

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Zoologia

Igor Henrique Rodrigues Oliveira

**ENIGMA DOS RIACHOS MINEIROS: *Psolidodon rivularis*
(ACESTRORHAMPHIDAE: ACESTRORHAMPHINAE), UM MODELO NO
ESTUDO DE ESPÉCIES CRÍPTICAS**

Belo Horizonte

2025

Igor Henrique Rodrigues Oliveira

**ENIGMA DOS RIACHOS MINEIROS: *Psolidodon rivularis*
(ACESTRORHAMPHIDAE: ACESTRORHAMPHINAE), UM MODELO NO
ESTUDO DE ESPÉCIES CRÍPTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Zoologia.

Orientadora: Profa. Karine Frehner Kavalco

Belo Horizonte

2025

043

Oliveira, Igor Henrique Rodrigues.

Enigma dos riachos mineiros: *Psalidodon rivularis* (Acestrorhamphidae: Acestrorhamphinae), um modelo no estudo de espécies crípticas [manuscrito] / Igor Henrique Rodrigues Oliveira. – 2025.
148 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Karine Frehner Kavalco.

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

1. Zoologia. 2. Taxonomia. 3. Characidae. 4. DNA Satélite. I. Kavalco, Karine Frehner. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 591



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Enigma dos riachos mineiros: *Psalidodon rivularis* (Acestrorhamphidae: Acestrorhamphinae), um modelo no estudo de espécies críptica

IGOR HENRIQUE RODRIGUES OLIVEIRA

Esta tese foi apresentada em sessão pública e submetida a avaliação em 29 de abril de 2025, sendo aprovada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Caroline Garcia (Membro / UESB)

Prof. Dr. Gustavo Campos e Silva Kuhn (Membro / UFMG)

Prof. Dr. Jorge Abdala Dergam dos Santos (Membro / UFV)

Prof. Dr. Juan Marcos Mirande (Membro / Fundación Miguel Lillo)

Profa. Dra. Karine Frehner Kavalco (Orientadora / UFV)



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Campos e Silva Kuhn, Professor(a)**, em 06/05/2025, às 09:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karine Frehner Kavalco, Usuário Externo**, em 06/05/2025, às 16:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **caroline garcia, Usuária Externa**, em 07/05/2025, às 07:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juan Marcos Mirande, Usuário Externo**, em 18/06/2025, às 09:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jorge Abdala Dergam dos Santos, Usuário Externo**, em 18/06/2025, às 12:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4180272** e o código CRC **8AB29436**.

*A minha avó e madrinha Therezinha Aparecida
Rodrigues, com carinho e saudades.*

AGRADECIMENTOS

Sem dúvidas, uma das principais e primeiras lições que qualquer pessoa deve aprender é que as maiores conquistas que podemos obter são frutos não só do nosso esforço e talento, mas de todas as colaborações, amizades e parcerias que fizemos pelo caminho. E isso não foi diferente neste trabalho, que sem dúvidas é um marco muito importante na minha vida, e que jamais teria sido o mesmo sem a ajuda, contribuição e apoio de diversas pessoas.

Em primeiro lugar, agradeço a minha família, em especial minha mãe e pai, Patrícia Maria Rodrigues Mathilde Oliveira e Mauro dos Santos Oliveira, meus irmãos, Ian Henrique Rodrigues Oliveira e Iuri Henrique Rodrigues Oliveira, e minha falecida avó Terezinha Aparecida Rodrigues. Todo apoio, carinho e amor de vocês fez de mim o homem que sou hoje, e jamais terei palavras para agradecer tudo que fizeram por mim. Estendo esses agradecimentos com muito carinho a vários outros membros de minha família, como minha avó Nairda dos Santos, meus tios, tias, primos, primas e amigos em Embu-Guaçu e em Sorocaba, além de minha namorada Priscila Martins de Assis, e toda sua família em São Gotardo e Rio Paranaíba. Todos vocês fazem com que essas cidades sejam um lar acolhedor e querido por mim, por isso sou imensamente grato.

Gostaria também de fazer um agradecimento especial aos meus orientadores, professores e amigos, Karine Frehner Kavalco e Rubens Pasa. Agradeço a vocês por todo apoio, suporte e ensinamentos, por terem feito eu me apaixonar ainda mais pela ciência e pela pesquisa, e principalmente, por toda confiança que depositaram em mim ao longo desses anos, acreditando nas minhas ideias e investindo no meu trabalho. Espero poder retribuir de alguma forma toda essa confiança e carinho.

