

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Zoologia

Eric Bruschi Haddad

**Análise taxonômica e história natural de *Phalloceros* Eigenmann 1907
(Actinopterygii: Atherinomorpha: Cyprinodontiformes: Poeciliidae) com
distribuição no Quadrilátero Ferrífero, drenagens do alto rio Doce e São
Francisco, MG**

Belo Horizonte – Minas Gerais

2022

Eric Bruschi Haddad

**Análise taxonômica e história natural de *Phalloceros* Eigenmann 1907
(Actinopterygii: Atherinomorpha: Cyprinodontiformes: Poeciliidae) com
distribuição no Quadrilátero Ferrífero, drenagens do alto rio Doce e São
Francisco, MG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Vieira

Coorientadora: Dra. Tatiana Moura Barroca

Belo Horizonte – Minas Gerais

Agosto/2022

043 Haddad, Eric Bruschi.

Análise taxonômica e história natural de *Phalloceros* Eigenmann 1907 (Actinopterygii: Atherinomorpha: Cyprinodontiformes: Poeciliidae) com distribuição no Quadrilátero Ferrífero, drenagens do alto rio Doce e São Francisco, MG [manuscrito] / Eric Bruschi Haddad. – 2022.

86 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Vieira. Coorientadora: Dra. Tatiana Moura Barroca.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

CDU: 591



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Eric Bruschi Haddad

Ao trigésimo primeiro dia do mês de agosto do ano de dois mil e vinte e dois, às quatorze horas, na Universidade Federal de Minas Gerais, teve lugar a defesa de Mestrado da Pós-Graduação em Zoologia, de autoria do Mestrando Eric Bruschi Haddad intitulada: "**Análise taxonômica e história natural de *Phalloceros Eigenmann 1907 (Actinopterygii: Cyprinodontiformes: Poeciliidae)* com distribuição no Quadrilátero Ferrífero, drenagens do alto do rio Doce e São Francisco, MG**". Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, o Prof. Dr. Fábio Vieira, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra para o candidato para apresentação de seu trabalho.

Esteve presente a Banca Examinadora composta pelos membros: Gilmar Bastos Santos, Mauro Luís Triques, e demais convidados. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato.

Após a arguição, apenas os Srs. Examinadores permaneceram na sala para avaliação e deliberação acerca do resultado final, a saber: a dissertação foi:

- Aprovada sem alterações
 Aprovada com alterações (observações em anexo)
 Reprovada

Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 31 de agosto de 2022.

Comissão Examinadora	Assinatura
Prof. Dr. Fábio Vieira (orientador)	
Prof. Dr. Gilmar Bastos Santos	
Prof. Dr. Mauro Luís Triques	

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, eu gostaria de agradecer imensamente ao meu orientador professor Dr. Fábio Vieira que me ensinou grande parte dos meus conhecimentos de ictiologia atual, me guiando durante toda minha carreira acadêmica e científica, principalmente nessa dissertação. Também, agradeço minha coorientadora Dra. Tatiana Moura Barroca por todo o suporte acadêmico na realização e produção desta dissertação, ainda mais nesses tempos pandêmicos.

Agradeço aos professores prof. Dr. Gilmar Bastos Santos e Dr. Mauro Luís Triques e Dr. José Eustáquio dos Santos Júnior por aceitarem participarem da minha banca avaliadora e por todas as contribuições dadas a este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de mestrado que me permitiu focar nos estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo apoio financeiro para realizar as análises necessárias do trabalho.

Aos meus pais, Rosmari Bruschi Gonçalves e Vladimir Queiroz Haddad, por todo o suporte ao longo desses anos e por terem me fornecido todas as oportunidades necessárias para eu seguir meus sonhos.

Ao programa de pós-graduação em Zoologia, todos os professores e colegas e ao meu comitê de acompanhamento (Dra. Gisele Kawauchi e Dr. Mauro Triques).

Aos meus amigos, em especial Daniel, Kivia, Bianca, Júlia, Letícia, Msc Victor e Dante que me aturaram e me ouviram todos os dias minhas reclamações, derrotas e vitórias; à Maria Augusta (Guta), que sempre me apoiou mesmo estando longe e me deu todo suporte que eu poderia pedir; à minha psicóloga Denise Bastos que me ouviu durante todo o mestrado. E a todos os outros amigos e colegas presentes na minha trajetória e que me apoiaram.

“Just keep swimming”, Dori.

Estrutura da Dissertação

A presente dissertação encontra-se dividida em dois capítulos, conforme descritos a seguir.

O capítulo 1 consiste de um estudo sobre a variabilidade morfológica e genética encontrada em populações de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008 das drenagens do alto rio Doce e alto São Francisco, MG, região reconhecida como Quadrilátero Ferrífero. Neste capítulo, analisamos os fenótipos encontrados em diferentes populações e discutimos hipóteses que buscam explicar como ocorre a manutenção dos padrões de coloração.

O capítulo 2 consiste de um estudo de história natural, com foco no uso de itens alimentares e características reprodutivas das populações de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008 da região do Quadrilátero Ferrífero. Neste capítulo, analisamos a frequência ocorrência para os itens alimentares utilizados entre populações, além de avaliação da superfecundação para a espécie.

Sumário

Capítulo 1 – Variabilidade morfológica e genética em populações de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008 (Actinopterygii: Cyprinodontiformes: Poeciliidae) das drenagens do alto rio Doce e alto São Francisco, MG

Resumo	
Abstract	
Lista de ilustrações	
Lista de tabelas	
Lista de siglas e abreviaturas	
1. Introdução	1
2. Materiais e métodos	4
2.1 Área de estudo	4
2.2 Análises morfológicas	7
2.3 Análises moleculares	8
3. Resultados	11
4. Discussão	20
5. Referências bibliográficas	26
6. Anexos	31
6.1 Anexo 1 – Representação gráfica do teste de normalidade do comprimento total dos machos e do comprimento do gonopódio em machos	31
6.2 Anexo 2 – Distância genética das sequências do gene mitocondrial COI de <i>Phalloceros</i> Eigenmann, 1907, no modelo K2P	32

Capítulo 2 – Aspectos da história natural, foco em conteúdo estomacal e características reprodutivas, de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008 (Actinopterygii: Cyprinodontiformes: Poeciliidae) nas drenagens do alto rio Doce e alto São Francisco, MG

Resumo	
Abstract	
Lista de ilustrações	
Lista de tabelas	
Lista de siglas e abreviaturas	
1. Introdução	1
2. Materiais e métodos	3
3. Resultados	10
4. Discussão	18
5. Referências bibliográficas	23
6. Anexos	27
6.1 Anexo 1 – Representação gráfica do teste de normalidade do número de embriões das fêmeas e comprimento total das mesmas	27

**Capítulo 1 – Variabilidade morfológica e genética em
populações de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008
(Actinopterygii: Cyprinodontiformes: Poeciliidae) no
Quadrilátero Ferrífero, drenagens do alto rio Doce e alto
São Francisco, MG.**

Resumo

O gênero *Phalloceros* Eigenmann, 1907 é um dos 27 descritos e válidos da família Poeciliidae, sendo representado por 22 espécies de pequeno porte distribuídas na América do Sul. Para descrição da totalidade das espécies foram empregados exclusivamente dados morfológicos. Entretanto, com o avanço de técnicas moleculares a validade de algumas passou a ser questionada. Dentre as espécies, *Phalloceros uai* Lucinda, 2008 é diagnosticado autapomorficamente por uma mancha lateral grande e quadrada na lateral do corpo em exemplares maiores e com distribuição restrita a uma única localidade no rio das Velhas, bacia do rio São Francisco. Trabalhos posteriores ampliaram a distribuição na drenagem do rio das Velhas e em sub-bacias adjacentes, rios Piracicaba e Santo Antônio, ambos pertencentes a bacia do rio Doce. Frente às divergências no conhecimento atual acerca da distribuição geográfica e reconhecimento morfológico e genético adequado da espécie, o objetivo principal desse trabalho foi avaliar através da taxonomia integrativa, o real status dos exemplares identificados como *P. uai* nas drenagens superiores dos rios Doce e São Francisco. Os exemplares foram obtidos entre 2020-2021 de quatro pontos distribuídos no alto rio Doce e no alto rio São Francisco. As análises morfológicas compreenderam a medição do comprimento total e padrão, altura e comprimento do gonopódio e análise visual de estruturas ósseas pelo método de diafanização. As análises moleculares foram realizadas a partir da técnica de *DNA barcoding* utilizando gene mitocondrial COI. Foram coletados 1622 exemplares, sendo 997 fêmeas, 479 machos e 186 juvenis. Desses peixes foram registrados seis morfotipos com relação ao padrão de manchas. O comprimento total dos peixes variou de 8,21 – 48,60 mm, o padrão de 6,67 – 42,17 mm, enquanto a altura teve variação de 0,87 – 11,47 mm. O comprimento do gonopódio relaciona positivamente com o comprimento total, sendo que para o aumento de um milímetro no comprimento total do exemplar, é esperado um acréscimo de 0,36 milímetros no comprimento do gonopódio. Foram observadas diferenças significativas nos valores médios dos comprimentos do gonopódio, porém não foram evidenciadas diferenças estruturais dos gonopódios entre exemplares de diferentes morfotipos e populações. As sequências genéticas de *Phalloceros* apresentaram aproximação de menos de 2% entre sequências de *P. uai* e mais de 2% entre seus congêneres. A árvore filogenética resultou em um grupo monofilético com suporte de *bootstrap* de 0,9993 contendo

todas as sequências da espécie. A distribuição de *P. uai* abrange as bacias do rio São Francisco (rio das Velhas e Paraopeba) e do rio Doce (rio Santo Antônio e Piracicaba). Os levantamentos apresentaram espécimes com morfotipos divergentes da diagnose original pelo número e disposição de manchas laterais, apesar disso o mais frequente está de acordo com a descrição original. Morfologicamente, as populações não apresentaram discrepâncias da diagnose original. Dados moleculares indicaram que as populações apresentaram distância genética menor que 2%, ou seja, pertencem a uma mesma espécie. A árvore filogenética apresentou o grupo de *P. uai* como monofilético e bem suportado. Em conclusão, as populações não apresentaram diferenças morfológicas e moleculares suficientes para serem consideradas espécies diferentes, se enquadrando na diagnose de *P. uai*, apesar de divergirem parcialmente da autapomorfia representada por uma mancha lateral grande e quadrada na lateral do corpo.

Palavras-chaves: Distribuição; diagnose; fenótipo; morfotipos; taxonomia integrativa.

Abstract

The genus *Phalloceros* Eigenmann, 1907 is one of the 27 valid and described of the Poecillidae family, being represented by 22 small size species distributed in South America. For the of the totality of the species, only morphological data were used. However, with the advancement of molecular techniques, the validity of some has been questioned. Among the species, *Phalloceros uai*, Lucinda, 2008 is diagnosed autapomorphically by a large lateral square spot in larger specimens and was described for a single locality in the Velhas river. Later works extended its record in the basin, while others extended it to other adjacent sub-basins, Piracicaba and Santo Antônio rivers, bot belonging to the Doce river basin. In view of the divergences in current knowledge about the geographic distribution, adequate morphological and genetic recognition of the species, the main objective of this paper is to evaluate, through integrative taxonomy, the real status of specimens identified as *P. uai* from the upper Doce river and São Francisco river basins. The specimens were obtained between 2020-2021 from four points distributed in the upper Doce river and São Francisco river basins. The morphological analyzes comprised the measurement of total and standard length, height and length of the gonopodium and visual analysis of bone structures by the diaphanization method. Molecular analyzes were performed using the DNA barcoding technique using the COI mitochondrial gene. A total of 1622 specimens were collected, 997 females, 479 males and 186 juveniles. Of these fish, six morphotypes were recorded in relation to the pattern of spots. The total length of fish ranged from 8,21 – 48,60 mm, standard from 6,67 – 42,17 mm, while the height varied from 0,87 – 11,47 mm. The length of the gonopodium is positively related to the total length, and for an increase of one millimeter in the total length of the specimen, is expected an increase of 0,36 milimeters in the length of the gonopodium. Significant differences were observed in the mean values of gonopodium lengths, however no structural differences in the gonopodium were observed between specimens of different morphotypes and populations. The genetic sequences of *Phalloceros* showed approximation of less than 2% among sequences of *P. uai* and more than 2% among their congeners. The phylogenetic tree resulted in a monophyletic group with bootstrap support of 0,9993 containing all sequences of the species. The distribution of *P. uai* covers the basins of the São Francisco river (das Velhas and Paraopeba rivers) and the Doce river (Santo Antônio and Piracicaba rivers). The surveys showed specimens

with different morphotypes comparing to the original diagnosis by the number and disposition of lateral spots, although the most frequent one is in accordance with the original description. Morphologically, the populations showed no discrepancies from the original diagnosis. Molecular data indicated that the populations had a genetic distance of less than 2%, that is, they belong to the same species. The phylogenetic tree showed *P. uai* as monophyletic and well supported. In conclusion, the populations did not show enough morphological and molecular differences to be considered different species, fitting the diagnosis of *P. uai*, despite partially differing from the autapomorphy represented by a large and square lateral spot.

Keywords: Distribution; diagnosis; phenotype; morphotypes; integrative taxonomy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Mapa indicando os locais de amostragem das populações de *Phalloceros* nas drenagens do alto rio Doce e São Francisco, MG. 5
- Figura 2 – Desenho esquemático dos morfotipos de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008 das drenagens do alto rio Doce e São Francisco, MG, evidenciando a variação no número de manchas laterais de cada lado de um mesmo exemplar. 7
- Figura 3 – Vista lateral do lado esquerdo de exemplares machos adultos de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008. Morfotipos com uma e duas manchas laterais coletados do ponto 3, morfotipo com três manchas laterais coletado do ponto 1. Escala em milímetros. 12
- Figura 4 – Vista lateral de exemplares fêmeas adultas de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008. Morfotipos com uma e duas manchas laterais coletados do ponto 3, morfotipo com três manchas laterais coletado do ponto 1. Escala em milímetros. 13
- Figura 5 – Correlação do comprimento total (mm) com o comprimento do gonopódio (mm). Gonopodium = Gonopódio. Total length = Comprimento total. 15
- Figura 6 – Representação gráfica (boxplot) do teste Nemenyi do comprimento do gonopódio (mm) por localidades. 15
- Figura 7 – Desenho esquemático do gonopódio de *Phalloceros uai* em vista lateral evidenciando os raios 5, 4 e 3, região anterior à esquerda. O raio 5 em forma de canoa, raio 4p possui uma estrutura serreada, raio 3 possui espinhos e extensões. 16
- Figura 8 – Gonopódio de um macho *Phalloceros uai* Lucinda 2008 do ponto 1, região anterior à direita. 16
- Figura 9 – Amplificação do gene COI nas 16 amostras de peixes (C1-C13, C15-C17). A seta indica o tamanho de 750 pb. Canaleta 14 (LM): padrão de peso molecular *Low Mass Ladder* da (Invitrogen™) 3200 pb. Canaleta 17 (C-): controle negativo da reação. 17
- Figura 10 –Árvore de máxima verossimilhança, no modelo K2P, com suporte de bootstrap para amostras do gene mitocondrial COI de *Phalloceros* Eigenmann, 1907. As sequências retiradas dos bancos de dados estão indicadas pelo nome da espécie e código do depósito. As sequências do trabalho estão indicadas pelo nome da

espécie seguido da localidade da coleta, fenótipo e sexo. Em vermelho estão destacadas as sequências de *Phalloceros uai* Lucinda,2008.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Pontos amostrais utilizados para coletas de *Phalloceros* Eigenmann, 1907 com coordenadas geográficas. 6
- Tabela 2 – Exemplos usados nas análises moleculares indicando o número da amostra, morfotipo relacionado ao número de manchas laterais, sexo, localidade, concentração e absorvância 260/290 nm (A260/A280). N^o = número. M = macho. F = fêmea. 9
- Tabela 3 – Número de exemplares separados por sexo em cada uma das populações de *Phalloceros* Eigenmann, 1907 das drenagens do alto rio Doce e alto São Francisco, MG. 11
- Tabela 4 – Número de exemplares de *Phalloceros* Eigenmann, 1907 coletados em cada localidade nas drenagens do alto rio Doce e São Francisco, MG, separados pelo fenótipo baseado no número de manchas laterais. 13
- Tabela 5 – Dados morfométricos de exemplares (machos, fêmeas, juvenis) de *Phalloceros* Eigenmann, 1907 nas drenagens do alto rio Doce e São Francisco, MG. N = Número de exemplares. \bar{x} = Média. md = Mediana. dp = Desvio padrão. 14

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL	Microlitro.
b	Coeficiente angular
CCT-UFMG Gerais	Centro de coleções taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais
COI	Gene mitocondrial Citocromo c Oxidase Subunidade I
CT	Comprimento total
DNA	Ácido desoxirribonucleico
df	Grau de liberdade
dp	Desvio padrão
<i>et al.</i>	E colaboradores
ex.	Exemplares
GL	Grau Gay Lussac
Gon	Gonopódio
h	Altura
IEF-MG	Instituto Estadual de Florestas
K2P	Kimura 2-Paramêtros
md	Mediana
mm	Milímetros
MV	Máxima verossimilhança
mya	Milhões de anos atrás
n.	Nova
ng/ μL	Nanograma por microlitro.
nm	Nanômetro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
p	Probabilidade
pb	Pares de base
PCR	A reação de amplificação por reações de polimerase em cadeia
r^2	Coeficiente de determinação
RJ	Rio de Janeiro
sp.	Espécie

UPGMA	Método de pareamento não ponderado utilizando medias aritméticas
vs.	Versus
x	Média
X ²	Distribuição qui-quadrada
W	Teste Shapiro-Wilk

1 - INTRODUÇÃO

A ordem Cyprinodontiformes é composta por 14 famílias, 143 gêneros e cerca de 1430 espécies de maioria dulcícola (Parenti, 2005; Nelson *et al.*, 2016; Van der Laan & Fricke, 2022). Poeciliidae é a terceira família mais diversa da ordem, incluindo três subfamílias, 27 gêneros e 275 espécies válidas (Van der Laan & Fricke, 2022). Poecilídeos são conhecidos popularmente como *livebeares*, *guppy*, *guppies*, lebistes e barrigudinhos. Suas principais características diagnósticas são a boca voltada para cima, cabeça revestida de escamas, dimorfismo sexual acentuado e nadadeira anal dos machos modificada em um órgão copulador denominado gonopódio, estrutura que permite a fecundação interna e a viviparidade (Nelson *et al.*, 2016).

Poecilídeos possuem uma história taxonômica confusa, sendo que em meados dos anos 1850 eram conhecidos apenas três gêneros para a América do Sul, *Poecilia* Bloch & Schneider, 1801, *Heterandria* Agassiz, 1853 e *Girardinus* Poey, 1854 (Lucinda, 2008). Garman (1895) realizou um dos primeiros trabalhos de sistemática do grupo e sinonimizou duas espécies *Girardinus caudimaculatus* (Hensel, 1868) e *Girardinus januaris* (Hensel, 1868). Posteriormente, Eigenmann (1907) realizou um novo estudo separando essas espécies e descrevendo dois novos gêneros: *Phalloceros*, para o qual foi realocado *G. caudimaculatus*, e *Phalloptychus* para o qual foi realocado *G. januaris*, ambos os gêneros permanecendo monotípicos.

