available from <http://R-Forge.R-project.org/projects/splits/>.

Fagundes, P.C.; Pereira, E.H.; Reis, R.E. 2020. Iterative taxonomic study of *Pareiorhaphis hystrix* (Siluriformes, Loricariidae) suggests a single, yet phenotypically variable, species in south Brazil. *PloS one*, 15(9).

Ferraris, C.J. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, 1418(1), 1-628.

Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294-299.

Fornel, R.; Cordeiro-Estrela, P.; Freitas, T.R.O. 2010. Skull shape and size variation in *Ctenomys minutus* (Rodentia:Ctenomyidae) in geographical, chromosomal polymorphism, and environmental contexts. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101, 705–720.

Fornel, R.; & Cordeiro-Estrela, P. 2012. Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. *Temas em Biologia: Edição comemorativa aos, 20*, 101-120.

Frankham, R. 2005. Stress and adaptation in conservation genetics. *Journal of evolutionary biology*, 18(4), 750-755.

Franssen, N.R.; Stewart, L.K.; Schaefer, J.F. 2013. Morphological divergence and flow-induced phenotypic plasticity in a native fish from anthropogenically altered stream habitats. *Ecology and evolution*, 3(14), 4648-4657.

Fujisawa, T.; & Barraclough, T.G. 2013. 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(5), 707-724.

Gauger, M.F.W.; & Buckup, P.A. 2005. Two new species of Hypoptopomatinae from the rio Paraíba do Sul basin, with comments on the monophyly of Parotocinclus and the Otothyriini (Siluriformes: Loricariidae). *Neotropical Ichthyology*, 3(4): 509-518.

Gomes, L.C.; Pessali, T.C.; Sales, N.G.; Pompeu, P.S.; Carvalho, D.C. 2015. Integrative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a neotropical river basin. *Genetica*, 143(5):581–588.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series*, Vol. 41, No. 41, pp. 95-98.

Haas, B.; McGee, J.; Fleming, A.; Haward, M. 2020. Factors influencing the performance of regional fisheries management organizations. *Marine Policy*, 113.

Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L.; de Waard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270, 313–321.

Jones, M.; Ghoorah, A.; Blaxter, M. 2011. jMOTU and taxonerator: turning DNA barcode sequences into annotated operational taxonomic units. *PLoS one*, 6(4).

Kapli, P.; Lutteropp, S.; Zhang, J.; Kobert, K.; Pavlidis, P.; Stamatakis, A.; Flouri, T. 2017. Multi-rate Poisson Tree Processes for single-locus species delimitation under Maximum Likelihood and Markov Chain Monte Carlo. *Bioinformatics* btx025.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.

Klingenberg, C.P. 2002. Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. *Gene*, 287(1-2), 3-10.

Klingenberg, C.P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular ecology resources*, 11(2), 353-357.

Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547-1549.

Lanfear, R.; Calcott, B.; Ho, S.; Guindon, S. 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*, 29(6), 1695-1701.

Lara, A.; Ponce de León, J.L.; Rodriguez, R.; Casane, D.; Cote, G.; Bernatchez, L.; Garcia-machado, E.R. I.K. 2010. DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Molecular ecology resources*, 10(3), 421-430.

Lehmann, P.A. 2006. Anatomia e relações filogenéticas da família Loricariidae (Ostariophysi: Siluriformes) com ênfase na subfamília Hypoptopomatinae. Tese de doutorado vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 420p.

Lehmann, P. A.; Meyer, F.; Reis, R.E. 2010. Re-validation of *Otocinclus arnoldi* Regan and reappraisal of *Otocinclus* phylogeny (Siluriformes: Loricariidae). *Neotropical Ichthyology*, 8(1): 57-68.

Lehmann, P.A.; Braun, B.K.; Pereira, E.H.L.; Reis, R.E. 2013. A new species of the Hypoptopomatinae catfish *Parotocinclus* (Siluriformes, Loricariidae), from the headwaters of the Rio Jequitinhonha, Brazil. *Copeia*, 2013, 435–440.

Librado, P.; & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.

Lowe-McConnell, R.H. 1969. Speciation in tropical freshwater fishes. *Biological Journal of the Linnean society*, 1(1-2), 51-75.

Lujan, N.K.; & Conway, K.W. 2015. Life in the fast lane: a review of rheophily in freshwater fishes. *Extremophile fishes*, 107-136.

Lujan, N.K.; German, D.P.; Winemiller, K.O. 2011. Do wood-grazing fishes partition their niche?: morphological and isotopic evidence for trophic segregation in Neotropical Loricariidae. *Functional Ecology*, 25(6), 1327-1338.

Lujan, N.K.; Armbruster, J.W.; Lovejoy, N.R.; López-Fernández, H. 2015. Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae)

with a focus on subfamily Hypostominae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82:269-288.

Monaghan, M.T.; Wild, R.; Elliot, M.; Fujisawa, T.; Balke, M.; Inward, D.J.; ... & Vogler, A.P. 2009. Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Systematic biology*, 58(3), 298-311.

Monteiro-Filho, E.L.D.A.; Monteiro, L.R.; dos Reis, S.F. 2002. Skull shape and size divergence in dolphins of the genus *Sotalia*: a tridimensional morphometric analysis. *Journal of Mammalogy*, 83(1), 125-134.

Padial, J.M.; Miralles, A.; De la Riva, I.; Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in zoology*, 7(1), 1-14.

Palumbi, S.R.; Martin, A.; Romano, S.; McMillan, W.O.; Stice, L.; Grabowski, G. 1991. The simple fool's guide to PCR, version 2.0. University of Hawaii, Honolulu, 45.