Agradeço a todos os meus colegas e amigos do Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva, tanto os que ainda estão quanto os que já saíram, por todos os ensinamentos, parceria e risadas que compartilhamos. Um agradecimento especial se faz necessário ao Iuri e ao Renan, dois amigos no laboratório que estão no doutorado a aproximadamente o mesmo tempo que eu. Nesses últimos anos foram incontáveis os momentos em que nos ajudamos, nos escutamos em momentos difíceis e nos divertimos juntos. Outro agradecimento especial aos companheiros do que eu chamo de “time satelitoma”, que são os ex-ICs, e agora com muito orgulho de minha parte, mestrandos e biólogos, Priscila, Rafael e Luiz, que além de grandes amigos me ajudaram muito nas coletas, preparações e análises, especialmente no capítulo 2 deste trabalho.

Agradeço também aos diversos outros amigos que possuo, que além de todo companheirismo me ajudaram de diversas formas nesses últimos anos, além de, claro, terem me proporcionado diversas memórias felizes que sempre guardo com muito carinho. Joyce, Giovanna, Jefferson, Winston, Lewi, Thamara, Natália, Erica, Snaydia, Dinaiza, Paulo, e vários outros, eu sou muito grato a todos vocês.

Diversos agradecimentos se fazem necessários a pessoas que contribuíram diretamente com minha pesquisa ou trabalhos acadêmicos. Agradeço primeiramente aos professores Fabiano Bezerra Menegidio e Caroline Garcia, pela parceria que nos rendeu diversos trabalhos e artigos ao longo desses anos. Aos professores Fabiano Menegidio e Marta Svartman, por todas as correções e considerações durante minha qualificação, e que contribuíram muito para o desenvolvimento da minha pesquisa. E claro, um agradecimento aos professores que aceitaram serem membros de minha banca, professores Gustavo Kuhn, Caroline Garcia, Juan Marcos Mirande e Jorge Dergam, estou certo de que serão imensas as contribuições de vocês a minha pesquisa.

Além disso, preciso agradecer os professores Carlos Oliveira e Carla Pavanelli, pelo envio das fotografias e anotações de *Psalidodon rivularis* e *Hyphessobrycon santae* que o professor Carlos utilizou em sua tese de doutorado, a qual constitui importante referência para meu trabalho, contribuindo diretamente com minha pesquisa. Ao professor Mauro Triques agradeço a oportunidade de ter analisado, em seu laboratório, os exemplares da série tipo de *Astyanax turmalinensis*. Ao professor Roberto Esser dos Reis, por ter sido solícito e ter me enviado algumas fotografias de exemplares de *Hyphessobrycon* que estão no museu da PUCRS.

Por fim, agradeço a todo corpo docente com quem tive contato, na UFV e na UFMG, por todos os ensinamentos, e aos técnicos, servidores e terceirizados dessas universidades por toda sua ajuda em diversas questões, como a servidora Dara da UFV, o secretário Eduardo da UFMG, e claro, o motorista Célio da UFV, que nos acompanhou nas mais diversas expedições que fizemos de leste a oeste do Alto rio São Francisco.

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

A todos vocês, muito obrigado!

"Se há uma coisa que a história da evolução nos ensinou, é que a vida não pode ser contida. A vida se liberta, expande-se para novos territórios e atravessa barreiras, de forma dolorosa, talvez até perigosa... mas, bem... aí está... a vida encontra um meio."

(Dr. Ian Malcolm - Jeff Goldblum, *Jurassic Park*, 1993)