O gênero *Phalloceros* Eigenmann, 1907 é um dos 27 descritos e válidos da família Poeciliidae, sendo representado por espécies de pequeno porte e com distribuição nas bacias hidrográficas do sul e sudeste da América do Sul (Nelson *et al.*, 2016). O gênero permaneceu monotípico, tendo *P. caudimaculatus* como única espécie reconhecida durante 100 anos. O monofiletismo e a resolução taxonômica do gênero foram estabelecidos com base exclusivamente em caracteres morfológicos, incluindo estrutura do gonopódio e papila urogenital feminina, osteologia, padrões de coloração, contagem de raios e morfometria simples (Lucinda, 2003; 2008). Após a revisão taxonômica e a descrição de 21 espécies novas e redescrição de *P. caudimaculatus* (Lucinda, 2008), o gênero passou ser o mais especioso da família Poeciliidae na América do Sul, sendo que nenhuma nova espécie foi descrita desde então (Thomaz *et al.*, 2019).

Lucinda (2003, 2008) empregou exclusivamente dados morfológicos para a descrição das espécies, entretanto, com o uso posterior de técnicas moleculares, problemas para o reconhecimento de algumas espécies passaram a ser relatados. Dessa forma, apesar da relativa estabilidade taxonômica por quase duas décadas, espécies crípticas podem estar presentes em um complexo, como descrito para *Phalloceros harpagos* Lucinda, 2008 (Oliveira, 2017). Por outro lado, análises integrativas morfológicas e moleculares de três espécies que compõem o “grupo sinistro” (*sensu* Souto-Santos *et al.* 2022), *Phalloceros aspilos* Lucinda, 2008; *Phalloceros leptokeras* Lucinda, 2008 e *Phalloceros tupinamba* Lucinda, 2008, não foram suficientes para diagnose adequada das mesmas, sendo proposto *P. leptokeras* como o nome válido da espécie

Phalloceros uai Lucinda, 2008 foi primeiramente diagnosticado como *Phalloceros* sp. n. P (Lucinda, 2003), e posteriormente descrito com distribuição conhecida em somente uma localidade na bacia do rio das Velhas (Lucinda, 2008). A espécie foi diagnosticada autapomorficamente por uma mancha lateral grande e quadrada em espécimes maiores, e adicionalmente pela papila urogenital feminina curvada para a direita e localizada lateralmente, borda da abertura anal em contato com o primeiro raio da nadadeira anal (ou muito próximo), presença de um gancho esquerdo no gonopódio, apêndice gonopodial assimétrico, sendo o direito mais largo do que o esquerdo (Lucinda, 2008).

Embora a distribuição original conhecida de *P. uai* fosse limitada a uma única localidade no rio das Velhas, trabalhos posteriores ampliaram os registros na bacia (Alves *et al.*, 2008; Leal *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2015). Adicionalmente, exemplares das drenagens do rio Piracicaba (Vieira *et al.*, 2015), e do rio Santo Antônio (Santos & Britto, 2021), ambas pertencentes à bacia do rio Doce, também foram reconhecidos como pertencentes à espécie, o que levou os últimos autores citados a indicarem que a distribuição em bacias adjacentes àquela da localidade tipo deveria ser melhor investigada. No que se refere à identificação morfológica de exemplares, Thomaz *et al.* (2019) levantaram questionamentos se o padrão de mancha lateral descrito para *P. uai* constitui uma autapomorfia, relatando exemplares sem esse caráter na bacia do rio São Francisco. Amaral *et al.* (2015) também encontraram uma pequena distância genética de 0,8% entre exemplares de *Phalloceros anisophallos* Lucinda, 2008 da Ilha Grande e Parati (RJ) e *P. uai*, sugerindo que possam ser sinônimos.

Frente às divergências no conhecimento atual acerca da distribuição geográfica e reconhecimento morfológico e genético adequado da espécie, o objetivo desse trabalho foi avaliar através da taxonomia integrativa, o real status dos exemplares identificados como *P. uai* das bacias do alto rio Doce (sub bacia do Piracicaba) e São Francisco (sub bacias dos rios Paraopeba e das Velhas).

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

Os exemplares analisados são provenientes do alto rio Doce (sub bacia do rio Piracicaba), e alto rio São Francisco (sub bacias dos rios Paraopeba e das Velhas) (Figura 1; Tabela 1), ambas drenando a região conhecida como Quadrilátero Ferrífero. O termo Quadrilátero Ferrífero se refere a uma base geológica (Dorr II, 1969; Silva, 2007; Machado, 2009) localizada na porção centro-sudeste do estado de Minas Gerais com uma área aproximada de 7.200 km² (Silva, 2007) e sendo drenada por cursos d'água formadores das bacias do rio São Francisco e rio Doce (Vieira *et*, 2015).

Parte do material examinado faz parte da coleção de peixes do Centro de Coleções Taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CCT-UFMG), enquanto exemplares adicionais para análises moleculares e de padrão de coloração foram obtidos entre 2020 e 2021. Exemplares testemunhos encontram-se depositados na coleção ictiológica da Universidade Federal de Minas Gerais (CCT-UFMG).

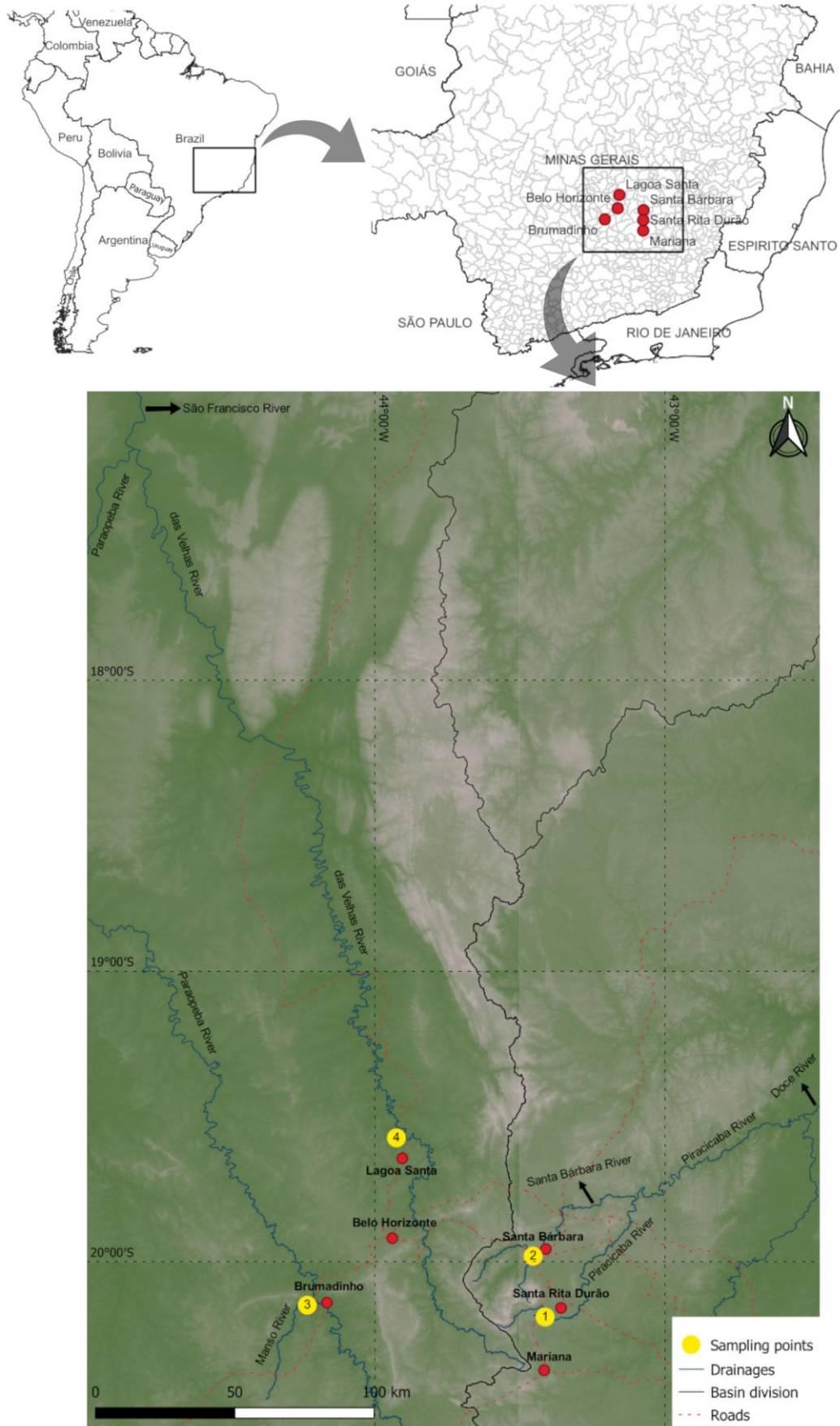


Figura 1: Mapa indicando os locais de amostragem das populações de *Phaloceros* nas drenagens do alto rio Doce e São Francisco, MG.

Tabela 1: Pontos amostrais utilizados para coletas de *Phalloceros* Eigenmann, 1907 com coordenadas geográficas.

Código da Localidade	Drenagem	Distrito/Município	Latitude S	Longitude O	Altitude (m)	Data
Ponto 1	Córrego Congonhas, afluente margem direita do rio Piracicaba Ribeirão Caraça, afluente do rio Barão de Cocais ou São João, sub drenagem do rio Santa Bárbara	Santa Rita Durão, Mariana	20°11'28.28"	43°24'45.82"	808	10/2018 08/2019
Ponto 2	(bacia do rio Piracicaba) Rio Manso, afluente da margem esquerda do rio Paraopeba	Brumal, Santa Bárbara	19°58'53.40"	43°27'15.27"	739	10/2018 08/2019
Ponto 3	Córrego do Jaque, afluente da margem esquerda do rio das Velhas	Brumadinho	20°09'0.98"	44°13'53.59"	732	06/2021 09/2021
Ponto 4	(Localidade tipo)	Lagoa Santa	19°34'28.58"	43°55'28.64"	657	06/2021

Os exemplares foram obtidos durante estudos para licenciamento ambiental, cujas licenças de captura foram expedidas pelo Instituto Estadual de Florestas (IEF-MG). As capturas foram feitas utilizando-se peneiras em formato de meia lua revestidas com tela de náilon e malha de dois milímetros.

Após a captura, os exemplares foram imersos em solução hidro alcoólica contendo óleo de cravo comercial para completa anestesia e eutanásia, conforme procedimentos descritos em Lucena *et al.* (2013). Uma parte dos exemplares foi fixada em álcool 90° GL para os estudos moleculares e os demais em formalina 10% para

os estudos morfológicos. Em laboratório, todos os peixes fixados em formalina foram lavados em água corrente e mantidos em álcool 70° GL. Todos os exemplares capturados foram identificados taxonomicamente, com auxílio de um microscópio estereoscópio Zeiss™ Stemi DV4, separados como adultos (machos e fêmeas), e juvenis. Foram considerados jovens todos animais menores que o menor macho com gonopódio desenvolvido. Por fim, foram separados por morfotipos baseados no número de manchas laterais conforme padrão apresentado na Figura 2.

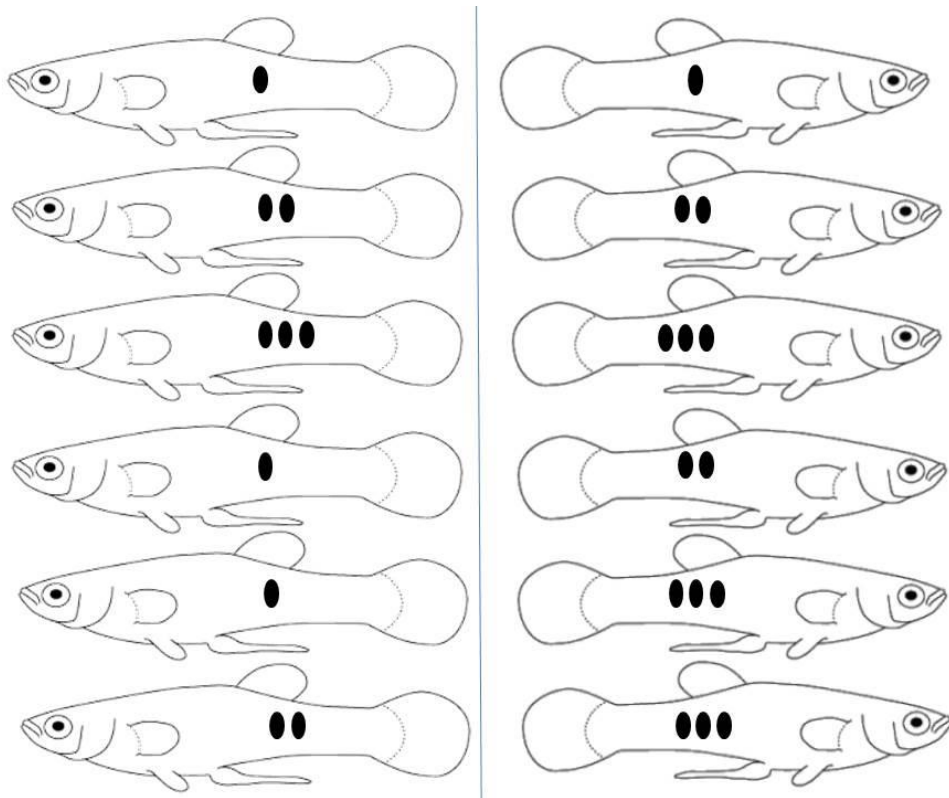


Figura 2: Desenho esquemático dos morfotipos de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008 das drenagens do alto rio Doce e São Francisco, MG, evidenciando a variação no número de manchas laterais de cada lado de um mesmo exemplar.

2.2 Análises morfológicas

Todos os peixes tiveram os comprimentos total e padrão, altura (medida na origem da nadadeira pélvica) e comprimento do gonopódio nos machos medidos com auxílio de um paquímetro digital 150 mm MTX® com resolução de 0,01 mm.

A normalidade dos dados foi testada a partir do teste de Shapiro-Wilk. O comprimento do gonopódio foi analisado em função da localidade através do teste de Krustal-Wallis e teste de Nemenyi (Nemenyi, 1963). Análise de correlação de

Pearson foi usada para determinar a relação entre o tamanho do gonopódio com o crescimento do exemplar. Todas análises foram executadas através do software R™.

Para análise de estruturas ósseas, foram diafanizados vinte e dois exemplares adultos, dezenove machos e três fêmeas, conforme o método proposto por Taylor & Van Dike (1985). Primeiramente, os exemplares foram imersos em uma solução de 20 partes peróxido de hidrogênio (3%) com 80 partes de hidróxido de potássio (mistura de 1% de hidróxido de potássio (KOH 6%) em água destilada) com seus órgãos internos expostos em presença de luz por uma hora. Em seguida, todo material foi imerso em uma solução de hidróxido de potássio com 2 gotas de *Alizarin Red S* por 5 horas. Por fim, os exemplares foram eviscerados, retiradas as escamas, olhos e outras estruturas que não seriam objeto de estudo e foram imersos em uma solução de 30 partes tripsina (0,45 gramas de tripsina com 400ml de água destilada para cada 60 gramas de material) e 70 partes água destilada. Essa última solução foi trocada regularmente até a musculatura ficar transparente permitindo a visualização das estruturas ósseas.

Após a diafanização, o gonopódio foi fotografado em microscópio estereoscópico Leica™ M205 A. A nomenclatura das estruturas do gonopódio seguiu o trabalho de Rosen & Gordon (1953) e as modificações propostas por Lucinda & Reis (2005).

2.3 Análises moleculares

A extração, amplificação e sequenciamento do DNA foram realizadas pela empresa EcoMol Consultoria© em Piracicaba, São Paulo.

Dezesseis espécimes (Tabela 2), foram utilizados para as análises moleculares. O DNA foi extraído a partir da porção posterior de cada peixe por meio do kit comercial *DNeasy Blood & Tissue*, da empresa Qiagen™, seguindo as instruções do fabricante.

Posteriormente, a qualidade do DNA foi avaliada a partir da relação de absorbância 260/280 nm e da concentração (ng/μL) utilizando um espectrofotômetro NanoDrop 2000, Thermo Scientific™ (Tabela 2). Todas as amostras foram normalizadas para uma concentração de 50 ng/μL.

Tabela 2: Exemplares usados nas análises moleculares indicando o número da amostra, morfotipo relacionado ao número de manchas laterais, sexo, localidade, concentração (ng/ μ L) e absorvância 260/290 nm (A260/A280). N^o = número. M = macho. F = fêmea.

N ^o da amostra	Fenótipo	Sexo	Localidade	Concentração	A260/A280
E1	1x1	M	Ponto 4	213	1,94
E2	1x1	M	Ponto 4	271	1,94
E3	1x1	M	Ponto 4	339	1,95
E4	1x1	M	Ponto 1	638	1,95
E5	1x1	M	Ponto 1	563	1,95
E6	1x2	M	Ponto 1	410	1,96
E7	2x2	F	Ponto 1	306	1,95
E8	2x3	M	Ponto 1	93	1,95
E9	1x2	M	Ponto 1	207	1,95
E10	1x1	M	Ponto 1	328	1,93
E11	2x2	M	Ponto 1	187	1,95
E12	1x2	M	Ponto 1	498	1,97
E13	1x1	F	Ponto 3	843	2,00
E14	2x2	F	Ponto 3	579	1,98
E15	1x1	M	Ponto 2	544	1,93
E16	1x1	F	Ponto 2	453	1,95

A reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene mitocondrial Citocromo c Oxidase Subunidade I (COI) foi realizada utilizando o primer H7152 5' CACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA 3' *forward* e L6448-F1 5' TCAACCAACCACAAAGACATTTCGGCAC 3' *reverse*, ambos dessanilizados, liofilizados, sem marcação da marca *Integrated DNA Technologies*® (IDT) (Ivanova *et al.*, 2007; Oliveira, 2017). As amplificações foram realizadas em um volume de 15 μ L de reação, contendo: 2 μ L de DNA a 50 ng/ μ L, 7,5 μ L de *PCRBio Ultramix* da marca *PCRBiosystem*, 1 μ L de cada primer diluído a 10 pmol/ μ L e 3,5 μ L de água ultrapura, de acordo com Ivanova *et al.* (2007).

Os parâmetros utilizados na PCR foram desnaturação a 94°C por dois minutos, seguido de 35 ciclos de anelamento a 94°C por 30 segundos, mais 35 a 52°C por 40 segundos, extensão da cadeia a 72°C por um minuto, e, por fim, a extensão final ocorreu a 72°C por 10 minutos (Ivanova *et al.*, 2007). Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose 1,5%.

Após a amplificação, os produtos da PCR foram purificados com *beads* magnéticas *Agencourt AMPure XP*, da marca *BECKMAN COULTER*®. Esses produtos passaram pela reação de sequenciamento bidirecional, realizada com o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* da marca *Applied Biosystems*®. Os

produtos do sequenciamento foram purificados por precipitação com Etanol/EDTA/Acetato de Sódio, de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. O sequenciamento automático por eletroforese capilar no equipamento ABI3730xl Genetic Analyzer da marca *Applied Biosystems*® foi realizado.

As sequências foram editadas manualmente utilizando o programa *BioEdit*®, através do qual foi avaliada a qualidade do sequenciamento e foram excluídas as regiões dos primers. Estas foram depositadas no *Genbank* e no *BOLD Systems*.

Foram acessadas e avaliadas todas as sequências do gênero *Phalloceros* disponíveis nos bancos de dados *Genbank* e *BOLD Systems*. Foram retiradas as que apresentavam menos de 600 pb, pela baixa qualidade do sequenciamento, as advindas de aquários, para evitar erros de identificações, e as da espécie *Phalloceros harpagos*, pois a espécie apresenta muitos problemas taxonômicos, podendo ser um complexo de espécies conforme indicado por Oliveira (2017).