Paradis, E.; & Schliep, K. 2019. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35(3), 526-528.

Pereira, L.H.; Hanner, R.; Foresti, F.; Oliveira, C. 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. *BMC genetics*, 14(1), 1-14.

Pereira, L.H.G.; Maia, G.M.G.; Hanner, R.; Foresti, F.; Oliveira, C. 2011. DNA Barcodes discriminate fresh water fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22:71-79.

Pereira, L.H.; Hanner, R.; Foresti, F.; Oliveira, C. 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. *BMC genetics*, 14(1), 1-14.

Pons, J. 2006. DNA-based identification of preys from non-destructive, total DNA extractions of predators using arthropod universal primers. *Molecular Ecology Notes*, 6(3), 623-626.



Prizon, A.C.; Bruschi, D.P.; Borin-Carvalho, L.A.; Cius, A.; Barbosa, L.M.; Ruiz, H.B.; Zawadzki, C.H.; Fenocchio, A.S.; Portela-Castro, A.L. 2017. Hidden Diversity in the Populations of the Armored Catfish *Ancistrus Kner, 1854* (Loricariidae, Hypostominae) from the Paraná River Basin Revealed by Molecular and Cytogenetic Data. *Front Genet.* 185(8):1-13.

Rambaut, A.; & Drummond, A.J. 2015. TreeAnnotator: MCMC output analysis. Version 2.3.0.

Rambaut, A.; Drummond, A.J.; Xie, D.; Baele, G.; Suchard, M.A. 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic biology*, 67(5), 901.

Ratnasingham, S.; Hebert, P.D.N. 2013. A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) system. *PLoS ONE*, 8, e66213.

Reis, R.E. 2004. *Otocinclus cocama*, a new uniquely colored loricariid catfish from Peru (Teleostei: Siluriformes), with comments on the impact of taxonomic revisions to the discovery of new taxa. *Neotropical Ichthyology*, 2: 109-115.

Reis, R.E.; Pereira, E.H.L.; Armbruster, J.W. 2006a. Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 147: 277-299.

Reis, R.E.; Trajano, E.; Hingst-Zaher, E. 2006b. Shape variation in surface and cave populations of the armoured catfishes *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Sao Domingos karst area, upper Tocantins River, Brazil. *Journal of Fish Biology*, 68(2), 414-429.

Rohlf, F. 2008. tpsRelw. Version 1.46. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, New York.

- Rohlf, F. 2013. TPSdig, v. 2.17. State University at Stony Brook, New York.
- Rohlf, F.J.; & Marcus, L.F. 1993. A revolution morphometrics. *Trends in ecology & evolution*, 8(4), 129-132.
- Rohlf, F.J.; & Slice, D. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic biology*, 39(1), 40-59.
- Rosso, J.J.; Mabragaña, E.; Gonzalez-Castro, M.; Díaz de Astarloa, J.M. 2012. DNA barcoding neotropical fishes: recent advances from the Pampean plain, Argentina. *Molecular Ecology Resources*, 12(6), 999-1011.
- Roxo, F.F.; Lujan, N.K.; Tagliacollo, V.A.; Waltz, B.T.; Silva, G.S.; Oliveira, C.; Albert, J.S. 2017. Shift from slow-to fast-water habitats accelerates lineage and phenotype evolution in a clade of Neotropical suckermouth catfishes (Loricariidae: Hypoptopomatinae). *PloS one*, 12(6), e0178240.
- Roxo, F.F.; Ochoa, L.E.; Sabaj, M.H.; Lujan, N.K.; Covain, R.; Silva, G.S.; ... & Oliveira, C. 2019. Phylogenomic reappraisal of the Neotropical catfish family Loricariidae (Teleostei: Siluriformes) using ultraconserved elements. *Molecular phylogenetics and evolution*, 135, 148-165.
- Schaefer, S.A. 1991. Phylogenetic analysis of the loricariid subfamily Hypoptopomatinae (Pisces: Silurioidei), with comments on generic diagnoses and geographic distribution. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 102: 1-41.
- Schaefer, S.A. 1997. The Neotropical cascudinhos: systematic and biogeography of the *Otocinclus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 148: 1-120.
- Schaefer, S.A. 1998. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). Pp. 375-400 in. Malabarba,

L.R., R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena & C.A.S. Lucena (eds) *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, Edipucrs, Porto Alegre, 603 p.

Schlager, S. 2017. Morpho and Rvcg–Shape Analysis in R: R-Packages for geometric morphometrics, shape analysis and surface manipulations. In *Statistical shape and deformation analysis* (pp. 217-256). Academic Press.

Silva, G.S.; Roxo, F.F.; Lujan, N.K.; Tagliacollo, V.A.; Zawadzki, C.H.; Oliveira, C. 2016. Transcontinental dispersal, ecological opportunity and origins of an adaptive radiation in the Neotropical catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular ecology*, 25(7), 1511-1529.

Souza, C.R.; de Mello, P.R.; de Araújo Bitencourt, J.; Sampaio, I.; Carneiro, P.L. 2018. Species validation and cryptic diversity in the *Geophagus brasiliensis* Quoy & Gaimard, 1824 complex (Teleostei, Cichlidae) from Brazilian coastal basins as revealed by DNA analyses. *Hydrobiologia*, 809(1), 309-321.

Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.

Talavera, G.; Dincă, V.; Vila, R. 2013. Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(12), 1101-1110.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.

Zhang, J.; Kapli, P.; Pavlidis, P.; Stamatakis, A. 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869-2876.