RESUMO

Quando comparada a outras bacias hidrográficas, o número de espécies do gênero *Psalidodon* na bacia do Alto rio São Francisco é consideravelmente baixo, com apenas três espécies formalmente descritas: *Psalidodon fasciatus*, *Psalidodon rivularis* e *Psalidodon pessalii*. Duas problemáticas justificam esse baixo número, a primeira se deve ao gênero *Psalidodon* ser ter sido reconsiderado válido apenas em 2020 após anos em desuso, com várias espécies, principalmente dos gêneros *Astyanax* e *Hyphessobrycon*, sendo transferidas a *Psalidodon*. A segunda se deve ao fato de que tanto *P. fasciatus* quanto *P. rivularis* correspondem a complexos de espécies. No caso de *P. rivularis*, sua formalização como complexo de espécies é recente, e é amparada por dados citogenéticos, moleculares e morfológicos. Neste trabalho, apresentamos dois capítulos, o primeiro deles usando uma abordagem integrada de dados morfológicos, citogenéticos e genômicos para esclarecer quantas espécies existem no complexo *P. rivularis* no Alto rio São Francisco. No segundo, apresentamos um novo protocolo para montagem e comparação *in silico* e *in vitro* de satelitomas, denominado “*SatFisher protocol*”, e empregamos esse protocolo na quantificação de diferentes satDNAs, demonstrando sua aplicação como marcadores moleculares em espécies crípticas de *Astyanax* e *Psalidodon*, e em especial, *P. rivularis*. Nossos resultados indicam que *P. rivularis* representa um complexo de espécies com pelo menos cinco espécies distintas distribuídas ao longo do Alto rio São Francisco, com vários casos de simpatria, e que uma dessas espécies corresponderia a “*Hyphessobrycon*” *santae*, para a qual propomos a realocação para o gênero *Psalidodon* como *Psalidodon santae* comb. nov. Além disso, nosso protocolo de montagem e validação de satelitomas conseguiu, com sucesso, obter marcadores quantitativos para diferenciar espécies dos complexos *P. rivularis* e *P. fasciatus* das bacias do São Francisco e Paranaíba, e entre os gêneros *Astyanax* e *Psalidodon*. Nossos resultados indicam que a evolução e especiação do complexo *P. rivularis* é fruto de vários processos evolutivos em conjunto, como evolução cromossômica, adaptação morfológica, processos biogeográficos complexos envolvendo vicariância, dispersão e captura de cabeceiras, hibridismo com outras espécies e, possivelmente, processos genômicos ainda não compreendidos totalmente. Finalizamos evidenciando a necessidade de conservação dos pequenos afluentes do Alto São Francisco, uma vez que estes representam ambientes complexos com uma rica biodiversidade taxonômica e genômica, e correspondem aos habitats preferenciais do grupo *P. rivularis*.

Palavras-chave: alto rio São Francisco; complexo de espécies; *Hyphessobrycon santae*; satDNAs; taxonomia integrativa.

ABSTRACT

When compared to other river basins, the number of species of the genus *Psalidodon* in the Upper São Francisco River basin is considerably low, with only three species formally described: *Psalidodon fasciatus*, *Psalidodon rivularis*, and *Psalidodon pessalii*. Two problems justify this low number. The first is due to the genus *Psalidodon* being reconsidered valid only in 2020 after years of disuse, with several species, mainly from *Astyanax* and *Hyphessobrycon*, being transferred to *Psalidodon*. The second is because *P. fasciatus* and *P. rivularis* correspond to species complexes. In the case of *P. rivularis*, its formalization as a species complex is recent and is supported by cytogenetic, molecular, and morphological data. In this work, we present two chapters. The first uses an integrated approach of morphological, cytogenetic, and genomic data to clarify how many species exist in the *P. rivularis* complex in the Upper São Francisco River. In the second, we present a new protocol for assembly and comparison in silico and in vitro of satellitomes, called “SatFisher protocol”, and we use this protocol in the quantification of different satDNAs, demonstrating their application as molecular markers in cryptic species of *Astyanax* and *Psalidodon*, and in particular, *P. rivularis*. Our results indicate that *P. rivularis* represents a species complex with at least five distinct species distributed along the Upper São Francisco River, with several cases of sympatry, and that one of these species corresponds to “*Hyphessobrycon*” *santae*, which we propose to relocate to the genus *Psalidodon* as *Psalidodon santae* comb. nov. Furthermore, our satellitome assembly and validation protocol successfully obtained quantitative markers to differentiate *P. rivularis* and *P. fasciatus* complexes species from the São Francisco and Paranaíba basins and between the genera *Astyanax* and *Psalidodon*. Our results indicate that the evolution and speciation of the *P. rivularis* complex are the result of several evolutionary processes together, such as chromosomal evolution, morphological adaptation, complex biogeographic processes such as vicariance, dispersion and headwaters captures, hybridism with other species, and, possibly, genomic processes not yet fully understood. We conclude by highlighting the need to conserve the small tributaries of the Upper São Francisco since they represent complex environments with rich taxonomic and genomic biodiversity and correspond to the preferred habitats of the *P. rivularis* group.