Todas as sequências foram alinhadas através do *Muscle* (Edgar, 2004) sob os parâmetros padrões do *MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)* (Kumar *et al.*, 2018). O cálculo das distâncias genéticas das sequências de *Phalloceros* foi realizado com o programa *MEGA X* sob os parâmetros do modelo Kimura 2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980). A árvore filogenética foi realizada no programa *MEGA X* a partir do método estatístico de máxima verossimilhança (MV), utilizando os parâmetros padrão do software e o modelo K2P. Para a árvore foi realizado o teste de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), utilizando 10000 réplicas, para o suporte dos grupos.

3 - RESULTADOS

No total foram avaliados 1622 exemplares, dos quais 1587 se mostraram adequados às análises de morfometria, enquanto os demais foram excluídos por estarem danificados ou utilizados para a diafanização e as análises moleculares. O maior número de exemplares coletados foi da população do ponto 1 (933 ex.) e o menor, da localidade tipo (ponto 4 – 35 ex.) (Tabela 3).

Dentre os animais analisados, 997 (60,23%) foram identificados como fêmeas, 479 (29,53%) como machos e 186 (11,47%) como juvenis. Em todas as populações, exceto no rio Santa Bárbara (ponto 2), o número de fêmeas coletado foi maior do que o de machos e juvenis (Tabela 3).

Tabela 3: Número de exemplares separados por sexo em cada uma das populações de *Phalloceros* Eigenmann, 1907 das drenagens do alto rio Doce e São Francisco, MG.

Código da localidade	Machos	Fêmeas	Juvenis
Ponto 1	282	563	88
Ponto 2	30	16	1
Ponto 3	156	399	92
Ponto 4	11	19	5
Total	479	997	186

Dos 1622 exemplares, foram registrados seis morfotipos com relação as manchas laterais (1x1, 1x2, 1x3, 2x2, 2x3 e 3x3) (Figuras 3 e 4; Tabela 4). Em todas as populações, exceto a localidade tipo, foram encontrados animais diferindo da descrição original, ou seja, com número de manchas superior ao da descrição original (Tabela 4). O morfotipo com três manchas de cada lado foi o menos frequente e restrito ao ponto 1. A assimetria no número de manchas entre os lados foi comum nas populações.

O comprimento total variou de 8,21 – 48,60 mm, o padrão de 6,67 – 42,17 mm, enquanto a altura teve variação de 0,87 – 11,47 mm. As fêmeas alcançaram maiores tamanhos e alturas que os machos. Foi registrada maior amplitude de variação na altura das fêmeas, visto que ocorre a dilatação do abdômen quando estão grávidas (Tabela 5).



Figura 3: Vista lateral do lado esquerdo de exemplares machos adultos de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008. Morfotipos com uma e duas manchas laterais coletados do ponto 3, morfotipo com três manchas laterais coletado do ponto 1. Escala em milímetros.



Figura 4: Vista lateral de exemplares fêmeas adultas de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008. Morfotipos com uma e duas manchas laterais coletados do ponto 3, morfotipo com três manchas laterais coletado do ponto 1. Escala em milímetros.

Tabela 4: Número de exemplares de *Phalloceros* Eigenmann, 1907 coletados em cada localidade nas drenagens do alto rio Doce e São Francisco, MG, separados pelo fenótipo baseado no número de manchas laterais.

Código da localidade	Fenótipo (manchas)	Número de manchas (lados)		N	Frequência relativa do fenótipo por localidade (%)
		Direito	Esquerdo		
Ponto 1	1x1	1	1	582	62,85
	2x2	2	2	135	14,58
	3x3	3	3	1	0,11
	1x2	1	2	103	
		2	1	96	21,49
	1x3	1	3	1	
		3	1	-	0,11
	2x3	2	3	8	
		3	2	-	0,76
Ponto 2	1x1	1	1	45	95,74
	2x2	2	2	-	-
	3x3	3	3	-	-
	1x2	1	2	1	
		2	1	1	4,26
	1x3	1	3	-	
		3	1	-	-
	2x3	2	3	-	
		3	2	-	-
Ponto 3	1x1	1	1	534	82,53
	2x2	2	2	42	6,49
	3x3	3	3	-	-
	1x2	1	2	37	
		2	1	32	10,66
	1x3	1	3	-	
		3	1	-	-
	2x3	2	3	-	
		3	2	2	0,31
Ponto 4	1x1	1	1	29	100
	2x2	2	2	-	-
	3x3	3	3	-	-
	1x2	1	2	-	
		2	1	-	-
	1x3	1	3	-	
		3	1	-	-
	2x3	2	3	-	
		3	2	-	-

Tabela 5: Dados morfométricos de exemplares machos, fêmeas e juvenis de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008 nas drenagens do alto rio Doce e São Francisco, MG. N = Número de exemplares. \bar{x} = Média. md = Mediana. dp = Desvio padrão

Medidas (mm)	Sexo	N	Amplitude	\bar{x}	md	Dp
Comprimento total	Machos	444	15,86 - 30,70	22,83	21,69	3,43
	Fêmeas	976	15,67 - 48,60	29,27	29,58	5,83
	Juvenis	179	8,21 - 17,15	13,94	14,43	1,89
Comprimento padrão	Machos	453	12,86 - 24,58	18,29	17,35	2,81
	Fêmeas	985	12,47 - 42,17	23,71	23,93	5,83
	Juvenis	184	7,53 - 13,81	11,24	11,51	1,46
Altura	Machos	453	2,08 - 5,76	3,47	3,25	0,68
	Fêmeas	977	1,92 - 11,47	5,45	5,4	1,87
	Juvenis	183	0,87 - 2,61	1,98	2	0,37
Gonopódio	Machos	453	2,98 - 11,18	7,81	7,34	1,38

O comprimento do gonopódio dos machos ($W=0,94$, $p<0,001$) e o comprimento total dos machos ($W=0,93$, $p<0,001$) não apresentaram normalidade (Anexo 1). A proporção média do CT/Gn indicou que o gonopódio representa em média 35% do corpo total do animal. A correlação de Pearson demonstrou que o comprimento do gonopódio se relaciona positivamente com o comprimento total ($r^2=0,85$; $y=-0,41 + 0,36x$), indicando que para o aumento de um milímetro no comprimento total do exemplar, espera-se um acréscimo de 0,36 milímetros no comprimento do gonopódio (Figura 5).

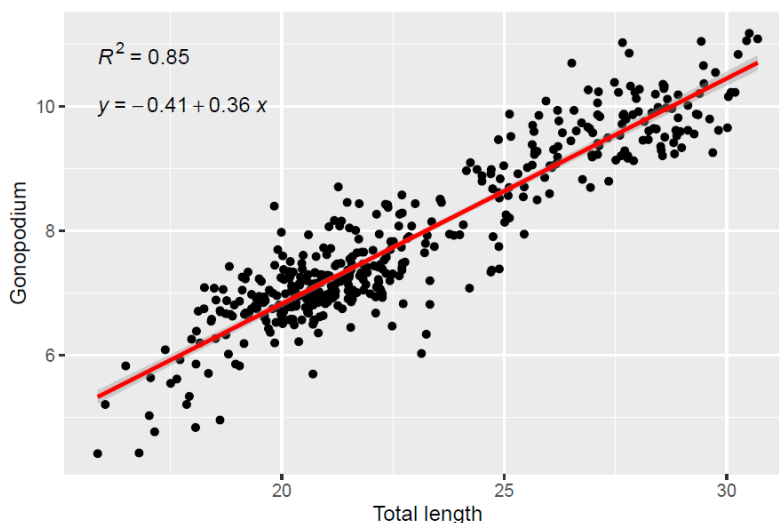


Figura 5: Correlação do comprimento total (mm) com o comprimento do gonopódio (mm). Gonopodium = Gonopódio. Total length = Comprimento total.

Foram observadas diferenças significativas nos valores médios do comprimento do gonopódio entre exemplares de diferentes populações ($X^2=69.063$, $df=3$, $p<0.001$). O ponto 1 e o ponto 3 apresentaram diferenças significativas nos valores médios do comprimento do gonopódio ($p<0,001$). (Figura 6).

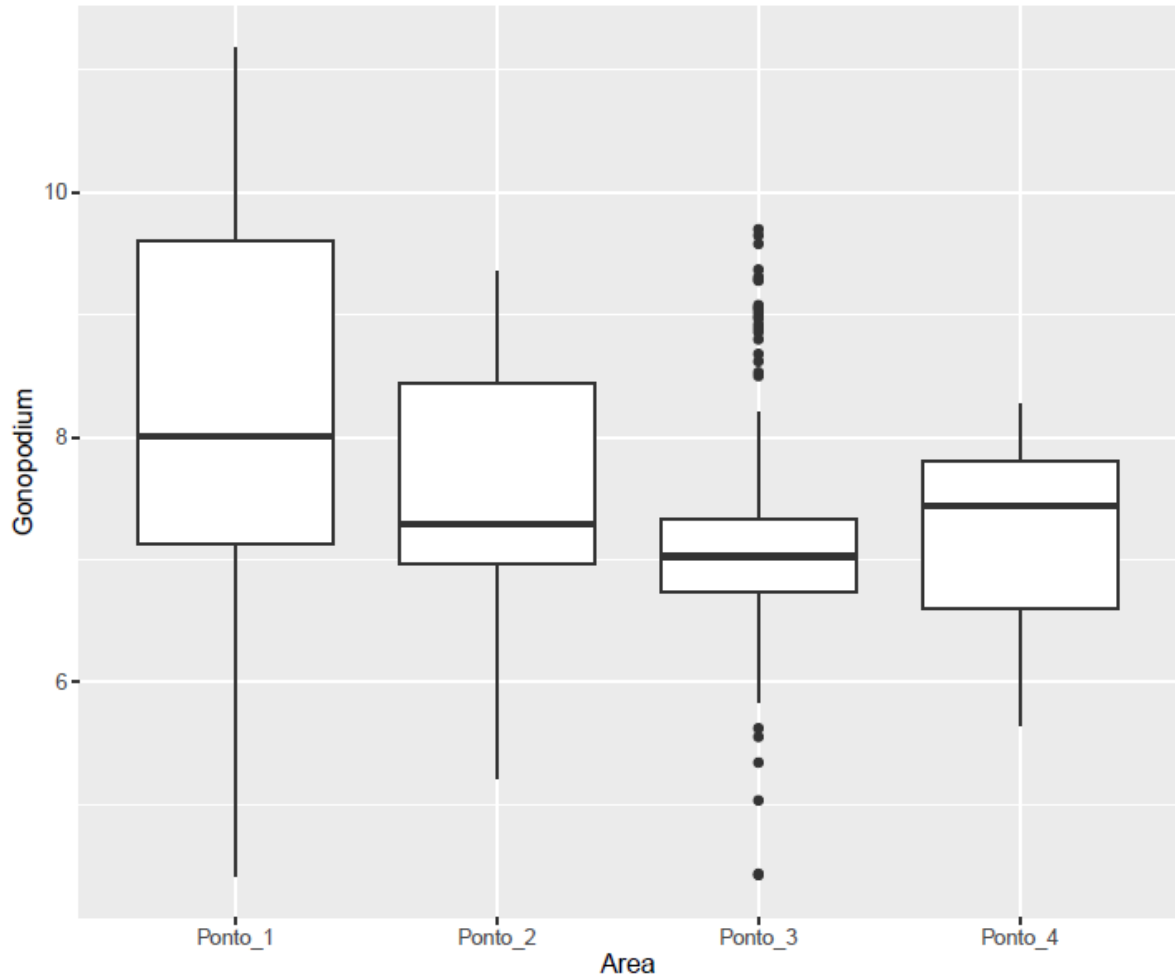


Figura 6: Representação gráfica (*boxplot*) do teste Nemenyi do comprimento do gonopódio (mm) por localidades.

Não foram encontradas diferenças estruturais dos gonopódios entre diferentes morfotipos e localidades (Figura 7, 8), todos apresentaram um gancho esquerdo no gonopódio, apêndice gonopodial assimétrico (direito mais largo do que o esquerdo), raio 5 em formato de canoa, raio 4p com uma estrutura serreada e o raio 3 com espinhos e extensões, conforme encontrado por Lucinda (2008).

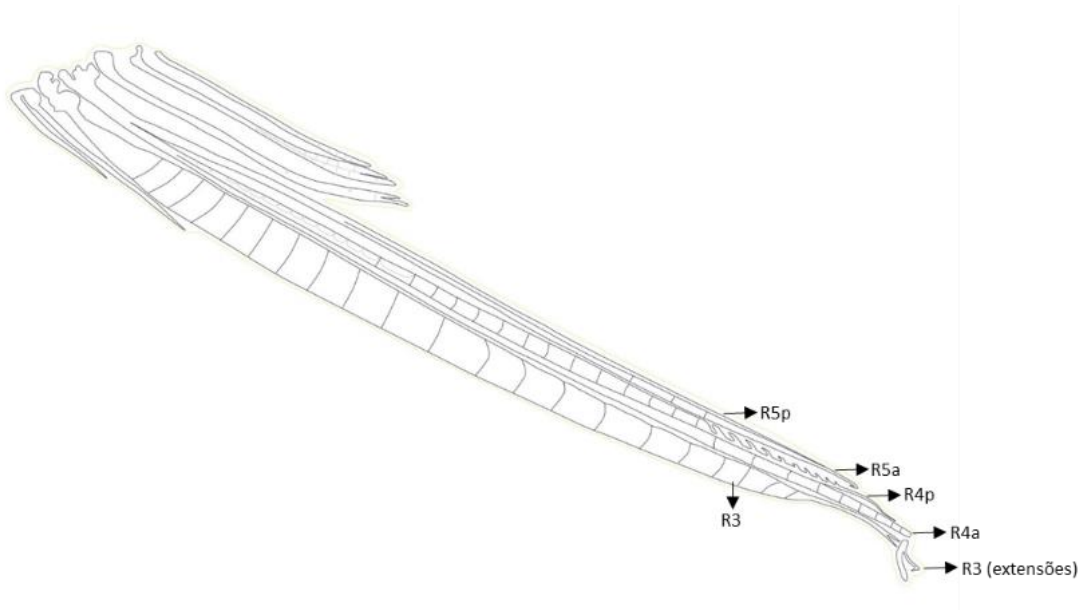


Figura 7: Desenho esquemático do gonopódio de *Phalloceros uai* em vista lateral evidenciando os raios 5, 4 e 3, região anterior à esquerda. O raio 5 em forma de canoa, raio 4p possui uma estrutura serreada, raio 3 possui espinhos e extensões.



Figura 8: Gonopódio de um macho *Phalloceros uai* Lucinda 2008 do ponto 1, região anterior à direita.

Os produtos amplificados pelo processo de PCR apresentaram aproximadamente 750 pb (Figura 9).

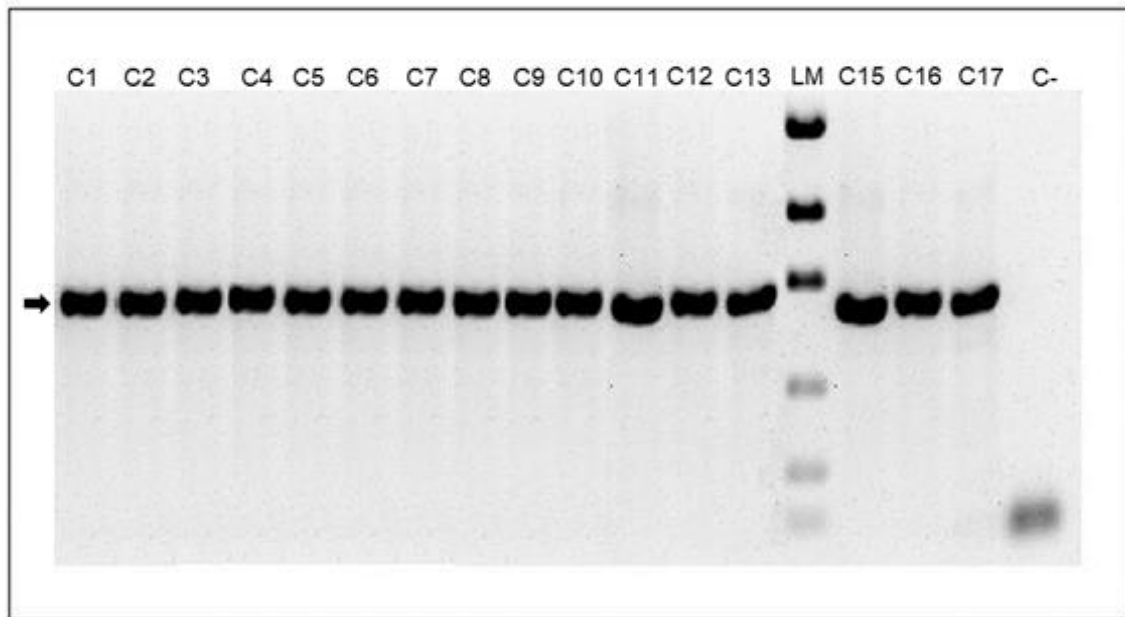


Figura 9: Amplificação do gene COI nas 16 amostras de peixes (C1-C13, C15-C17). A seta indica o tamanho de 750 pb. Canaleta 14 (LM): padrão de peso molecular *Low Mass Ladder* da (Invitrogen™) 3200 pb. Canaleta 17 (C-): controle negativo da reação.

As sequências de *Phalloceros* submetidas a análise de distância genética apresentaram aproximação de menos de 2% entre sequências de *P. uai* e mais de 2% entre seus congêneres (Anexo 2). Todas as árvores filogenéticas produzidas tiveram o mesmo resultado, por isso selecionamos o método estatístico de máxima verossimilhança. A árvore resultou em um grupo monofilético com suporte de *bootstrap* de 0,9993 contendo todas as sequências de *P. uai* (Figura 10).

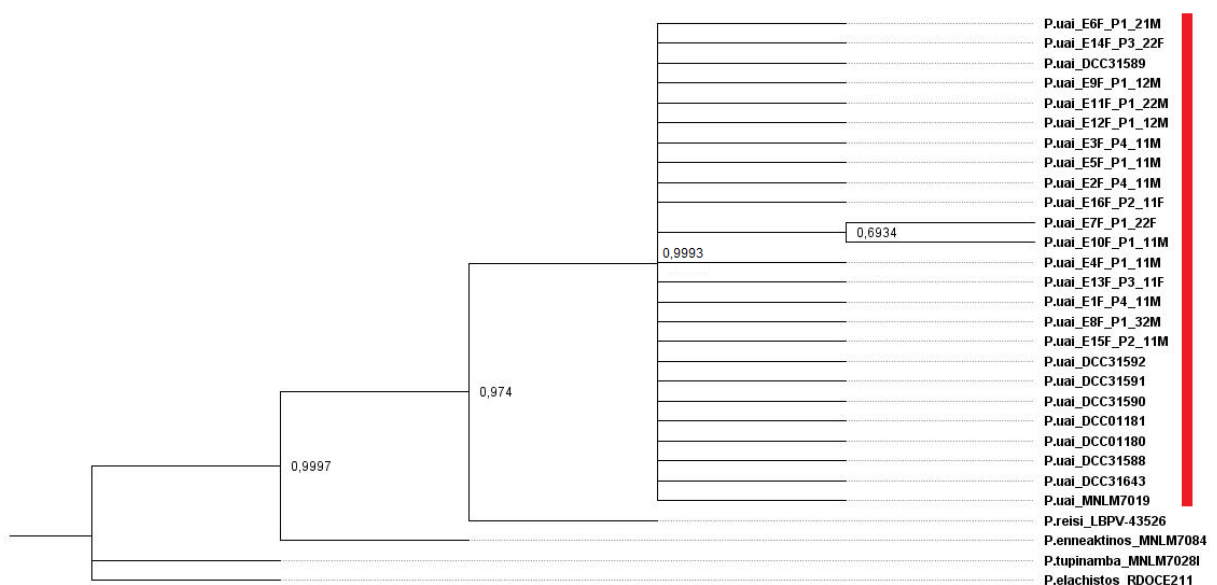


Figura 10: Árvore de máxima verossimilhança, no modelo K2P, com suporte de *bootstrap* para amostras do gene mitocondrial COI de *Phalloceros* Eigenmann, 1907. As sequências retiradas dos bancos de

dados estão indicadas pelo nome da espécie e código do depósito. As sequências do trabalho estão indicadas pelo nome da espécie seguido da localidade da coleta, fenótipo e sexo. Em vermelho estão destacadas as sequências de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008.