Keywords: upper São Francisco river; species complex; *Hyphessobrycon santae*; satDNAs; integrative taxonomy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1.1 Grupo de estudo.....	13
1.2 Ecologia e distribuição geográfica de <i>P. rivularis</i>	18
1.3 Ferramentas para o estudo do Complexos de espécies <i>P. rivularis</i>	19
1.4 DNAs satélites como marcadores moleculares.....	21
1.5 Objetivos.....	22
2. CAPÍTULO 1.....	23
3. CAPÍTULO 2.....	78
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	103
REFERÊNCIAS.....	105
MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 1.....	127
MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 2.....	148

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Grupo de estudo

Dentre os mais diversos grupos de animais, o termo “Pisces” foi designado para abranger os organismos que conhecemos na nomenclatura vernacular como peixes, que são vertebrados aquáticos, de água doce ou salgada, que retém brânquias e nadadeiras em sua fase adulta, e abrangem mais de 37 mil espécies válidas, o que corresponde a mais da metade das espécies conhecidas de vertebrados (Nelson et al., 2016; Fricke et al., 2025a). Hoje, esse nome não é mais válido na sistemática moderna, pois devido a não inclusão dos Tetrapoda, o termo acaba se referindo a um agrupamento parafilético, isto é, que inclui um ancestral comum, mas nem todos os seus descendentes. Entretanto, a esmagadora maioria das espécies vivas de peixes (cerca de 96%) pertencem ao grupo Teleostei, que, no início do Paleogeno, apresentou uma rápida e intensa diversificação (Benton et al., 1998; Nelson et al., 2016).

Considerando o número de espécies, a família Characidae, que engloba peixes conhecidos como tetras, lambaris e piabas, estava entre as nove maiores famílias de Teleostei (Nelson et al., 2016). Entretanto, a taxonomia e sistemática da família foi profundamente impactada por estudos recentes. A primeira revisão, conduzida por Terán et al. (2020), foi focada no gênero não monofilético *Astyanax*, um dos mais diversos e problemáticos até então em Characidae (Mirande, 2019). Neste trabalho, utilizando dados moleculares e morfológicos, os autores retiraram várias espécies de *Astyanax*, as movendo para outros sete gêneros (*Andromakhe*, *Deuterodon*, *Eretmobrycon*, *Jupiaba*, *Makunaima*, *Psalidodon* e *Tetragonopterus*). Dentre as espécies retiradas de *Astyanax*, destaco aqui aquelas que estavam relacionadas aos dois complexos de espécies mais conhecidos do gênero: *Astyanax fasciatus* (Justi, 1993) e *Astyanax scabripinnis* (Moreira-Filho & Bertollo, 1991), ambas movidas para o gênero “ressuscitado” *Psalidodon*.

A segunda destas revisões foi conduzida por Melo et al. (2024) e focou na família Characidae como um todo, sendo baseada inteiramente em dados genômicos de Elementos Ultraconservados (UCEs). Este trabalho impactou profundamente a taxonomia da família, uma vez que os autores propuseram a separação de Characidae em quatro famílias: Spintherobolidae, Stevardiidae, Characidae e Acestrorhamphidae. Para o gênero *Psalidodon*, este trabalho significou a inclusão de novas espécies e sua realocação para a família Acestrorhamphidae, subfamília Acestrorhamphinae (Melo et al., 2024). Hoje, *Psalidodon* conta com 56 espécies

válidas, sendo que destas, 46 vieram do gênero *Astyanax*, cinco do gênero *Hyphessobrycon*, três do gênero *Hasemanina* e duas que já foram descritas como *Psalidodon* (Fricke et al., 2025b).

O complexo de espécies “*Astyanax*” *scabripinnis* (nome válido: *Psalidodon scabripinnis*) foi formalizado por Moreira-Filho & Bertollo (1991) com base em caracteres morfológicos e citogenéticos em sete populações amostradas, de três bacias hidrográficas (Tietê, Paranapanema e São Francisco). Além de diferenças morfométricas interpopulacionais, os autores identificaram três números diploides diferentes para estas populações: $2n=46$, $2n=48$ e $2n=50$. Mais de uma década mais tarde, Bertaco & Lucena (2006) realizaram um compilado das espécies que compunham o complexo “*Astyanax*” *scabripinnis* e definiram as características morfológicas típicas do complexo:

“body deepest and heaviest in area proximal to middle of pectoral fins, head heavy, snout short and abrupt by tapering, body depth smaller than 41% of SL (mean 30-33% of SL), reduced number of branched anal-fin rays (13-21, usually 17-18, rarely 22 or 23), presence of one or two humeral spots, and a dark, midlateral, body stripe extending to the tip of the middle caudal-fin rays.”

(Bertaco & Lucena, 2006)

Além de formalizar as características diagnósticas, os autores também identificaram 15 espécies como pertencentes ao complexo “*Astyanax*” *scabripinnis* (Bertaco & Lucena, 2006). Anos mais tarde, esse número chegou a 30 espécies (Ingenito & Duboc, 2014). Destas, 12 foram transferidas para *Psalidodon*, enquanto *Astyanax burgerai* e *Astyanax intermedius* foram transferidas para o gênero *Deuterodon*; *Astyanax paris* foi transferida para *Andromakhe* e *Astyanax pirapuan* aparece no clado sem nome “*Astyanax*” *lineatus*. Portanto, estas espécies não pertencem ao complexo *P. scabripinnis* em um senso filogenético (Terán et al., 2020; Melo et al., 2024; Silva et al., 2025). *Astyanax courensis*, *Astyanax epiagos*, *Astyanax guaricana*, *Astyanax jenynsii*, *Astyanax jordanensis*, *Astyanax microschemos*, *Astyanax obscurus*, *Astyanax pirabitira*, *Astyanax totae* e *Astyanax turmalinensis* não foram incluídas nas revisões citadas, logo seu status como *Astyanax* é incerto e muitas destas espécies podem ser remanejadas ao gênero *Psalidodon* no futuro.

Dentre as primeiras espécies incluídas no complexo *P. scabripinnis*, a espécie *Psalidodon rivularis* (Lütken, 1875), conhecida como “piaba-do-córrego”, foi descrita por Christian Frederik Lütken em sua monografia Velhas-Flodens Fiske (1875), como

Tetragonopterus rivularis (Figura 1), a partir de um extenso material ictiológico coletado por Johannes Theodor Reinhardt no rio das Velhas (bacia hidrográfica do rio São Francisco) entre os anos de 1847 e 1854. Anos mais tarde, a espécie foi transferida para o gênero *Astyanax* como uma subespécie de *Astyanax scabripinnis* (Eigenmann, 1910). Décadas mais tarde, o nome *Astyanax rivularis* foi usado como espécie válida em pelo menos dois trabalhos (Casatti & Castro, 1998; Lima et al., 2003), mas uma diagnose precisa em relação às demais espécies do complexo *Astyanax scabripinnis* só foi fornecida por Bertaco & Lucena (2006). A transferência para o gênero *Psalidodon* se deu após a supracitada revisão de Terán et al. (2020).

Figura 1: Lectótipo de *Tetragonopterus rivularis* (Nome válido: *Psalidodon rivularis*) coletado por Johannes T. Reinhardt, depositado no Museu de História Natural da Dinamarca, Universidade de Copenhagen.