4 - DISCUSSÃO

Na descrição original de *P. uai*, sua distribuição geográfica foi limitada ao Córrego do Jaque, afluente da margem esquerda do rio das Velhas (Lucinda, 2008). Essa condição foi alterada em trabalhos posteriores, com relatos da ocorrência em localidades adicionais, ainda que restritas à bacia do rio das Velhas: rio Cipó (Alves *et al.*, 2008), calha do rio das Velhas (Leal *et al.*, 2011) e córrego Samambaia (Moreira *et al.*, 2015). Nas amostragens conduzidas, a distribuição foi ampliada para a bacia do rio Paraopeba e confirmada para a drenagem do rio Piracicaba (bacia do rio Doce), originalmente relatada por Vieira *et al.* (2015). Adicionalmente, consideramos como válida a ocorrência nas drenagens do rio Santo Antônio, bacia do rio Doce (Santos & Britto, 2021). Dessa forma, os dados atuais indicam que a espécie está amplamente distribuída e é comum em drenagens na região denominada Quadrilátero Ferrífero.

Apesar do aumento dos registros de ocorrência de *P. uai* ao longo da região do Quadrilátero Ferrífero, não havia sido relatada a existência de espécimes com morfotipos divergentes da diagnose original pelo número e disposição de manchas laterais (1x1). A única exceção foi relatada por Thomaz *et al.* (2019), que reportou exemplares sem manchas oriundos do rio das Velhas, bacia do rio São Francisco. Na análise de 1622 exemplares de *P. uai* não registramos animais sem manchas, portanto, é recomendável uma reanálise dos exemplares com esse morfotipo e primariamente identificados como *P. uai*.

Ainda que o morfotipo mais frequente tenha sido convergente com o da diagnose original (uma mancha de cada lado), exemplares com duas e três manchas laterais, e variações numéricas entre o lado direito e esquerdo do corpo também foram comuns. Os animais com três manchas estiveram restritos à população do alto Piracicaba, enquanto na localidade tipo foram encontrados apenas animais com o fenótipo da diagnose original. A inexistência de exemplares com morfotipos diferentes na localidade tipo pode ser indicativo de uma variação única presente na população por algum processo evolutivo maior, genético ou ecológico, como descrito para machos de *Poecilia wingei* Poeser, Kempkes & Isbrücker 2005 (Prazdnikov, 2021). Uma hipótese alternativa estaria relacionada ao pequeno número de exemplares obtidos e analisados até o presente, condição que limita o conhecimento mais amplo acerca dos morfotipos que podem estar presentes na população.

Os padrões de colorido em peixes são amplamente utilizados como caráter distintivo de espécies. As cores e seus padrões são formados a partir do conjunto e disposição de melanóforos e outras células (Cott, 1940), e podem estar relacionados a três funções principais: termoregulação, redução do índice de predação e comunicação inter e intraespecífica (Cott, 1940; Endler, 1978; Endler 1984).

Em poecilídeos, os padrões de cores são influenciados por predação, escolha das fêmeas para reprodução (Endler 1982; Endler 1984; Endler 1987; Jönck, 2004), fatores ambientais, como *background color* (cor de fundo) (Jönck, 2004) e luminosidade (Endler, 1987), além de fatores intrínsecos do animal, como estresse, idade, genética (Houde, 1991) e hormônios tireoidianos (Prazdnikov, 2021). Portanto, podem variar não só entre espécies e gêneros, mas também entre populações de uma mesma espécie, o que pode justificar as variações encontradas em *P. uai* nas drenagens do rio Piracicaba e Paraopeba.

Endler (1982, 1984 e 1987) estudou a reprodução e os padrões de cores em *Poecilia reticulata* Peters 1859 e em *P. caudimaculatus*, relatando que a cor desses animais é críptica com o fundo, normalmente de areia ou sedimentos, para evitar predadores. Deve-se destacar que todos os trabalhos anteriores ao ano de 2008, relatam apenas a espécie *P. caudimaculatus*, devido a ser essa a única conhecida para o gênero à época. Apesar da importância dos achados desses trabalhos para o conhecimento em nível de gênero, deve-se ter cautela ao utilizar seus dados para realizar comparações interespecíficas.

Em *P. caudimaculatus* é relatado que o tamanho e número de manchas diminui com o aumento da predação em nível local (Endler, 1982, 1984), sugerindo uma seleção negativa em relação ao padrão de cores. A frequência dos diferentes morfotipos encontrados nas populações de *P. uai* pode estar relacionada a essa condição, visto que peixes com menos manchas poderiam ser presas menos chamativas. Por outro lado, fêmeas teriam preferências por copular com machos mais chamativos, ocorrendo uma seleção positiva do caractere (Endler, 1984). Segundo Thayer (1909), Cott (1940) e Endler, (1978), todos os exemplares de *P. caudimaculatus* analisados, independente de sexo ou idade, possuíam manchas e algumas populações apresentavam barras verticais para se camuflarem com a vegetação emergente, não sendo encontrado nenhuma relação entre a quantidade e

tamanho das barras e a predação. Em *P. uai* não foram encontrados animais com barras verticais, apesar de ocorrerem em abundância entre a vegetação aquática junto às margens dos cursos d'água amostrados.

Devido ao desconhecimento sobre padrões de manchas em outras espécies de *Phalloceros* sob diferentes condições ambientais, o polimorfismo aqui relatado não pode ser avaliado como uma adaptação para diferentes índices de predação e/ou ao *background*, ou se representa somente uma variação sem uma relação direta com seleção.

Diferentemente de *P. reticulata* que apresenta dicromatismo sexual, ou seja, os sexos diferem em coloração, com machos extremamente ornamentados e coloridos e fêmeas não chamativas, as espécies de *Phalloceros* apresentam machos e fêmeas com o mesmo padrão de cor (Endler, 1982, 1984), padrão esse presente em *P. uai*.

Uma possível hipótese para a presença e manutenção de diferentes morfotipos em *P. uai* pode ser a ideia questionada por Farr (1984) de que machos com padrões de colorido raros e chamativos seriam escolhidos por possuírem um genótipo diferente que, por consequência, daria origem a uma prole geneticamente diferente com maiores chances de adaptação. Entretanto, Farr (1984) acredita que inferir se o animal possui genótipo diferente apenas observando seu fenótipo é difícil. Outro ponto que não corrobora essa proposição é o fato da frequência de animais com mais manchas ser bem menor quando comparado com o padrão fenotípico 1x1.

O estresse associado a presença de um predador também pode causar a ocorrência e manutenção de distintos morfotipos. Jönck (2004) relatou que o aumento do estresse em espécimes de *P. caudimaculatus*, levava a um aumento fisiológico de catecolaminas, propiciando alteração na coloração dos animais. Entretanto, catecolaminas estão associadas a colorações avermelhadas e exemplares de *P. uai* analisados não apresentaram nenhuma coloração diferenciada, seja quando em vida ou pós fixação.

Outra possível hipótese para a presença e manutenção dos diferentes fenótipos pode ser hormonal. Prazdnikov (2021) estudou experimentalmente a influência de hormônios tireoidianos (THs) em machos de *guppy*, visto que são importantes reguladores da ontogenia de peixes e servem de ligação entre mudanças ambientais e expressão fenotípica. Hormônios tireoidianos são responsáveis pela velocidade do

aparecimento do padrão de cor e da sua intensidade. Foi relatado que animais criados sob diferentes regimes hormonais até a formação final do padrão de pigmento adulto apresentavam diferentes fenótipos (Prazdnikov, 2021). Espécimes mantidos experimentalmente em ambientes com alta exposição à THs apresentavam cores mais fortes e vibrantes em animais jovens quando comparados àqueles mantidos em ambientes normais ou com baixos valores de THs (Prazdnikov, 2021).

Ambientes experimentais com altos índices de THs também propiciam assimetria em peixes (Prazdnikov, 2021). Essa característica não foi relatada anteriormente para *P. uai*, embora tenha sido comum em duas populações analisadas, onde o número de manchas de cada lado do corpo foi variável. Essa assimetria pode ser considerada uma vantagem durante a corte desses animais, porque o macho pode apresentar para a fêmea os dois lados do corpo, evidenciando diferentes morfotipos e ampliando a possibilidade de escolha (Řežucha and Reichard, 2015). Essa condição constituiria uma vantagem evolutiva para animais fenotipicamente assimétricos. Entretanto, se a assimetria constituísse uma vantagem como proposta, seria esperado uma maior frequência de indivíduos assimétricos, condição que não foi registrada nas populações analisadas.

Apesar das diferenças fenotípicas no padrão de manchas, para os demais caracteres morfológicos, os exemplares analisados das populações não apresentaram discrepâncias da diagnose original de Lucinda (2008), principalmente nas características do gonopódio, elemento fundamental para a definição de diversas espécies do gênero.

O comprimento do gonopódio apresentou uma correlação positiva com o comprimento total do peixe e foram observadas diferenças significativas entre o comprimento do gonopódio em machos das diferentes populações. As populações do ponto 1 e do ponto 3 apresentaram entre elas diferenças significativas no comprimento do gonopódio, sugerindo uma diferença entre as populações do rio Piracicaba, bacia do rio Doce, e do rio Paraopeba, bacia do São Francisco.

Em Poecillidae existem alguns comportamentos reprodutivos como *sneaky mating* ou *gonopodial thrusting* (coerção), *courtship* (corte), *nibbling* (contato oral ou nasal do macho na abertura urogenital feminina), *postcopulatory jerking* (masturbação pós-copulatória) e reprodução forçada. Esses comportamentos implicam em

competições, nas quais as fêmeas tendem a maximizar a qualidade de parceiros para evitar perda de energia, com os machos sendo mais promíscuos e tendendo a maximizar o número de parceiras (Baerends *et al.*, 1955; Farr, 1977, 1980, 1984; Endler, 1984; Pollux *et al.*, 2014; Pacheco, 2019).

O ato coercivo ocorre quando machos inserem o gonopódio diretamente na papila urogenital das fêmeas sem a permissão ou percepção das mesmas (Rosen & Tucker, 1961). Em espécies com populações nas quais esse ato é o mais comum, machos apresentariam tamanho menor e genitais mais longos, o que favoreceria o acasalamento e evitaria a escolha das fêmeas dos seus parceiros (Pollux *et al.*, 2014). Estudos também demonstram que, em ambientes com altas taxas de predação, machos possuíam gonopódio maior, indicando que há prevalência do acasalamento coercitivo (Magurran & Seghers, 1990; Magurran & Nowak, 1991; Pacheco, 2019). É possível que isso ocorra em *P. uai*, permitindo a permanência dos diferentes morfotipos nas populações. Entretanto, mais estudos serão necessários para a compreensão dos comportamentos sexuais em *Phalloceros*.

Para peixes neotropicais é recomendado utilizar a faixa de 1 a 3% de distância genética para separação taxonômica de espécies (Hebert *et al.*, 2003; Lara *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2011, 2013), visto que a diversificação neotropical é mais recente, entre 3 e 10 mya (Albert, 2011). Os exemplares das populações de *P. uai* avaliadas apresentaram distância genética menor que 2%, indicando que pertencem à mesma espécie, enquanto se diferenciaram em mais de 2% para seus congêneres. A árvore filogenética apresentou o grupo de *P. uai* como monofilético e bem suportado (valores de bootstrap maiores que 0,9).

Nas nossas análises não foram reavaliados dados de Amaral *et al.* (2015), no qual foi encontrado uma diferença genética entre *P. uai* e *P. anisophallos* de 0,8%, sugerindo que as espécies podem ser sinônimas e o status de espécie de ambas deveria ser reavaliado. Como as sequências necessárias para as análises não estão disponíveis em nenhum banco de dados, e não obtivemos amostras de *P. anisophallos* para comparação, essa definição carece de investigação futura. Contudo, *P. anisophallos* se distingue morfologicamente de *P. uai* por suas autapormofias, como gancho na metade do lado esquerdo do apêndice gonopodial, localizado aproximadamente do quarto ou terceiro distal do comprimento do mesmo, e mancha na região medial alongada, formando uma barra vertical (Lucinda, 2008).

Com base nos dados disponíveis e obtidos para esse trabalho, as populações não apresentaram diferenças morfológicas e moleculares suficientes para serem consideradas espécies diferentes, se enquadrando na diagnose de *P. uai*, apesar de divergirem da autapomorfia do padrão de manchas usado por Lucinda (2008). Por conseguinte, a diagnose de *P. uai* Lucinda, 2008 necessita ser ampliada para incluir a variação morfotípica encontrada. Adicionalmente é ampliada e confirmada a sua distribuição geográfica para as sub bacias do rio Paraopeba (bacia do São Francisco), e para a sub bacias do alto rio Piracicaba (Vieira *et al.*, 2015) e Santo Antônio (Santos & Britto, 2021), ambas na bacia do rio Doce. Por fim, a diferenciação dos padrões de coloração de *P. uai* necessita de estudos adicionais para determinação da sua origem e papel na diferenciação alopátrica entre as diversas populações.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agassiz, L. (1853). Recent researches of Prof. Agassiz [Extract from letter to J. D. Dana dated Cambridge, June 9, 1853]. *American Journal of Science and Arts (Series 2)*, **16**, 46, 134-136.
- Albert, J. S., & Reis, R. (2011). *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes*. Berkeley, CA: Univ of California Press.
- Alves, C. B. M., Leal, C. G., Brito, M. F. G., & Santos, A. C. A. (2008). Biodiversidade e conservação de peixes do Complexo do Espinhaço. *Megadiversidade*, **4**, 1-2, 178-196.
- Amaral, C. R. L., Maciel, V. A., Pereira, F., Mazzoni, R., Silva, D. A., Amorim, A., & Carvalho, E. F. (2015). Genetic diversity of freshwater fishes from the South American Atlantic Rainforest: The case study of the genus *Phalloceros*. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, **5**, e608-e610.
- Baerends, G. P., Brouwer, R., & Waterbolk, H. T. S. (1955). Ethological studies on *Lebistes reticulatus* (Peters) I. An analysis of the male courtship pattern. *Behaviour*, **8**, 249-334.
- Bloch, M. E. & Schneider, J. G. (1801). *Systema Ichthyologiae Iconibus cx Illustratum. Post obitum auctoris opus inchoatum absolvit, correxit, interpolavit Jo. Gottlob Schneider, Saxo. Berolini. Sumtibus Auctoris Impressum et Bibliopolio Sanderiano Commissum*, **1**, 9, 1-584.
- Cott, H. B. (1940). *Adaptive coloration in animals*. London, UK: Methuen.
- Dorr II, J. V. N. (1969). Physiographic, Stratigraphic and Structural Development of the Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brazil. U.S. Geol. Surv. Prof. Paper, 641-A, 110p.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, **32**, 5, 1792-1797.
- Eigenmann, C. H. (1907). The Poeciliid fishes of Rio Grande do Sul and the La Plata Basin. *Proceedings of the United States National Museum*, **32**, 425-433.
- Endler, J. A. (1978). A predator's view of animal color patterns. *Evolutionary biology*, **11**, 319-364.
- Endler, J. A. (1982). Convergent and divergent effects of natural selection on color patterns in two fish faunas. *Evolution*, **36**, 1, 178-188.
- Endler, J. A. (1984). Natural and sexual selection on color patterns in poeciliid fishes. In: Zaret, T.M. (Eds.) *Evolutionary ecology of neotropical freshwater fishes. Developments in environmental biology of fishes*, vol. 3. Dordrecht, NL: Springer.
- Endler, J. A. (1987). Predation, light intensity and courtship behaviour in *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae). *Animal Behaviour*, **35**, 5, 1376-1385.
- Farr, J. A. (1977). Male rarity or novelty, female choice behavior, and sexual selection in the guppy, *Poecilia reticulata* Peters (Pisces: Poeciliidae). *Evolution*, **31**, 162-168.
- Farr, J. A. (1980). Social behavior patterns as determinants of reproductive success in the guppy, *Poecilia reticulata* Peters (Pisces: Poeciliidae) an experimental study of the

- effects of intermale competition, female choice, and sexual selection. *Behaviour*, **74**, 1-2, 38-90.
- Farr, J. A. (1984). Premating behavior in the subgenus *Limia* (Pisces: Poeciliidae): sexual selection and the evolution of courtship. *Ibid*, **65**, 152-165
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 4, 783-791.
- Garman, S. (1895). The cyprinodonts. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology*, **19**, 1, 1-12.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & De Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **270**, (suppl_1), S96-S99.
- Hensel, R. (1868). Beiträge zur Kenntnis der Wirbelthiere Südbrasilens. *Archives für Naturgeschichte*, **34**, 323-375.
- Houde, A. E. (1992). Sex-linked heritability of a sexually selected character in a natural population of *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae)(guppies). *Heredity*, **69**, 3, 229-235.
- Ivanova, N. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. H., & Hebert, P. D. (2007). Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 4, 544-548.
- Jönck, C. R. (2004). Coloração críptica de *Phalloceros caudimaculatus* (Helsen, 1868) e resposta à alteração do substrato. *Ecologia e conservação da floresta Mata Atlântica na reserva natural Salto Morato*, pp. 95.
- 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.
- Lara, A., Ponce de León, J. L., Rodriguez, R., Casane, D., Cote, G., Bernatchez, L., & García-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.
- Leal, C. G., Junqueira, N. T., & Pompeu, P. S. (2011). Morphology and habitat use by fishes of the Rio das Velhas basin in southeastern Brazil. *Environmental biology of fishes*, **90**, 2, 143-157.
- Lucena, C.A.S., Calegari, B.B., Pereira, E.H.L. & Dallegrove, E. (2013). O uso de óleo de cravo na eutanásia de peixes. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia*, **105**, 20-24.
- Lucinda, P. H. F. (2003). Family Poeciliidae. In R. E. Reis, S. O. Kullander, & C. J. Ferraris Jr. (Eds.), *Check list of the freshwater fishes of South and Central America* (pp. 555 – 581). Porto Alegre, SC: Edipucrs.
- Lucinda, P. H. F. (2005a). Systematics of the genus *Cnesterodon* Garman, 1895 (Cyprinodontiformes, Poeciliidae, Poeciliinae). *Neotropical Ichthyology*, **3**, 259-270.