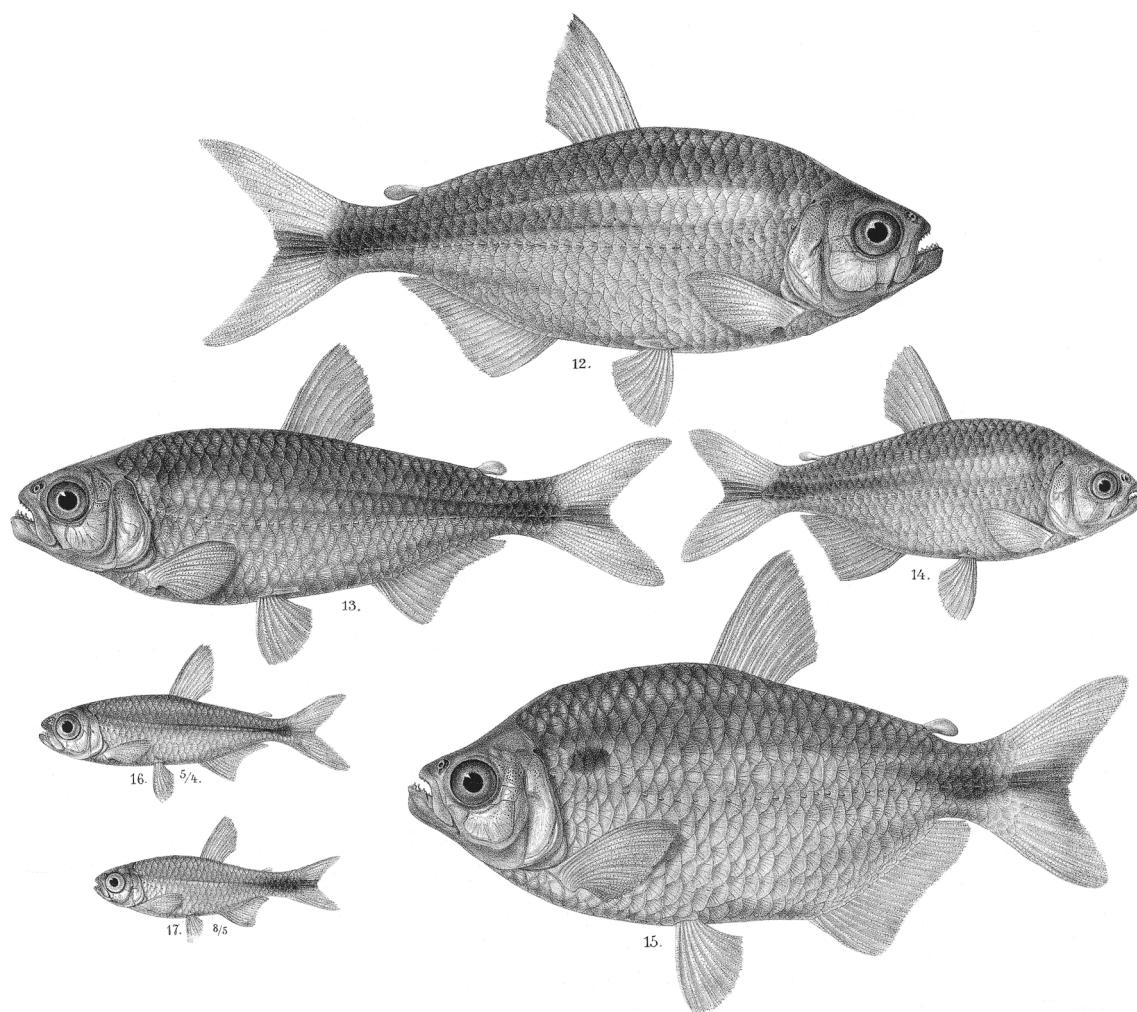


Fonte: Museu de História Natural da Dinamarca (<https://collections.snm.ku.dk/en/object/NHMD1634879>). Sob licença: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

É importante destacar três pontos na obra de Lütken (1875) que evidenciam uma notável variação morfológica nesta espécie: 1º- Lütken menciona que dentre os espécimes analisados, alguns exemplares apresentavam linha lateral incompleta ou interrompida, mas muitas vezes não havia concordância dessa característica nos dois lados do mesmo peixe, de maneira que esta característica não servia para diagnose de variantes ao nível de espécie ou subespécie; 2º- Lütken menciona também uma informação fornecida a ele por Reinhardt, de que frequentemente os cardumes possuíam características locais para cada riacho onde eram coletados, geralmente relacionados à coloração ou à forma do corpo; 3º- Lütken forneceu em sua obra uma prancha contendo ilustrações de todas as 5 espécies, até então do gênero *Tetragonopterus*, que identificou nas amostras de Reinhardt, com o detalhe de que enquanto

todas as demais espécies receberam apenas uma ilustração, “*Tetragonopterus*” *rivularis* recebeu duas ilustrações para, nas palavras do autor, ilustrar a variação na forma do corpo dentro da espécie (Figura 2).

Figura 2: Prancha V da obra Velhas-Flodens Fiske (1875), Figuras 13 e 14 ilustram diferentes morfotipos de “*Tetragonopterus*” *rivularis*. Figura 12: *Tetragonopterus cuvieri* (nome válido: *Psalidodon fasciatus*), Figura 15: *Tetragonopterus lacustris* (nome válido: *Astyanax lacustris*), Figura 16: *Tetragonopterus gracilis* (nome válido: *Hemigrammus gracilis*) e Figura 17: *Tetragonopterus nanus* (nome válido: *Hasenamia nana*).



Fonte: Lütken (1875) em Alves, C. B. M. & Pompeu, P. S. (Eds.), Peixes do rio das Velhas: Passado e presente.