- Lucinda, P. H. F. (2005b). Systematics and biogeography of the genus *Phalloptychus* Eigenmann, 1907 (Cyprinodontiformes, Poeciliidae, Poeciliinae). *Neotropical Ichthyology*, **3**, 373-382.
- Lucinda, P. H. F. (2008). Systematics and biogeography of the genus *Phalloceros* Eigenmann, 1907 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae), with the description of twenty-one new species. *Neotropical Ichthyology*, **6**, 2, 113-158.
- Lucinda, P. H. F., & Reis, R. E. (2005). Systematics of the subfamily Poeciliinae Bonaparte (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). *Neotropical Ichthyology*, **3**, 1-60.
- Lucinda, P. H. F., Rosa, R. S., & Reis, R. E. (2005). Systematics and biogeography of the genus *Phallotorynus* Henn, 1916 (Cyprinodontiformes, Poeciliidae, Poeciliinae). *Copeia*, **2005**, 609-631.
- Machado, M. M. M. (2009). Construindo a imagem geológica do Quadrilátero Ferrífero: conceitos e representações. Tese de Doutorado, Instituto de Geociências, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 238 p.
- Magurran, A. E., & Nowak, M. A. (1991). Another battle of the sexes: the consequences of sexual asymmetry in mating costs and predation risk in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **246**, 1315, 31-38.
- Magurran, A. E., & Seghers, B. H. (1990). Population differences in predator recognition and attack cone avoidance in the guppy *Poecilia reticulata*. *Animal Behaviour*, **40**, 3, 443-452.
- Moreira, M. A., Faria, L. E., Ferreira, T. F., & Maia, B. P. (2015). Levantamento ictiofaunístico na Gruta Lapa das pacas e córrego samambaia na área de proteção ambiental (APA) cárstica de Lagoa Santa, Minas Gerais. In: Rasteiro, M. A., & Sallun, W. F. (Eds.) 33º Congresso Brasileiro de Espeleologia (117-125). Eldorado, SP: SBE.
- Nemenyi, P. B. (1963). *Distribution-free multiple comparisons*. Princeton University.
- Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. (2016). *Fishes of the World*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Oliveira, I. J. (2017). *Phylogeographic of a specie complex within Phalloceros harpagos Lucinda, 2008* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) (Masters thesis). Available from UEM Library <http://repositorio.uem.br:8080/jspui/handle/1/4858>.
- Pacheco, B. G. A. P. (2019). *Parallel evolution in two Phalloceros species*. (Doctoral thesis, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, BR). Retrieved from <http://www.bdt.d.uerj.br/handle/1/4904>.
- Parenti, L. R. (2005). The phylogeny of atherinomorphs: Evolution of a novel fish reproductive system. In M. C. Uribe, & H. J. Grier (Eds.), *Viviparous Fishes: Proceedings of the I and II International Symposia on Livebearing Fishes* (pp. 13 – 30). Homestead, FL: New Life Publications.
- 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., Maia, G. M., Hanner, R., Foresti, F., & Oliveira, C. (2011). DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial Dna*, **22** (sup1), 71-79.
- Peters, W. 1859. Eine neue vom Herrn Jagor im atlantischen Meere gefangene Art der Gattung *Leptocephalus*, und über einige andere neue Fische des Zoologischen Museums. *Monatsberichte der Königlichen Preussischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin*. **1859**, 411-413.
- Poeser, F. N., Kempkes, M., & Isbrücker, I. J. H. (2005). Description of *Poecilia* (*Acanthophaelus*) *wingei* n. sp. from the Paría Peninsula, Venezuela, including notes on *Acanthophaelus* Eigenmann, 1907 and other subgenera of *Poecilia* Bloch and Schneider, 1801 (Teleostei, Cyprinodontiformes, Poeciliidae), *Contributions to Zoology*, **74**, 1-2, 97-115. doi: <https://doi.org/10.1163/18759866-0740102007>
- Poey, F. (1851). Memorias sobre la historia natural de la Isla de Cuba, acompañadas de sumários Latinos y extractos em Francés. La Habana, **1**, 1-34.
- Pollux, B. J. A., Meredith, R. W., Springer, M. S., Garland, T., & Reznick, D. N. (2014). The evolution of the placenta drives a shift in sexual selection in livebearing fish. *Nature*, **513**, 7517, 233-236.
- Prazdnikov, D. V. (2021). Role of thyroid hormones in color diversity of male guppies: experimental data on Endler's guppy (*Poecilia wingei*). *Environmental Biology of Fishes*, **104**, 6, 675-688.
- Řežucha, R., & Reichard, M. (2015). Strategic exploitation of fluctuating asymmetry in male Endler's guppy courtship displays is modulated by social environment. *Journal of evolutionary biology*, **28**, 2, 356-367.
- Rosen, D. E., & M. Gordon. (1953). Functional anatomy and evolution of male genitalia in Poeciliid fishes. *Zoologica*, **38**, 1-47.
- Rosen, D. E., & Tucker, A. (1961). Evolution of secondary sexual characters and sexual behavior patterns in a family of viviparous fishes (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Copeia*, **1961**, 2, 201-212.
- dos Santos, S. A., & de Britto, M. R. (2021). The ichthyofauna of a poorly known area in the middle-southern Espinhaço mountain range, state of Minas Gerais, Brazil: diagnostics and identification keys. *ZooKeys*, **1054**, 25.
- Silva, F. R. (2007). Paisagem do Quadrilátero Ferrífero, MG: potencial para o uso turístico da sua Geologia e Geomorfologia. Dissertação de Mestrado, Instituto de Geociências, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 144p.
- Souto-Santos, I. C. A, Jennings, W. B., & Buckup, P. A. (2022). Testing palaeodrainage hypotheses in south-eastern Brazil: phylogeography of the sinistral livebearer fish of the genus *Phalloceros* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*.
- Taylor, W. R., & G. C. Van Dyke. (1985). Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybiurn*, **9**, 107-119.
- Thayer, G. H. (1909). *Concealing-coloration in the animal kingdom: an exposition of the laws of disguise through color and pattern*. New York, NY: Macmillan Company.

Thomaz, A. T., Carvalho, T. P., Malabarba, L. R., & Knowles, L. L. (2019). Geographic distributions, phenotypes, and phylogenetic relationships of *Phalloceros* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae): Insights about diversification among sympatric species pools. *Molecular phylogenetics and Evolution*, **132**, 265-274.

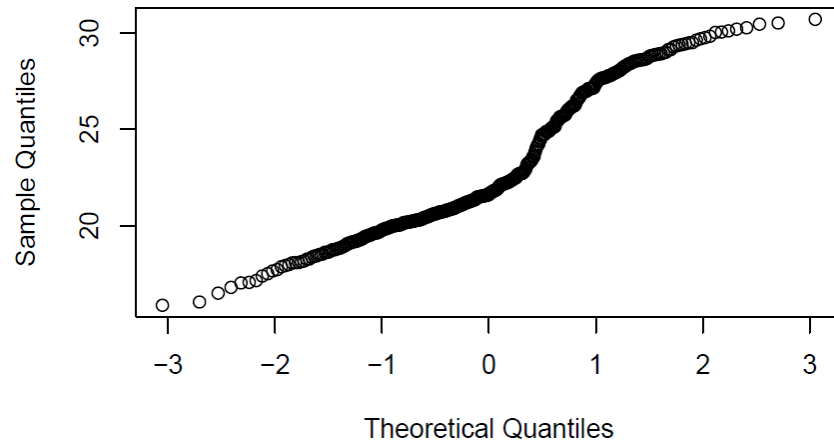
Van der Laan, R. & Fricke, R. (2022). Eschmeyer's Catalog of Fishes: Family-Group Names. (<http://www.calacademy.org/scientists/catalog-of-fishes-family-group-names/>). Electronic version accessed 27 jun 2022.

Vieira F., Gomes, J. P. C., Maia B. P. & Silva L. G. M. (2015). Peixes do Quadrilátero Ferrífero – Guia de Identificação. Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas.

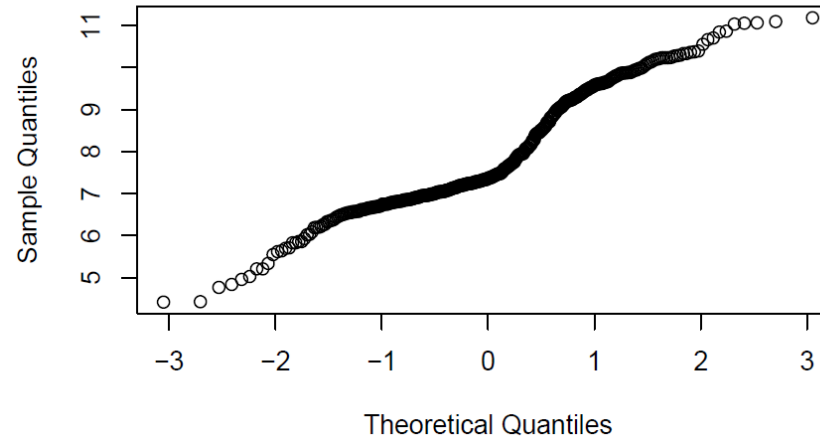
6 - ANEXOS

6.1 - ANEXO 1 – Representação gráfica do teste de normalidade do comprimento total dos machos e do comprimento do gonopódio em machos.

Normal Q-Q Plot



Normal Q-Q Plot



**Capítulo 2 – Aspectos da história natural relacionados à
alimentação e reprodução de *Phalloceros uai* Lucinda,
2008 (Actionopterygii: Cyprinodontiformes: Poeciliidae) na
região do Quadrilátero Ferrífero, drenagens do alto rio
Doce e alto São Francisco, MG.**

Resumo

Estudos de história natural, com análises de como e quais habitats as espécies utilizam, o tipo de alimento utilizado e como é obtido, estratégias e períodos reprodutivos, são essenciais para a compreensão da vida animal, e posteriormente, para entender temas mais complexos e aplicados da biologia. As espécies do gênero *Phalloceros* Eigenmann, 1907 são consideradas onívoras, e apresentam matrotrofia substancial/viviparidade e em algumas espécies superfetação. Entretanto, muitas de suas espécies permanecem sem conhecimento da história natural, como em *Phalloceros uai* Lucinda, 2008. Considerando essa lacuna de conhecimento, o objetivo desse trabalho é descrever os hábitos alimentares e características reprodutivas das populações de *P. uai* encontradas nas bacias do alto rio Doce (sub bacia do Piracicaba) e São Francisco (sub bacias dos rios Paraopeba e das Velhas). Os exemplares foram obtidos entre 2018-2021 de quatro pontos distribuídos no alto rio Doce e no alto rio São Francisco. Foram selecionados para dissecação e análise do conteúdo estomacal e a presença de superfetação 90 exemplares, sendo 55 fêmeas e 35 machos de diferentes localidades, com três fenótipos diferentes em relação ao número de manchas laterais e abrangendo cinco categorias de tamanho. Nas análises estomacais foram encontrados 49,41% dos animais com algum item alimentar no estômago. Desse 28,23% apresentaram detrito, 18,82% Diptera, 4,70% material não identificado e 3,53% material vegetal. Não houve diferenças no consumo de itens alimentares entre os sexos e populações. Foram analisados 2028 embriões, e cujas fêmeas apresentaram viviparidade e superfetação. Os embriões nos estágios finais de desenvolvimento apresentaram as manchas laterais características da espécie, sendo registrado filhotes com o fenótipo 1x1, 1x2 e 2x2, como registrado em exemplares adultos. Foi verificada correlação positiva entre o número de embriões e o comprimento total da fêmea, sendo que para o aumento de um milímetro no comprimento total da fêmea, houve um acréscimo médio de 3,23 embriões. *Phalloceros uai* se apresentou carnívora, alimentando-se majoritariamente de itens de origem animal autóctone, como invertebrados aquáticos, raramente ingerindo material de origem vegetal, corroborando dados da literatura para outras espécies do gênero. A presença de uma estrutura placentária está associada à ausência de coloração brilhante, ao comportamento de corte e a traços exagerados de ornamentação em machos, condizente com as características de *P. uai*, apesar da ausência de estudos

de corte na espécie. Acredita-se que a placenta leva a conflitos sexuais, os quais tendem à evolução do dimorfismo sexual, entretanto, algumas espécies do gênero apresentam estrutura placentária sem dimorfismo sexual acentuado. A presença de superfetação parece ter surgido várias vezes dentro do gênero, visto que ocorrem espécies com superfetação como *P. uai*, espécies sem superfetação como *P. caudimaculatus* e *P. anisophallos* e espécies com superfetação em algumas populações e outras não, caso de *P. harpagos*. Os dados indicam que *P. uai* é uma espécie carnívora, vivípara e com superfetação em todas as populações analisadas.

Palavras chaves: Carnivoria; viviparidade; superfetação.

Abstract

Natural history studies, such as analyzes of how and which habitats species use, the type of food ingested and how it is obtained, reproductive strategies and periods, are essential for understanding animal life, and later, for understanding more complex and applied topics in biology. Species of the genus *Phalloceros* Eigenmann, 1907 are considered omnivorous and show substantial matrotrophy and in some species superfetation. However, many of its species remain without proper studies of natural history, as with the species *Phalloceros uai* Lucinda, 2008. Considering this knowledge gap, the objective of this work is to describe the feeding habits and reproductive characteristics of *P. uai* populations found in the upper Doce river basin (Piracicaba sub basin) and upper São Francisco basin (Paraopeba and das Velhas basin). The specimens were sampled between 2021-2021 from 4 points distributed in the upper Doce river basin and São Francisco basin. 90 specimens were selected, 55 females and 35 males from different locations, with three different phenotypes in relation to the number of lateral spots covering five size categories. In the stomach analysis, 49,41% of animal's stomach were found with some food item, 28,23% were detritus, 18,82% Diptera, 4,70% unidentified material and 3,53% vegetal material. There were no dietary differences between sexes and populations. 2028 embryos were analyzed, whose females showed viviparity and superfetation. Embryos in the final stages of development presented the characteristic lateral spots of the species, being registered phenotype 1x1, 1x2 and 2x2, as registered in adults specimens. A positive correlation was verified between the number of embryos of a female and the total length, and for the increase of one millimeter in the total length of the female, there was an average increase of 3,23 embryos. *P. uai* was carnivorous, feeding mostly on autochthonous animal items, such as aquatic invertebrates, rarely ingesting vegetal items, corroborating data from the literature for others *Phalloceros* species. The presence of placenta is associated with the absence of bright coloration, courtship behavior and exaggerated ornamentation traits in males, consistent with the characteristics of *P. uai*, despite the absence of courtship studies in the species. It is believed that the placenta leads to sexual conflicts, which tend to the evolution of sexual dimorphism, however, some species of the genus presents placental structure without accentuated sexual dimorphism. The presence of superfetation seems to have appeared several times within the genus, since there are species with superfetation,

such as *P. uai*, species without superfetation, such as *P. caudimaculatus* and *P. anisophallos* and species with superfetation occurring in some populations and in others not, in the case of *P. harpagos*. In conclusion, the data indicate that *P. uai* is a carnivorous species, viviparous and with superfetation in all analyzed populations.

Keywords: Carnivore; viviparity; superfetation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Trecho do córrego do Jaque na localidade tipo de *Phalloceros uai*, afluente da margem esquerda do rio das Velhas, Lagoa Santa, MG. 4
- Figura 2 – Mapa contendo os locais de amostragem das populações de *Phalloceros* nas drenagens do alto rio Doce e São Francisco, MG. 5
- Figura 3 – Estágios embrionários baseados em *Phalloceros harpagos*. Legenda: (a) estágio 0; (b) estágio 5; (c) estágio 10; (d) estágio 15; (e) estágio 20; (f) estágio 25; (g) estágio 30; (h) estágio 35; (i) estágio 40; (j) estágio 45; (k) estágio 50. Fonte: Pacheco, 2019. 8
- Figura 4 – Conjunto de embriões retirados de uma fêmea de *Phalloceros uai* envoltos por uma fina membrana. Escala 1 cm. 13
- Figura 5 – Conjunto de embriões retirados de uma fêmea *Phalloceros uai* envoltos por uma fina membrana. Escala 1 mm. 14
- Figura 6 – Frequência de embriões de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008 em cada estágio embrionário. Number of embryos. número de embriões. Embryonic stage. estágio embrionário. 15
- Figura 7 – Frequência de embriões de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008 em cada estágio embrionário separados por fenótipo (0x0, 1x1, 1x2, 2x2). Number of embryos. número de embriões. Embryonic stage. estágio embrionário. Phenotype. fenótipo. 16
- Figura 8 – Frequência dos diferentes fenótipos (0x0, 1x1, 1x2, 2x2) de embriões de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008 nos estágios finais (40) separados pela localidade e fenótipo da mãe (1x1, 1x2, 2x2). Number of embryos. número de embriões. Embryo Phenotype. fenótipo do embrião. Mother`s Phenotype. fenótipo da mãe. 16
- Figura 9 – Representação gráfica da correlação de Pearson do número de embriões retirados de uma fêmea pelo comprimento total (mm). 17

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Pontos amostrais utilizados para coletas de *Phalloceros* Eigenmann, 1907 com coordenadas geográficas. 3
- Tabela 2 – Categorias de tamanho, em milímetros, de machos e fêmeas de cada população de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008 utilizados na dissecação. 6
- Tabela 3 – Estágios de desenvolvimento embrionário. 7
- Tabela 4 – Número total e frequência do conteúdo estomacal separado por item alimentar e sexo. N. quantidade de estômagos encontrados com o item alimentar. 11
- Tabela 5 – Número total e frequência do conteúdo estomacal separado por item alimentar, população e sexo. N. quantidade de estômagos encontrados com o item alimentar. %. frequência do item alimentar. 12
- Tabela 6 – Número de embriões de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008 por localidade. 13

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

b	Coeficiente angular
CCT-UFMG	Centro de coleções taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais
cm	Centímetros
e.g.	Exemplos
EP	Erro padrão
<i>et al.</i>	E colaboradores
F	Estatística F
GL	Grau Gay Lussac
IEF-MG	Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais
p	Probabilidade
r ²	Coeficiente de determinação

1 - INTRODUÇÃO

O tema *história natural* dos organismos possui diversas definições, ainda que em grande parte se refiram a análises de como e quais habitats as espécies utilizam, o tipo de alimento ingerido e como é obtido, estratégias e períodos reprodutivos, entre outras (e.g. BARTHOLOMEW, 1986; HERMAN, 2002; GREENE, 2005; SCHMIDLY, 2005; TEWKSBURY *et al.*, 2014). Esses conhecimentos são considerados como ecologia básica, sendo essenciais para entender temas mais complexos e aplicados da biologia, como as teias alimentares, a dinâmica do fluxo de energia, a ecologia desde o nível populacional até o ecossistêmico, entre outros (BRAGA *et al.*, 2012), além de essenciais para a definição de estratégias de conservação das espécies.

A ordem Cyprinodontiformes é composta por 14 famílias, 143 gêneros e cerca de 1430 espécies, de maioria dulcícola (PARENTI, 2005; NELSON *et al.*, 2016; FRICKE *et al.*, 2022). Dentre as famílias encontra-se Poeciliidae, dividida em três subfamílias, englobando 27 gêneros e 275 espécies válidas (FRICKE *et al.*, 2022), sendo a terceira família mais diversa dos Cyprinodontiformes. Os representantes da família são conhecidos popularmente como *livebeares*, *guppy*, *guppies*, *lebistes* e *barrigudinhos*. O gênero *Phalloceros* Eigenmann, 1907 é o mais especioso da família na América do Sul, incluindo 22 espécies de pequeno porte distribuídas nas bacias hidrográficas do sul e sudeste do continente (LUCINDA, 2008; NELSON *et al.*, 2016; THOMAZ *et al.*, 2019).

Em 2008, o gênero *Phalloceros*, que era monotípico, passou por uma revisão taxonômica permitindo o reconhecimento e a descrição das 21 espécies e a redescritção de *P. caudimaculatus* (Hensel, 1868) (LUCINDA, 2008). Previamente a este estudo, diversas populações em regiões geográficas distintas e tratadas exclusivamente como *P. caudimaculatus*, foram objeto de análise para diferentes tópicos, mas principalmente em relação a reprodução.

De modo geral, espécies do gênero *Phalloceros* são consideradas onívoras, alimentando-se de formas imaturas de insetos aquáticos e terrestres, detritos e algas (MAZZONI *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2019; PACHECO, 2019). Em um estudo sobre a atratividade de iscas para a análise de comunidades de peixes usando vídeos remotos subaquáticos, observou-se que *Phalloceros uai* Lucinda, 2008 foi atraído com

isca de milho, ração e sardinha (TIBÚRCIO *et al.*, 2018), ainda que esses tipos de alimentos não possam ser indicados como parte da dieta natural da espécie.

No âmbito reprodutivo, poecilídeos possuem dois tipos de reprodução: lecitotrofia ou matrotrofia/placentotrofia, podendo apresentar superfetação ou não (POLLUX *et al.*, 2009, 2014; PACHECO, 2019). A lecitotrofia ocorre quando são produzidos oócitos grandes e os embriões utilizam as reservas de vitelo como fonte de alimento (POLLUX *et al.*, 2014; PACHECO, 2019), enquanto a matrotrofia/placentotrofia substancial é caracterizada pela produção de pequenos oócitos, seguido do fornecimento substancial de nutrientes maternos aos embriões pós fecundação por uma estrutura placentária (POLLUX *et al.*, 2014; PACHECO, 2019). Na superfetação as fêmeas apresentam a habilidade de carregarem simultaneamente embriões em diferentes estágios de desenvolvimento (TURNER, 1937).

Alguns gêneros de poecilídeos que apresentam superfetação incluem *Heterandria* Agassiz 1853, *Pseudopoecilia* Regan 1913, *Poeciliopsis* Regan 1913, *Poecilia* Bloch & Schneider 1801, *Neoheterandria* Henn 1916, *Phalloceros*, *PhalLOPTYCHUS* Eigenmann 1907 e *Xenodexia* Hubbs 1950 (POLLUX *et al.*, 2009; PIRES *et al.*, 2010; GORINI-PACHECO *et al.*, 2017; PIERS & REZNICK, 2018), sugerindo o aparecimento independente dessa característica diversas vezes na linha evolutiva da família (PACHECO, 2019). ROSEN & BAILEY (1963) relataram a ausência de superfetação em fêmeas de *P. caudimaculatus*, característica também indicada por POLLUX *et al.* (2014). Por outro lado, PACHECO (2019) avaliou *P. harpagos* Lucinda 2008 e *P. anisophallos* Lucinda 2008, e encontrou que ambas apresentavam matrotrofia substancial sem superfetação, divergindo de GORINI-PACHECO *et al.* (2017) que detectaram superfetação para *P. harpagos*.

Considerando a lacuna sob vários aspectos da história natural das espécies de *Phalloceros*, o objetivo desse trabalho foi avaliar características da reprodução e alimentação natural em populações de *P. uai* distribuídas nas bacias do alto rio Doce (sub bacia do Piracicaba) e São Francisco (sub bacias dos rios Paraopeba e das Velhas).

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

Os exemplares analisados são provenientes do alto rio Doce (sub bacia do rio Piracicaba), e alto rio São Francisco (sub bacias dos rios Paraopeba e das Velhas) (Tabela 1). Parte do material faz parte da coleção de peixes do Centro de Coleções Taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CCT-UFMG), enquanto exemplares adicionais foram obtidos entre 2018 e 2021 (Figura 1; Figura 2; Tabela 1). Exemplares testemunhos encontram-se depositados na coleção ictiológica da Universidade Federal de Minas Gerais (CCT-UFMG).

Tabela 1: Pontos amostrais utilizados para coletas de *Phalloceros* Eigenmann, 1907 com coordenadas geográficas.

Código	Drenagem	Distrito/Município	Latitude S	Longitude O	Altitude (m)	Data
Ponto 1	Córrego Congonhas, afluente margem direita do rio Piracicaba	Santa Rita Durão, Mariana	20°11'28.28"	43°24'45.82"	808	10/2018 08/2019
Ponto 2	Ribeirão Caraça, afluente do rio Barão de Cocais ou São João, sub drenagem do rio Santa Bárbara (bacia do rio Piracicaba)	Brumal, Santa Bárbara	19°58'53.40"	43°27'15.27"	739	10/2018 08/2019
Ponto 3	Rio Manso, afluente da margem esquerda do rio Paraopeba	Brumadinho	20°09'0.98"	44°13'53.59"	732	06/2021 09/2021
Ponto 4	Córrego do Jaque, afluente da margem esquerda do rio das Velhas (Localidade tipo)	Lagoa Santa	19°34'28.58"	43°55'28.64"	657	06/2021



Figura 1: Trecho do córrego do Jaque na localidade tipo de *Phalloceros uai*, afluente da margem esquerda do rio das Velhas, Lagoa Santa, MG.

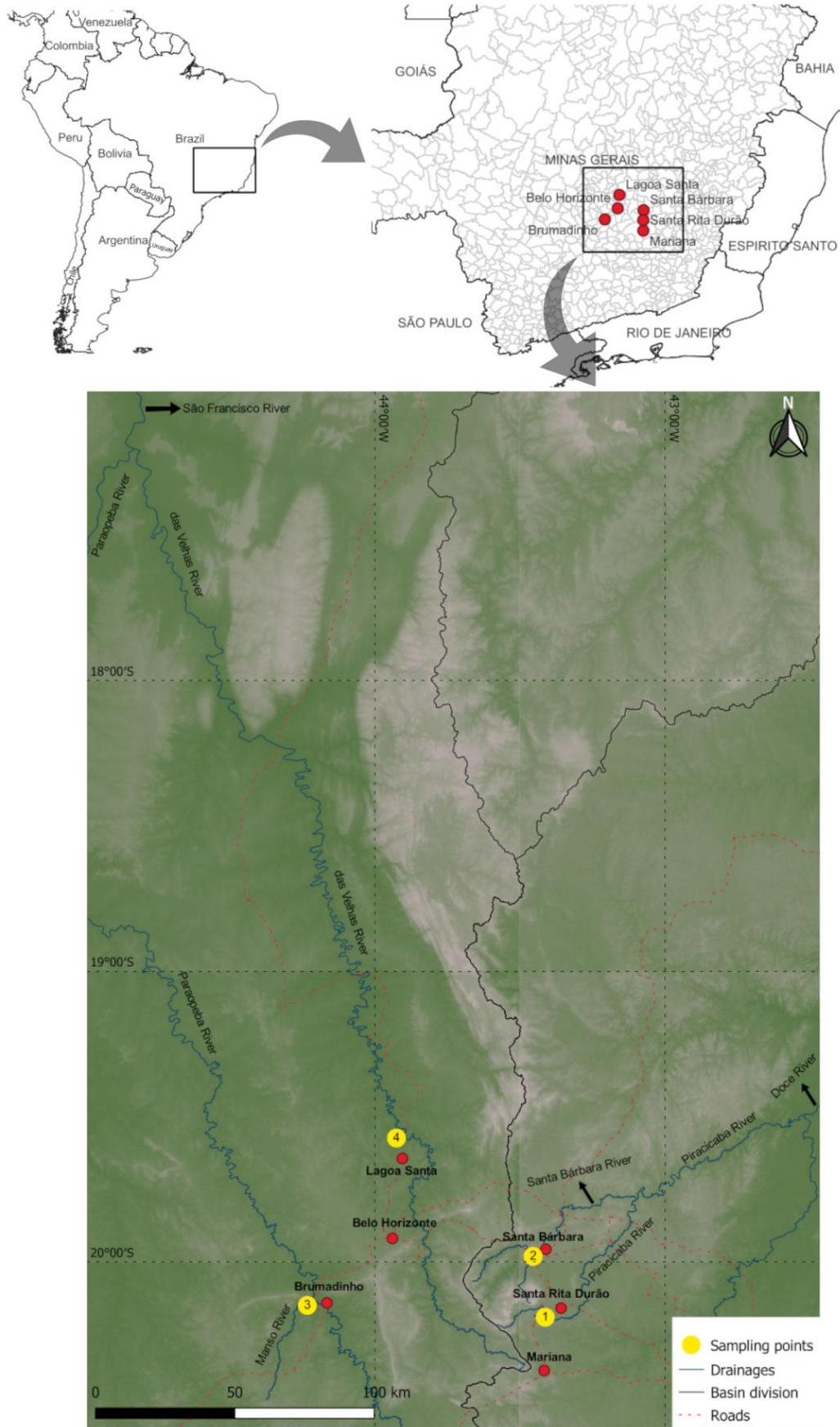


Figura 2: Mapa indicando os locais de amostragem das populações de *Phalloceros* nas drenagens do alto rio Doce e São Francisco, MG.

Os exemplares foram obtidos durante estudos para licenciamento ambiental, cujas licenças de captura foram expedidas pelo Instituto Estadual de Florestas (IEF-MG). As capturas foram feitas utilizando-se peneiras em formato de meia lua revestidas com tela de náilon e malha de dois milímetros.

Após a captura os exemplares foram imersos em solução hidro alcoólica contendo óleo de cravo comercial para completa anestesia e eutanásia, conforme procedimentos descritos em Lucena *et al.* (2013), e posteriormente fixados em formalina 10%. Em laboratório, todos os peixes foram lavados em água corrente e mantidos em álcool 70° GL. Todos os exemplares capturados foram identificados taxonomicamente, com auxílio de um microscópio estereoscópio Zeiss™ Stemi DV4, separados como adultos, machos e fêmeas, e juvenis.

Para a dissecação e análises reprodutivas e de alimentação, foram selecionados 90 exemplares (machos e fêmeas) de diferentes localidades, com três fenótipos diferentes baseados no número de manchas laterais (1x1, 1x2 e 2x2), abrangendo cinco categorias de tamanho (Tabela 2). A dissecação foi realizada através de um corte horizontal na lateral do exemplar para retirada do sistema digestivo e dos embriões em fêmeas.

Tabela 2. Categorias de tamanho, em milímetros, de machos e fêmeas de cada população de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008 utilizados na dissecação.

Fêmeas			Machos		
Localidade	Categorias	Número de exemplares	Localidade	Categorias	Número de exemplares
Ponto 1	1 24,41 – 29,16	6	Ponto 1	1 24,41 – 29,16	2
	2 29,16 – 33,91	5		2 29,16 – 33,91	3
	3 33,91 – 38,66	5		3 33,91 – 38,66	4
	4 38,66 – 43,41	5		4 38,66 – 43,41	4
	5 43,41 – 48,12	4		5 43,41 – 48,12	2
		Total = 25			Total = 20
Ponto 2	1 24,41 – 29,16	3	Ponto 2	1 24,41 – 29,16	-
	2 29,16 – 33,91	1		2 29,16 – 33,91	2
	3 33,91 – 38,66	1		3 33,91 – 38,66	1
	4 38,66 – 43,41	-		4 38,66 – 43,41	2
	5 43,41 – 48,12	-		5 43,41 – 48,12	-
		Total = 5			Total = 5
Ponto 3	1 24,41 – 29,16	4	Ponto 3	1 24,41 – 29,16	2
	2 29,16 – 33,91	4		2 29,16 – 33,91	4
	3 33,91 – 38,66	5		3 33,91 – 38,66	2

	4	38,66 – 43,41	5	4	38,66 – 43,41	2
	5	43,41 – 48,12	2	5	43,41 – 48,12	-
	Total = 20				Total = 10	
Ponto 4	1	24,41 – 29,16	3	1	24,41 – 29,16	-
	2	29,16 – 33,91	1	2	29,16 – 33,91	-
	3	33,91 – 38,66	1	3	33,91 – 38,66	-
	4	38,66 – 43,41	-	4	38,66 – 43,41	-
	5	43,41 – 48,12	-	5	43,41 – 48,12	-
	Total = 5					

Nas fêmeas foi avaliada o modo reprodutivo, seguindo os conceitos de LODÉ (2012), e a superfecundação, ou seja, presença simultânea de embriões em diferentes estágios de desenvolvimento em uma mesma fêmea (TURNER, 1937). Neste trabalho foi utilizada a classificação de REZNICK *et al.* (2002) sobre estágios de desenvolvimento embrionário, modificada de HAYNES (1995) e conforme apresentado por PACHECO (2019). Os estágios de desenvolvimento embrionário variam do estágio 0 a 50 (Tabela 3; Figura 3). Nesse estudo os estágios 0, 5 e 10 foram agrupadas em um único estágio nomeado de 1 e não foram utilizados os estágios 45 e 50.

Tabela 3. Estágios de desenvolvimento embrionário.

Estágios (Reznick <i>et al.</i> , 2002)	Estágios	Características
0		Logo após a fecundação do ovócito, sem desenvolvimento e bolhas de lipídeos distribuídas uniformemente.
5	1	Nêurula em desenvolvimento ou presente.
10		Cabeça e cavidade ótica visíveis.
15	15	Olhos levemente pigmentados (cinza).
20	20	Olhos pigmentados (preto) e base da nadadeira caudal presente.
25	25	Corpo pigmentado, surgimento dos raios da nadadeira caudal e da base das nadadeiras peitorais.
30	30	Raios da nadadeira caudal pigmentados, surgimento dos raios das nadadeiras peitorais e da base das nadadeiras dorsal e anal.
35	35	Raios das nadadeiras peitorais pigmentados, surgimento dos raios das nadadeiras dorsal e anal.
40	40	Raios das nadadeiras dorsal e anal pigmentados, opérculo não definido completamente.

45	-	Formato oval do embrião, opérculo definido, saco pericárdico exposto, poucas escamas visíveis.
50	-	Escamas visíveis, cavidade pericárdica quase ou completamente fechada.

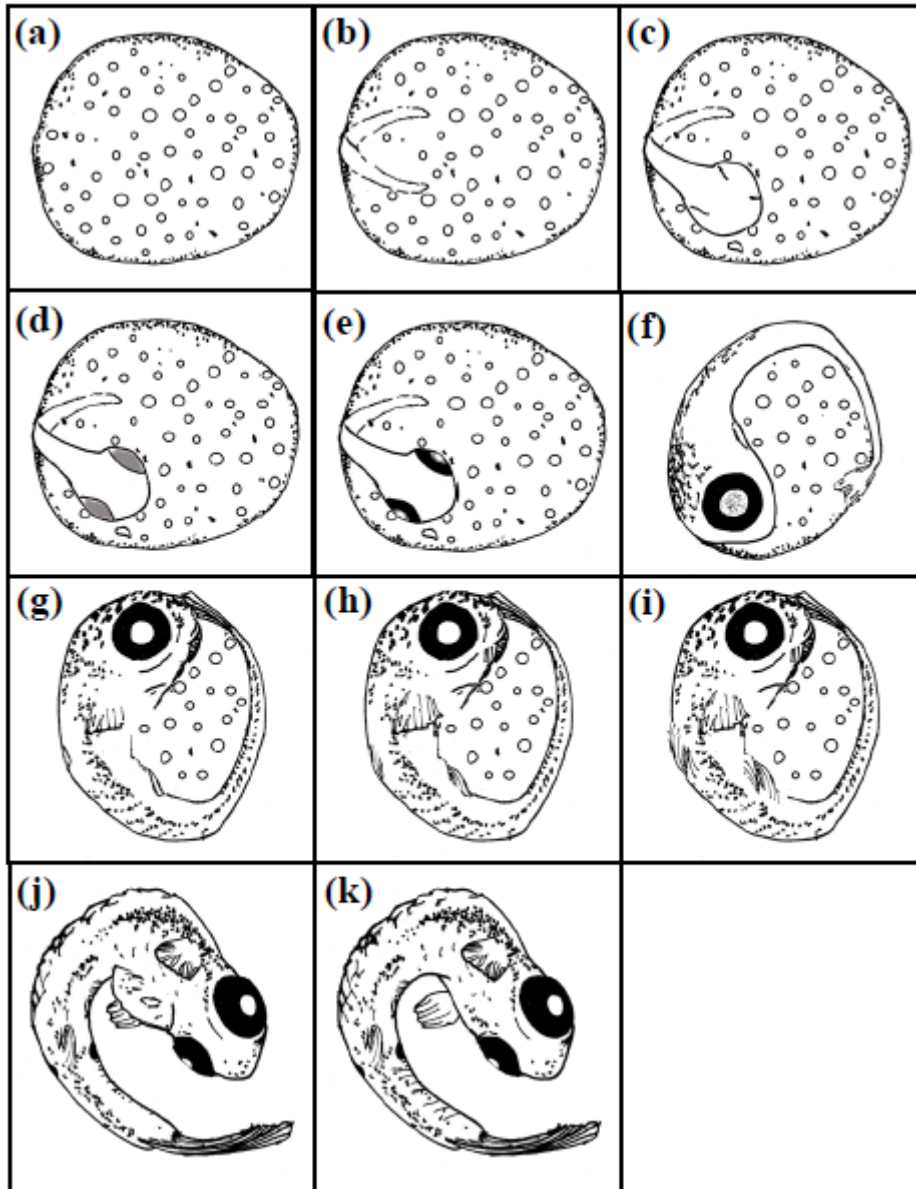


Figura 3: Estágios embrionários baseados em *Phalloceros harpagos*. Legenda: (a) estágio 0; (b) estágio 5; (c) estágio 10; (d) estágio 15; (e) estágio 20; (f) estágio 25; (g) estágio 30; (h) estágio 35; (i) estágio 40; (j) estágio 45; (k) estágio 50. Fonte: Pacheco, 2019.

A normalidade dos dados, comprimento total das fêmeas e número de embriões, foi testada a partir do teste de Shapiro-Wilk. Análise de correlação de Pearson foi usada para determinar a relação entre o número de embriões de uma

fêmea e o comprimento total em milímetros da mesma. Ambas as análises foram executadas através do software R™.

As análises estomacais foram realizadas para todos os exemplares através do método de frequência de ocorrência (HYSLOP, 1980). Os itens alimentares foram identificados até o nível de ordem, quando possível.

3 - RESULTADOS

Todas as áreas amostradas apresentaram alterações ambientais antrópicas, como presença de lixo e despejo de resíduos (Figura 1). Apesar disso, em todos os ambientes foram encontradas populações estabelecidas de *P. uai*.

Foram analisados 55 fêmeas e 35 machos. Nas análises estomacais foram registrados 49,41 % dos estômagos com algum item alimentar, enquanto 50,59% estavam vazios. Nos estômagos com alimento, a maioria apresentava invertebrados aquáticos, principalmente larvas de díptera (18,82%), e detritos, como pedras e grãos de areia (28,23%) (Tabela 4).

Não houve diferenças entre a alimentação de fêmeas e machos, que apresentaram os mesmos itens alimentares com uma pequena variação nas ordens de insetos encontradas (Tabela 4). Os indivíduos das diferentes populações se alimentaram dos mesmos itens alimentares, apenas com mudanças na frequência de ocorrência cada item (Tabela 5).

Tabela 4. Número total e frequência do conteúdo estomacal separado por item alimentar e sexo. N. quantidade de estômagos encontrados com item alimentar.

Item alimentar		Machos (n=35)		Fêmeas (n=55)		Total (n=90)	
		N	Frequência (%)	N	Frequência (%)	N	Frequência (%)
Invertebrados aquáticos	Coleoptera (Adulto)	-	-	1	1,82	1	1,18
	Coleoptera (Larva)	-	-	2	3,64	2	2,35
	Diptera (Adulto)	1	3,33	2	3,64	3	3,53
	Diptera (Larva)	6	20,00	10	18,18	16	18,82
	Ephemeroptera (Larva)	1	3,33	-	-	1	1,18
	Odonata (Larva)	-	-	1	1,82	1	1,18
	Trichoptera (Larva)	1	3,33	-	-	1	1,18
	Inseto adulto não identificado	2	6,66	2	3,64	4	4,70
	Material animal não identificado	-	-	6	10,91	6	7,06
Vegetal		1	3,33	2	3,64	3	3,53
Detrito	Grãos de areia/Pedras	4	13,33	20	36,36	24	28,23
Material não identificado		2	6,66	2	3,64	4	4,70
Vazio		16	53,33	27	49,09	43	50,59

Tabela 5. Número total e frequência do conteúdo estomacal separado por item alimentar e população. N. quantidade de estômagos encontrados com o item alimentar. %. frequência do item alimentar.