Passados quase 150 anos da obra de Lütken (1875), a variação intraespecífica em *P. rivularis* foi extrapolada a diversos campos de estudo, e dúvidas se as variedades morfológicas, ecológicas e genéticas correspondem à mesma espécie começaram a surgir. O primeiro destes trabalhos foi conduzido por Eigenmann (1907), onde, com base em dois indivíduos de um lote contendo quatro síntipos de “*Tetragonopterus*” *rivularis* (USNM 44960), o autor descreveu a espécie *Hemigrammus santae*, depois transferida pelo mesmo autor para o gênero *Hyphessobrycon* (Eigenmann, 1910). A principal razão pela qual parece que o autor chegou a

esta conclusão é que estes dois espécimes apresentavam linha lateral incompleta, característica típica dos gêneros *Hemigrammus* e *Hyphessobrycon*, enquanto os dois espécimes restantes do lote USNM 44960, que possuem linha lateral completa, foram mantidos como “*T.*” *rivularis*. Esse argumento, no entanto, não leva em consideração o alerta de Lütken (1875) de que a completude da linha lateral não seria uma característica confiável na diagnose de variedades taxonômicas nessa espécie. Eigenmann (1907) também mencionou, sem especificar, diferenças na coloração e proporções corporais entre a nova espécie e seus pares.

A similaridade de *H. santae* com vários tipos de *P. rivularis*, aliada à falta de uma diagnose precisa entre estas espécies, motivou Oliveira (2017) a propor em sua tese de doutorado que tanto *H. santae* quanto *A. turmalinensis* deveriam ser considerados sinônimos juniores de *P. rivularis*. *A. turmalinensis*, cuja sinonímia também foi proposta, pertence ao complexo “*Astyanax*” *scabripinnis* (Ingenito & Duboc, 2014), tendo sido descrita no rio Jequitinhonha, e é simpátrica a *P. rivularis* no Parque Nacional Serra do Cipó (Triques et al., 2003; Triques & Queiroz, 2010). Vale destacar que ambas as espécies não foram utilizadas nas revisões recentes que transferiram várias espécies de *Astyanax* e *Hyphessobrycon* para *Psalidodon*, e que a análise dos tipos de ambas mostra que são muito semelhantes a figura 14 de “*T.*” *rivularis* de Lütken (1875).

A variabilidade morfológica de *P. rivularis* também foi avaliada em trabalhos utilizando atributos ecomorfológicos (Souza et al., 2014), desenvolvimento reprodutivo (Quirino et al., 2021), morfometria tradicional (Pasa et al., 2019) e morfometria geométrica (Rodrigues-Oliveira et al., 2023), e em todos estes trabalhos diferenças populacionais foram observadas, sendo relacionadas a possíveis novas espécies ou a adaptações locais a pressões ambientais, como velocidade da água, tipo de substrato e tipo de vegetação ripária.

Além da variabilidade morfológica, diferentes trabalhos também têm apontado variabilidade genética ao nível cromossômico e genômico em *P. rivularis*. Embora tenham sido referenciadas como “*Astyanax*” *scabripinnis*, as populações amostradas no rio São Francisco no trabalho de Moreira-Filho & Bertollo (1991) provavelmente correspondem a *P. rivularis*, e enquanto duas delas apresentaram $2n=50$ cromossomos uma terceira apresentou $2n=46$ cromossomos. Essas populações variam não apenas no número cromossômico, mas também nos padrões de diversos marcadores citogenéticos, tanto clássicos quanto moleculares, como sítios de heterocromatina constitutiva, rDNAs e DNAs satélites (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Mantovani et al., 2005; Abel et al., 2006; Peres et al., 2008).

Populações já identificadas como *P. rivularis* contendo estes dois números cromossômicos também foram mencionadas em trabalhos posteriores (Oliveira, 2021; Pasa et al., 2021), com o acréscimo de variações na fórmula cariotípica entre populações com o mesmo número cromossômico, presença de cromossomos Bs em certas populações e distâncias genéticas elevadas entre duas amostras de $2n=46$ e $2n=50$ de diferentes trechos do mesmo rio, sendo comparáveis a distância genética de espécies-irmãs próximas encontradas em diferentes bacias hidrográficas. Esse conjunto de informações levou Oliveira (2021) a propor que *P. rivularis*, por si só, corresponde a um complexo de espécies.

1.2 Ecologia e distribuição geográfica de *P. rivularis*

O nome popular “piaba-do-córrego” faz jus diretamente ao habitat no qual podemos encontrar a espécie, sendo um organismo típico de pequenos corpos d’água, em especial pequenos riachos que podem estar associados tanto a lagoas como a rios, como é o caso da Lagoa Santa e o rio das Velhas na localidade tipo (Lütken, 1875). A espécie possui hábitos nectônicos e diurnos, com alimentação onívora, se alimentando principalmente de itens carregados pela coluna d’água, como insetos aquáticos, larvas de insetos terrestres, algas e plantas (Casatti & Castro, 1998; Vieira et al., 2015).