Item alimentar		População							
		Ponto 1 (n=45)		Ponto 2 (n=10)		Ponto 3 (n=30)		Ponto 4 (n=5)	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Invertebrados aquáticos	Coleoptera (Adulto)	-	-	-	-	-	-	1	25,00
	Coleoptera (Larva)	1	2,22	1	1,00	-	-	-	-
	Diptera (Adulto)	1	2,22	-	-	1	3,33	1	25,00
	Diptera (Larva)	2	4,44	2	2,00	11	36,67	1	25,00
	Ephemeroptera (Larva)	-	-	1	1,00	-	-	-	-
	Odonata (Larva)	-	-	-	-	1	3,33	-	-
	Trichoptera (Larva)	-	-	-	-	1	3,33	-	-
	Inseto adulto não identificado	-	-	2	2,00	1	3,33	1	25,00
	Material animal não identificado	-	-	2	2,00	3	10	1	25,00
Vegetal		3	6,67	-	-	-	-	-	-
Detrito	Grãos de areia/Pedras	16	35,56	1	1,00	5	16,67	2	50,00
Material não identificado		2	4,44	1	1,00	1	3,33	-	-
Vazio		31	68,89	3	3,00	9	30,00	-	-

Foram encontrados 2028 embriões em 55 fêmeas (Tabela 6), que se apresentavam juntos e envoltos em uma fina membrana (Figuras 4; Figura 5). Nos embriões em estágios finais de desenvolvimento foi possível identificar o olho, vitelo e as nadadeiras anal, dorsal e caudal.

Tabela 6. Número de embriões encontrados de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008 por localidade.

Localidade	Amplitude	Média	Mediana	Desvio padrão	Número de embriões
Ponto 1	4 – 106	44	28	32,1	1105
Ponto 2	0 – 34	18	22	13,5	90
Ponto 3	0 – 73	37	34	20,5	744
Ponto 4	0 – 46	18	11	18,2	89

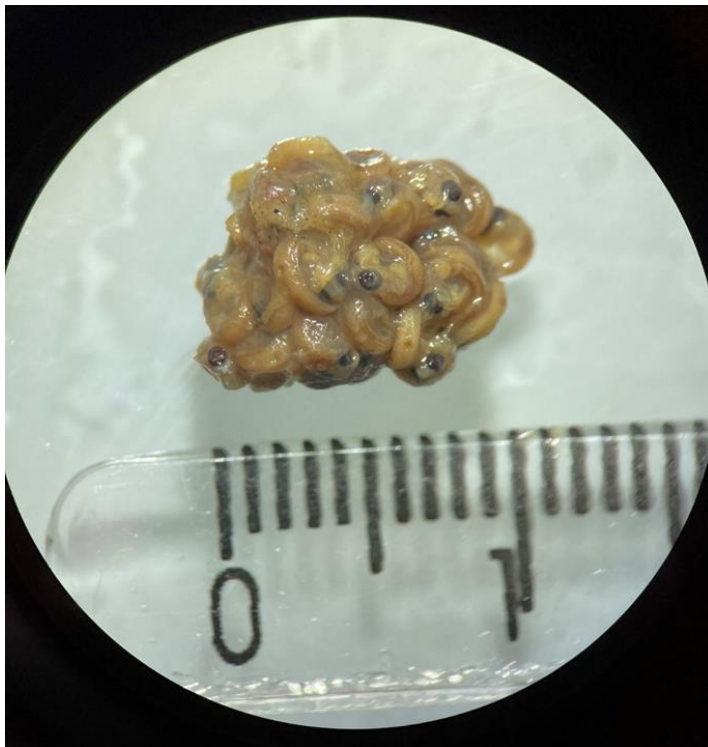


Figura 4: Conjunto de embriões retirados de uma fêmea de *Phalloceros uai* envoltos por uma fina membrana. Escala 1 cm.



Figura 5: Conjunto de embriões retirados de uma fêmea *Phalloceros uai* envoltos por uma fina membrana. Escala 1 mm.

Em todas as populações, fêmeas carregavam embriões em diferentes estágios de desenvolvimento, caracterizando superfecundação. A maioria dos filhotes encontrados estavam ou estágio inicial (1) ou no estágio final (40) (Figura 6).

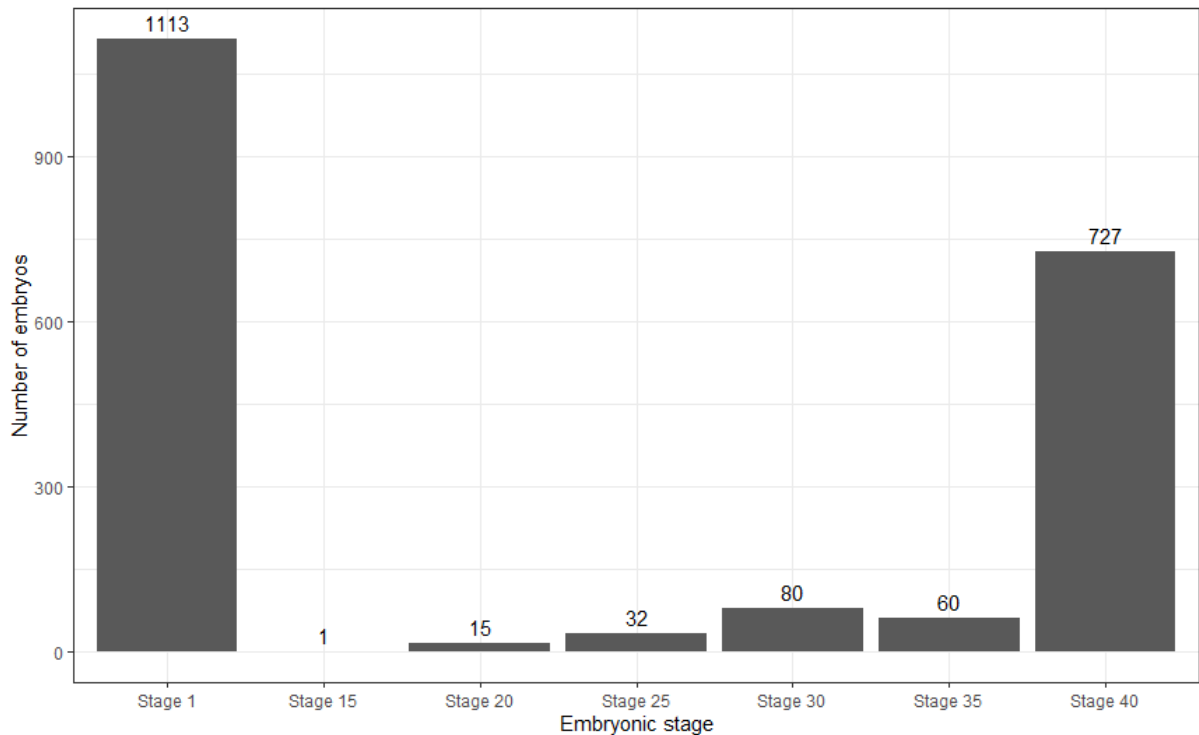


Figura 6: Frequência de embriões de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008 em cada estágio embrionário. Number of embryos. número de embriões. Embryonic stage. estágio embrionário.

Os embriões nos estágios finais (40) de desenvolvimento apresentaram as manchas laterais características da espécie, sendo registrado filhotes com o fenótipo 1x1, 1x2 e 2x2, como registrado em exemplares adultos (Figura 7). As únicas exceções foram na população do ponto 4 que apresentou apenas embriões com o fenótipo 1x1 e na população do ponto 2, onde foram registrados embriões sem manchas (Figura 8).

Foram registradas fêmeas com o fenótipo 1x1 dando origem a filhotes com outros fenótipos, por exemplo 1x2 e 2x2, da mesma forma que fêmeas com padrões 1x2 e 2x2 davam origem a filhotes com o fenótipo 1x1 (Figura 8).

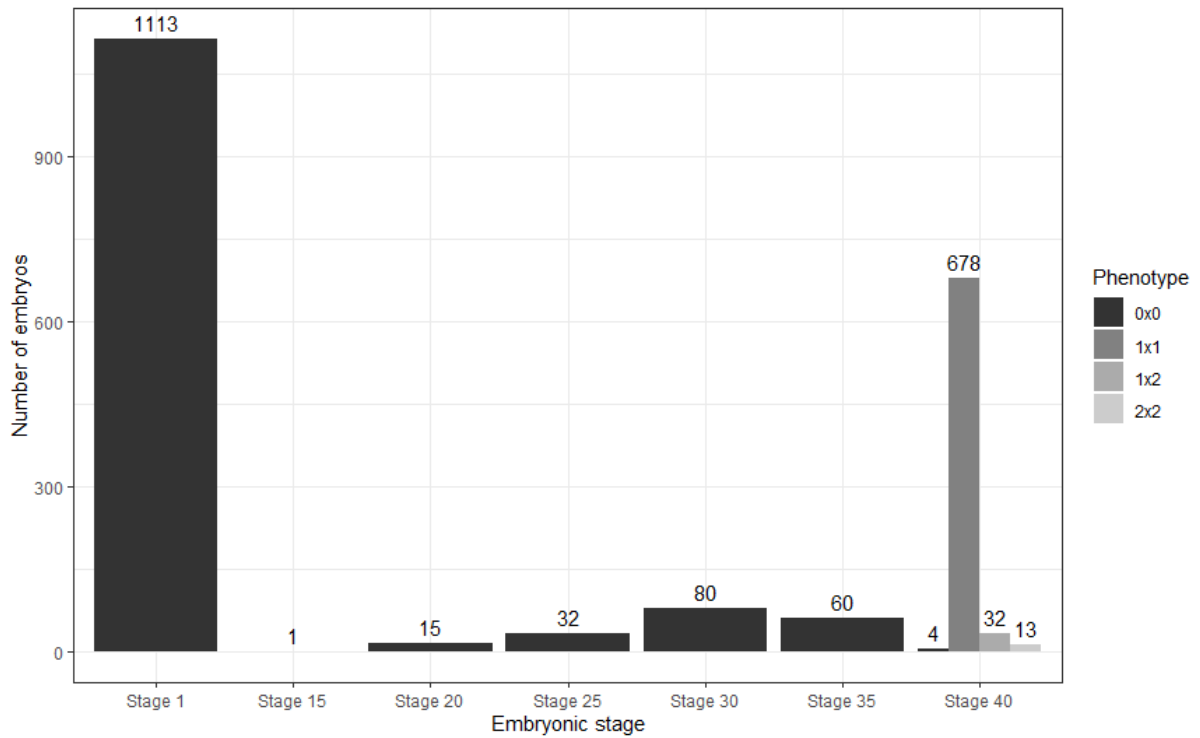


Figura 7: Frequência de embriões de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008 em cada estágio embrionário separados por fenótipo (0x0, 1x1, 1x2, 2x2). Number of embryos. número de embriões. Embryonic stage. estágio embrionário. Phenotype. fenótipo.

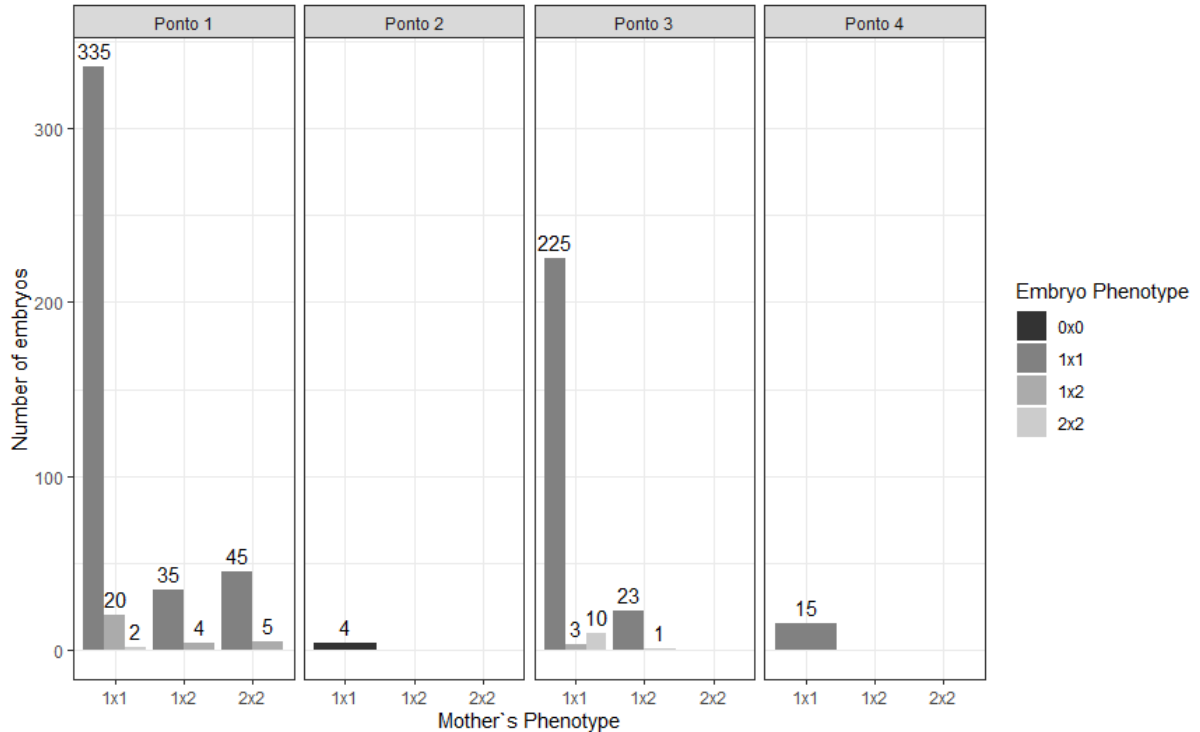


Figura 8: Frequência dos diferentes fenótipos (0x0, 1x1, 1x2, 2x2) de embriões de *Phalloceros uai* Lucinda, 2008 nos estágios finais (40) separados pela localidade e fenótipo da mãe (1x1, 1x2, 2x2). Number of embryos. número de embriões. Embryo Phenotype. fenótipo do embrião. Mother's Phenotype. fenótipo da mãe.

O comprimento total das fêmeas apresentou normalidade ($W=0,98$, $p>0,5$), condição não observada para o número de embriões ($W=0,91$, $p=0,001$) (Anexo 1). A correlação de Pearson demonstrou que o número de embriões de uma fêmea se relaciona positivamente com o comprimento total da mesma ($r^2=0,77$; $y=-77+3,4x$), para o aumento de um milímetro no comprimento total da fêmea, espera-se um acréscimo médio de 3,4 embriões (Figura 9).

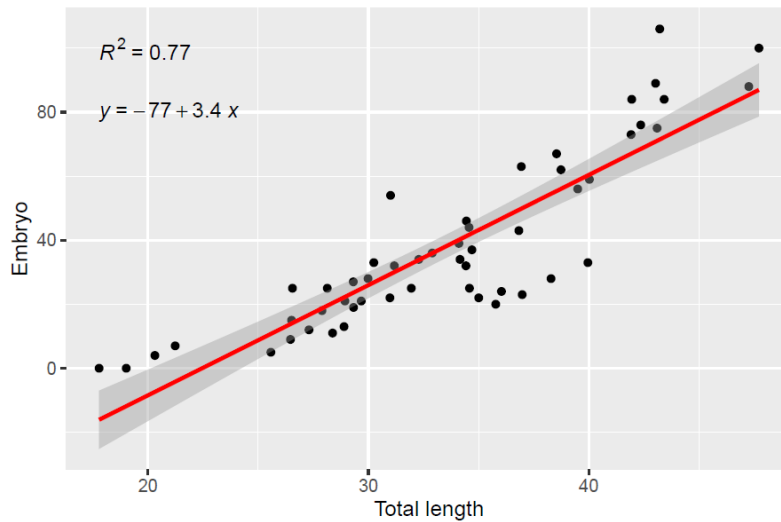


Figura 9: Representação gráfica do número de embriões obtidos de uma fêmea em relação ao comprimento total (mm).

4 - DISCUSSÃO

Todas as áreas amostradas apresentaram alterações ambientais marcantes, como registrado na localidade tipo. Essa condição destoa da citada para representantes do gênero *Phalloceros*, que são relacionados a regiões não poluídas ou afetadas de outras formas por ações humanas (CARVALHO *et al.*, 2019). Essa discrepância pode estar relacionada à maioria dos trabalhos com *Phalloceros* terem sido conduzidas em cursos de água pouco alterados, como os encontrados em região preservada da Mata Atlântica (e.g. CARVALHO *et al.*, 2019). Conforme as observações, *P. uai* possui ampla plasticidade na ocupação dos ambientes, ocorrendo desde áreas sob forte degradação ambiental até aquelas com condições pouco alteradas.

Phalloceros uai é considerado aqui como uma espécie carnívora, alimentando-se majoritariamente de invertebrados aquáticos, como relatado para outras espécies do gênero (ARANHA & CARAMASCHI, 1999). Apesar disso, populações de *Phalloceros* têm sido descritas como onívoras (CASATTI, 2002; ROCHA *et al.*, 2009; MAZZONI *et al.*, 2010), detritívoras (WOLFF *et al.*, 2022) e até mesmo casos de populações estritamente herbívoras (COSTA, 1987; TEIXEIRA, 1989).

Em *Poecilia reticulata* Peters, 1859 foi observado que populações vivendo em ambientes de alta predação tendem a se alimentar primariamente de invertebrados, enquanto em ambientes com predação menor se alimentam de detritos e algas (ZANDONÀ *et al.*, 2011). PACHECO (2019), ao avaliar a alimentação de *P. harpagos* e *P. anisophallos*, relatou não ter encontrado variação na biomassa de algas entre ambientes diferentes, apesar da biomassa de macroinvertebrados ser maior naqueles com maior índice de predação. Apesar das condições ecológicas, por exemplo temperatura e pH, e possivelmente pressão de predação serem variáveis entre as localidades avaliadas, não foram encontradas discrepâncias na alimentação das populações analisadas.

Phalloceros uai é uma espécie vivípara, condição amplamente reconhecida para a família Poeciliidae. Essa estratégia reprodutiva tem sido associada a maior sucesso de dispersão e um menor risco de extinção dos poecilídeos, uma vez que uma única fêmea grávida tem potencial de se estabelecer e colonizar um novo habitat (THIBAUT & SCHULTZ, 1978). Entretanto, fêmeas grávidas ficam maiores pela

retenção dos embriões na cavidade celomática e conseqüentemente menos hidrodinâmicas, condições que facilitam a sua predação quando comparada com outros peixes não vivíparos (THIBAUT & SCHULTZ, 1978; REZNICK & MILES, 1989; ZÚÑIGA-VEJA *et al.*, 2010).

As análises filogenéticas sugerem que o ancestral comum da família Poeciliidae possuía uma estrutura placentária e que essa característica foi perdida e readquirida múltiplas vezes durante a sua linhagem (POLLUX *et al.*, 2014). No gênero *Phalloceros*, todas as espécies avaliadas até o presente apresentam placentotrofia, também conhecido como viviparidade hemotrófica (POLLUX *et al.*, 2014; PACHECO, 2019). A condição de qual tipo de viviparidade a espécie possui não foi confirmada para as fêmeas de *P. uai*, sendo necessários estudos histológicos para comprovar a presença de uma estrutura placentária ou o uso de índices de matotrofia (REZNICK *et al.*, 2002; POLLUX *et al.*, 2014)

De modo geral, placentotrofia/viviparidade hemotrófica é associada à ausência de coloração brilhante, ao comportamento de corte e a traços marcantes de ornamentação em machos (POLLUX *et al.*, 2014). Essa condição condiz com as características de padrão de coloração e ornamentação de *P. uai*, embora não tenham sido realizadas análises do comportamento de corte com a espécie.

POLLUX *et al* (2014) acreditam que a presença de uma estrutura placentária favoreceria machos de tamanho menor e gonopódios mais longos, o que implica no estilo de acasalamento coercivo e, por fim, evitaria a escolha das fêmeas pelos seus parceiros. Nas análises populacionais (cap. 1) apenas duas populações apresentaram diferenças significativas no comprimento do gonopódio, o que pode sugerir uma diferença no estilo de acasalamento.

A estrutura placentária permite uma mudança no investimento materno de pré para pós fertilização, criando um ambiente para conflitos entre os pais e a prole, propiciando ao embrião a oportunidade de influenciar o investimento materno durante a gravidez (POLLUX *et al.*, 2014). A teoria prevê que o aumento dos conflitos levaria a uma mudança de uma dependência na escolha pré-copulatória de uma fêmea para uma conjunção de poliandria, quando uma fêmea acasala com diversos machos, com mecanismos pós-zigóticos de seleção sexual (POLLUX *et al.*, 2014).

POLLUX *et al.* (2014) encontrou que a estrutura placentária levaria a conflitos sexuais, os quais tenderiam à evolução do dimorfismo sexual, como ocorre em *Poecilia*, e a rápida divergência fenotípica da genitália das espécies. Entretanto, ao contrário do proposto por POLLUX *et al.* (2014), no gênero *Phalloceros* a presença da estrutura placentária não implica em dimorfismo sexual acentuado entre sexos.

A estrutura placentária também é relacionada à superfetação na maioria das espécies de poecilídeos, exceto em algumas como *P. caudimaculatus*, que apresenta matrotrofia/viviparidade sem superfetação (POLLUX *et al.*, 2014). A matrotrofia pode ser calculada a partir do índice de matrotrofia (REZNICK *et al.*, 2002; POLLUX *et al.*, 2014), o qual pode ser influenciado pelo ambiente em espécies de *Phalloceros*. Dessa forma, locais com menor quantidade de recursos, altos índices de predação e/ou correnteza forte condizem com uma reprodução mais custosa, com as fêmeas apresentando intestinos mais curtos e maiores índices de matrotrofia, tornando-as mais hidrodinâmicas (PACHECO, 2019).

Altas taxas de matrotrofia podem estar relacionadas com uma alta produção de prole, reduzindo o espaço físico interno necessário na fêmea e efetivando o tempo de gestação (PACHECO, 2019). Em termos de hipóteses, a matrotrofia/viviparidade pode reduzir o risco de mortalidade das fêmeas, visto o maior hidrodinamismo e diminuição do gasto energético com a reprodução, hipótese essa ainda não testada (PACHECO, 2019). Apesar de não ter sido realizada análise do índice de matrotrofia, essa é uma condição a ser investigada nas diferentes populações de *P. uai*, porque essas ocorrem em ambientes com características diferenciadas e podem ter comportamento reprodutivo dissemelhante.

A superfetação representa outra importante característica da reprodução desses animais. A presença dessa característica confere vantagens e desvantagens evolutivas, como a facilidade da paternidade múltipla, embora a cópula possa levar a lesões físicas, diminuição da oportunidade de alimentos, maior risco de predação e/ou infecções sexualmente transmissíveis em fêmeas (POLLUX *et al.*, 2014).

Excetuando *P. caudimaculatus*, POLLUX *et al.* (2014) indicaram que poecilídeos com machos sem cores chamativas e ornamentação, características sexuais simples e ausência de corte tendem a ter superfetação. Apesar do desconhecimento acerca do comportamento de corte na reprodução de *P. uai*, os

demais atributos foram verificados para a espécie e confirmada a ocorrência de superfetação em todas as populações analisadas.

A presença de superfetação parece ter surgido várias vezes dentro do gênero *Phalloceros*, visto que ocorrem espécies com superfetação como *P. uai*, espécies sem superfetação como *P. caudimaculatus* e *P. anisophallos* e espécies com superfetação em algumas populações e outras não, como em *P. harpagos* (POLLUX *et al.*, 2014; PACHECO, 2019). Entretanto, os resultados disponíveis para *P. harpagos* devem ser interpretados com cautela, devido a possibilidade de ser na realidade um conjunto de espécies crípticas (OLIVEIRA, 2017), o que impossibilitaria saber se essa variação é interpopulacional ou interespecífica.

Os embriões em estágios finais de desenvolvimento apresentaram fenótipos relacionados às manchas laterais iguais àqueles visualizados nos adultos, o que implica em que esses animais já nascem com o número de manchas determinado. Apesar de fêmeas poderem gestar filhotes com quaisquer padrões de manchas, na população do ponto 4 (localidade tipo) foi encontrado apenas animais com o padrão de uma mancha lateral em cada lado, reproduzindo o fenótipo único também registrado para os adultos. Nos embriões da população do ponto 2 não foram verificadas manchas, condição que possivelmente está relacionada aos embriões estarem no início dos estágios finais (40).

Em *guppies*, são conhecidas três populações distintas de melanóforos: os que surgem durante a embriogênese, após o nascimento e no período de amadurecimento sexual (KOTTLER *et al.*, 2013). Em *P. uai*, o surgimento padrão de coloração ocorre durante a embriogênese.

O padrão de cores em poecilídeos varia em função de diversos fatores como hormonais, catecolaminas e hormônios tireoidianos (JÖNCK, 2004; PRAZDNIKOV, 2021), genéticos, como gene Y e seleção sexual (ENDLER 1982; 1984; 1987; HOUDE, 1992). Entretanto, ainda não se sabe quais as funções dos padrões de coloração encontrados em *P. uai*, a causa da presença de diferentes fenótipos nos embriões e como ocorre o surgimento desses padrões no desenvolvimento embrionário. Portanto, são necessários estudos adicionais para determinar como se processa o surgimento do padrão de manchas durante o desenvolvimento embrionário em *P. uai*.

Com base nos dados obtidos, *P. uai* se mostrou carnívora em todas as populações amostradas (bacias do alto rio São Francisco e do alto rio Doce), se alimentando majoritariamente de macroinvertebrados aquáticos. Adicionalmente, a espécie apresenta viviparidade com superfecundação. Por fim, estudos adicionais são necessários para avaliar o índice de matrotrofia da espécie nas diferentes populações e se existe a presença de uma estrutura placentária nas fêmeas.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGASSIZ, L. 1853. Recent researches of Prof. Agassiz [Extract from letter to J. D. Dana dated Cambridge, June 9, 1853]. *American Journal of Science and Arts (Series 2)*, 16(46): 134-136.
- ALVES, C. B. M. & POMPEU P. S. 2010. A fauna de peixes da Bacia do Rio das Velhas no final do século XX. In: ALVES, C. B. M. & POMPEU, P. S. eds. *Peixes do Rio das Velhas: passado e presente*. Belo Horizonte, ARGUMENTVM. p. 167-189.
- ARANHA, J. M. R. & CARAMASCHI E. P. 1999. Estrutura populacional, aspectos da reprodução e alimentação dos Cyprinodontiformes (Osteichthyes) de um riacho do sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16(1): 637-651.
- BARBOSA, J. M.; SOARES, E. C.; CINTRA, I. H. A.; HERMANN, M. & ARAÚJO, A. R. R. 2017. Perfil da ictiofauna da bacia do rio São Francisco. *Acta of Fisheries and Aquatic resources*, 5(1): 70-90.
- BARTHOLOMEW, G. A. 1986. The Role of Natural History in Contemporary Biology. *Bioscience*, 36, 324–329.
- BLOCH, M. E. & SCHNEIDER, J. G. 1801. *Systema Ichthyologiae Iconibus cx Illustratum*. Post obitum auctoris opus inchoatum absolvit, correxit, interpolavit Jo. Gottlob Schneider, Saxo. Berolini. Sumtibus Auctoris Impressum et Bibliopolio Sanderiano Commisum, 1(9): 1-584.
- BRAGA, R. R.; BORNATOWSKI, H. & VITULE, J. R. S. 2012. Feeding ecology of fishes: an overview of worldwide publications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22(4): 915-929.
- CARVALHO, D. R.; FLECKER, A. S.; ALVES, C. B. M.; SPARKS, J. P. & POMPEU, P. S. 2019. Trophic responses to aquatic pollution of native and exotic livebearer fishes. *Science of the Total Environment*, 681: 503-515.
- CASATTI, L. 2002. Alimentação dos peixes em um riacho do Parque Estadual Morro do Diabo, bacia do alto rio Paraná, sudeste do Brasil. *Biota Neotropica*, 2(2): 1-14.
- COSTA, W. J. 1987. Feeding habits of a fish community in a tropical coastal stream. Rio Mato Grosso, Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 22(3): 145-153.
- EIGENMANN, C. H. (1907). The Poeciliid fishes of Rio Grande do Sul and the La Plata Basin. *Proceedings of the United States National Museum*, 32: 425-433.
- ENDLER, J. A. 1982. Convergent and divergent effects of natural selection on color patterns in two fish faunas. *Evolution*, 36(1): 178-188.
- ENDLER, J. A. 1984. Natural and sexual selection on color patterns in poeciliid fishes. In: ZARET, T.M. eds. *Evolutionary ecology of neotropical freshwater fishes*. *Developments in environmental biology of fishes*. Dordrecht, Springer, v.3.
- ENDLER, J. A. 1987. Predation, light intensity and courtship behaviour in *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae). *Animal Behaviour*, 35(5): 1376-1385.
- FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N. & VAN DER LAAN R. eds. 2022. Eschemeyer's catalog of fishes: Genera, species, references. Disponível em: <

<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>>
 . Acesso em: 19.04.2022.

GORINI-PACHECO, B.; ZANDONÀ, E. & MAZZONI, R. 2017. Predation effects on matrotrophy, superfetation and other life history traits in *Phalloceros harpagos*. Ecology of Freshwater Fish, 27(1): 442-452.

GREENE, H. W. 2005. Organisms in nature as a central focus for biology. Trends Ecol. Evol., 20, 23–27.

HAYNES, J. L. 1995. Standardized classification of poeciliid development for life-history studies. Copeia, 147-154.

HENN, A. W. 1916. On various South American poeciliid fishes. Annals of the Carnegie Museum, 10(1-2): 93-142.

HENSEL, R. 1868. Beiträge zur Kenntnis der Wirbelthiere Südbrasilens. Archives für Naturgeschichte, 34, 323-375.

HERMAN, S. G. 2002. Wildlife biology and natural history: Time for a reunion. Journal of Wildlife Management, 66: 933-946.

HOUDE, A. E. 1992. Sex-linked heritability of a sexually selected character in a natural population of *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae)(guppies). Heredity, 69(3): 229-235.

HYSLOP, E. J. 1980. Stomach contents analysis – a review of methods and their application. Journal of Fish Biology, 17: 411-429.

JÖNCK, C. R. 2004. Coloração críptica de *Phalloceros caudimaculatus* (Helsen, 1868) e resposta à alteração do substrato. Ecologia e conservação da floresta Mata Atlântica na reserva natural Salto Morato, 95.

KOTTLER, V. A., FADEEV, A., WEIGEL, D. & DREYER, C. 2013. Pigment pattern formation in the guppy, *Poecilia reticulata*, involves the Kita and Csf1ra receptor tyrosine kinases. Genetics, 194 (3): 631-646.

LODÉ, T. 2012. Oviparity or viviparity? That is the question.... Reproductive biology, 12(3): 259-264.

LUCINDA, P. H. F. 2003. Family Poeciliidae. In R. E. Reis, S. O. Kullander, & C. J. Ferraris Jr. (Eds.), Check list of the freshwater fishes of South and Central America (pp. 555 – 581). Porto Alegre, SC: Edipucrs.

LUCINDA, P. H. F. 2008. Systematics and biogeography of the genus *Phalloceros* Eigenmann, 1907 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae), with the description of twenty-one new species. Neotropical Ichthyology, 6(2): 113-158.

MAZZONI, R.; ARAÚJO, R. R. D. S.; SANTOS, G. C. T. D. & IGLESIAS-RIOS, R. 2010. Feeding ecology of *Phalloceros anisophallos* (Osteichthyes: Cyprinodontiformes) from Andorinha Stream, Ilha Grande, Brazil. Neotropical Ichthyology, 8: 179-182.

NELSON, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. (2016). *Fishes of the World*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.

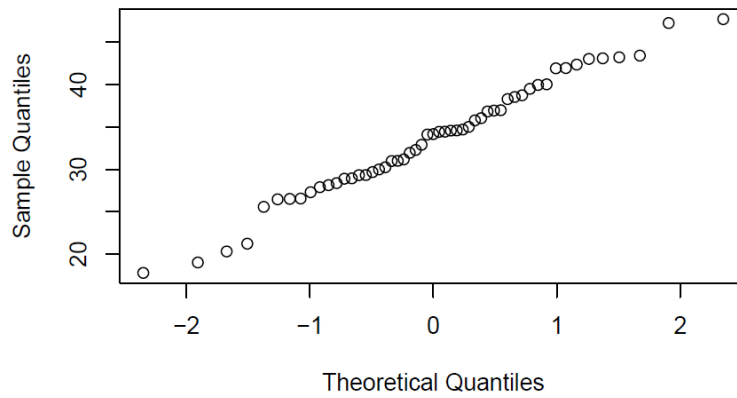
- OLIVEIRA, I. J. 2017. Phylogeographic of a specie complex within *Phalloceros harpagos* Lucinda, 2008 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) (Masters thesis). Available from UEM Library <http://repositorio.uem.br:8080/jspui/handle/1/4858>.
- PACHECO, B. G. A. P. 2019. *Parallel evolution in two Phalloceros species*. (Tese de doutorado, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, BR). Acessado em: <http://www.bdtd.uerj.br/handle/1/4904>.
- PARENTI, L. R. (2005). The phylogeny of atherinomorphs: Evolution of a novel fish reproductive system. In M. C. Uribe, & H. J. Grier (Eds.), *Viviparous Fishes: Proceedings of the I and II International Symposia on Livebearing Fishes* (pp. 13 – 30). Homestead, FL: New Life Publications.
- PIRES, M. N. & REZNICK, D. N. 2018. Life-history evolution in the fish genus *Poecilia* (Poeciliidae: Cyprinodontiformes: subgenus Pamphorichthys): an evolutionary origin of extensive matrotrophy decoupled from superfetation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 125(3): 547-560.
- PIRES, M. N.; ARENDT, J. & REZNICK, D. N. 2010. The evolution of placentas and superfetation in the fish genus *Poecilia* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: subgenera Micropoecilia and Acanthophaelus). *Biological Journal of the Linnean Society*, 99(4): 784-796.
- POLLUX, B. J. A.; PIRES, M. N.; BANET, A. I. & REZNICK, D. N. 2009. Evolution of placentas in the fish family Poeciliidae: an empirical study of macroevolution. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 40: 271-289.
- POLLUX, B. J. A.; MEREDITH, R. W.; SPRINGER, M. S.; GARLAND, T. & REZNICK, D. N. 2014. The evolution of the placenta drives a shift in sexual selection in livebearing fish. *Nature*, 513(7517): 233-236.
- PRAZDNIKOV, D. V. 2021. Role of thyroid hormones in color diversity of male guppies: experimental data on Endler's guppy (*Poecilia wingei*). *Environmental Biology of Fishes*, 104(6): 675-688.
- REGAN, C. T. 1913. A revision of the cyprinodont fishes of the subfamily Poeciliinae. *Proceedings of the Zoological Society of London* (pt 4), 58: 977-1018.
- REZNICK, D. N & MILES, D. B. 1989. A review of life history patterns in poeciliid fishes. *In: Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae)*. Eds. MEFFE G. K. & SNELSON F. F. J. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. Pp. 125-148.
- REZNICK, D.; BRYANT, M. J.; BASHEY, F. 2002. r-and K-selection revisited: the role of population regulation in life-history evolution. *Ecology*, 83(6): 1509-1520.
- ROCHA, F. C.; CASATTI, L. & PEREIRA, D. C. 2009. Structure and feeding of a stream fish assemblage in Southeastern Brazil: evidence of low seasonal influences. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 123-134.
- ROSEN, D. E. & BAILEY, R. M. 1963. The poeciliid fishes (Cyprinodontiformes), their structure, zoogeography and systematics. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 126: 1-176.
- SCHMIDLY D. J. 2005. What it means to be a naturalist and the future of natural history at American universities. *Journal of Mammalogy*, 86: 449-456.

- SILVEIRA, E. L.; SEMMAR, N.; CARTES, J. E.; TUSET, V. M.; LOMBARTE, A.; BALLESTER, E. L. C. & VAZ-DOS-SANTOS, A. M. 2020. Methods for trophic ecology assessment in fishes: a critical review of stomach analyses. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 28(1): 71-106.
- TEIXEIRA, R. L. 1989. Aspectos da ecologia de alguns peixes do arroio Bom Jardim, Triunfo-RS. *Revista Brasileira de Biologia*. 49(1): 183-192.
- TEWKSURY, J. J.; ANDERSON, J. G. T.; BAKKER, J. D.; BILLO, T. J.; DUNWIDDIE, P. W.; GROOM, M. J., *et al.* 2014. Natural history's place in science and society. *Bioscience*, 64, 300–310.
- THIBAUT, R. E. & SCHULTZ, R. J. 1978. Reproductive adaptations among viviparous fishes (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Evolution*, 320-333.
- THOMAZ, A. T.; CARVALHO, T. P.; MALABARBA, L. R. & KNOWLES, L. L. 2019. Geographic distributions, phenotypes, and phylogenetic relationships of *Phalloceros* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae): Insights about diversification among sympatric species pools. *Molecular phylogenetics and Evolution*, 132: 265-274.
- TIBÚRCIO, C. C. C. 2018. Vídeo remoto subaquático com isca (BRUV) como ferramenta para avaliação da estrutura da comunidade de peixes de riacho: efeito de diferentes tipos de isca sobre a amostragem. (Dissertação de mestrado, Universidade Federal de João del-Rei, BR). Acessado em: <https://www.ufsj.edu.br/portal2-repositorio/File/pge/Carolina%20Capistranos.pdf>.
- TURNER, C. L. 1937. Reproductive cycles and superfetation in poeciliid fishes. *The Biological Bulletin*, 72(2): 145-164.
- WOLFF, L. L., DE OLIVEIRA, E. F., LOBÓN-CERVIÁ, J. 2022. Linking fish ecomorphotypes to food categories and local-scale habitat uses along a Brazilian coastal stream. *Ecology of Freshwater Fish*.
- ZANDONÀ, E.; AUER, S. K.; KILHAM, S. S.; HOWARD, J. L.; LÓPEZ-SEPULCRE, A.; O'CONNOR, M. P.; BASSAR, R. D.; OSORIO, A.; PRINGLE, C. M. & REZNICK D. N. 2011. Diet quality and prey selectivity correlate with life histories and predation regime in Trinidadian guppies. *Functional Ecology*, 25(5): 964-973.
- ZÚÑIGA-VEGA, J. J., SUÁREZ-RODRÍGUEZ, M., ESPINOSA-PÉREZ, H. & JOHNSON, J. B. 2011. Morphological and reproductive variation among populations of the Pacific molly *Poecilia butleri*. *Journal of fish biology*, 79: 1029-1046.

6 - ANEXOS

6.1 - ANEXO 1 - Representação gráfica do teste de normalidade do número de embriões das fêmeas e comprimento total das mesmas.

Normal Q-Q Plot



Normal Q-Q Plot