Hoje assume-se como distribuição geográfica válida para *P. rivularis* a bacia do rio São Francisco (Vieira et al., 2015; Pasa et al., 2019). A bacia hidrográfica do rio São Francisco é dividida em quatro mesorregiões hidrográficas (Figura 3), e a maior parte dos registros de *P. rivularis* ocorrem principalmente no Alto rio São Francisco, com alguns poucos registros no Médio rio São Francisco (Rodrigues-Oliveira et al., 2023; Pavanelli et al., 2024). Alguns registros em outras bacias limítrofes podem ser visualizados no GBIF (GBIF Secretariat, 2023), embora estes possam ser confusões com espécies próximas. A exemplo, na bacia do rio Paranaíba, a oeste da bacia do Alto rio São Francisco, temos *Psolidodon paranae* e *Psolidodon rioparanaibanus* (de Mesquita Alves et al., 2020), e nas bacias costeiras a leste do Alto rio São Francisco temos *Psolidodon scabripinnis* e *Astyanax turmalinensis* (Oliveira, 2017).

Apesar da espécie estar na categoria de risco de extinção menos preocupante (LC) na plataforma Salve do ICMBio (Pavanelli et al., 2024), o Alto rio São Francisco, onde a maior parte de seus registros se encontram, é uma região severamente impactada por atividades antrópicas. Uma das principais ameaças à ictiofauna é a construção de barragens, que são responsáveis por diminuir a incidência natural de enchentes naturais na região, importantes no

carreamento de nutrientes, sedimentos, matéria orgânica, fauna e flora (Junk et al., 1989; de Andrade e Santos et al., 2012). Dentre as piores consequências da construção de barragens na região, podemos citar o rompimento de uma barragem de rejeitos da mineradora VALE S.A. em Brumadinho (MG), responsável pela contaminação do rio Paraopeba (Pereira et al., 2019). Além dos impactos gerados pela construção de barragens, podemos citar também os impactos gerados pelo descarte de resíduos de origem doméstica, industrial, minerários e agrícolas nos corpos d'água na região (Godinho, 2003).

Figura 3: Mapa com as mesorregiões hidrográficas brasileiras destacando as mesorregiões que compõem a bacia hidrográfica do rio São Francisco.



Fonte: Shapefiles disponíveis em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/informacoes-ambientais/estudos-ambientais/31653-bacias-e-divisoes-hidrograficas-do-brasil.html?=&t=acesso-ao-produto>.

1.3 Ferramentas para o estudo do Complexos de Espécies *P. rivularis*

No primeiro capítulo desta Tese, buscaremos entender até que ponto um complexo de espécies como *P. rivularis* representa uma espécie polimórfica (do ponto de vista morfológico, ecológico e/ou citogenético) ou diferentes espécies crípticas e/ou semi-crípticas. A importância, e a dificuldade, em trabalhar com essa problemática ocorre porque complexos de espécies podem ser constituídos de várias espécies geneticamente isoladas, mas monomórficas em vários

caracteres fenotípicos, e ainda mais difícil quando ocorre simpatria destas espécies com potencial de intercruzamento (Grube & Kroken, 2001; Bickford et al., 2007), sendo este o caso do complexo *P. rivularis*.

Neste aspecto, o uso de técnicas de sequenciamento de DNA tem sido de grande contribuição na delimitação de espécies crípticas (Bickford et al., 2007). Entretanto, embora dados utilizando apenas um locus, como genes mitocondriais ou rDNAs, tenham sido muito usados para este propósito, eles podem falhar em diferenciar espécies recentemente divergentes devido a diferenças no tempo de coalescência do gene e da especiação. Nesse sentido, a delimitação em espécies dentro de complexos de espécies deve, sempre que possível, utilizar dados multilocus e buscar congruência com dados fenotípicos e biogeográficos (Grube & Kroken, 2001).

Aplicar esses pressupostos à problemática do complexo *P. rivularis* demanda não apenas reconstruir hipóteses filogenéticas robustas e baseadas em vários loci, mas também buscar a correspondência entre os agrupamentos filogenéticos e os diferentes morfotipos (ex: os morfotipos desenhados por Lütken) e citótipos ($2n=46$ e $2n=50$) existentes no grupo (Oliveira, 2021). Com o advento do Sequenciamento de Nova Geração (NGS) a obtenção de dados multilocus para inferência filogenética pode ser feita de maneira mais eficiente em termos de tempo e custo (McCormack et al., 2013). O sequenciamento NGS fornece dados o suficiente para realização de filogenias utilizando tanto o genoma mitocondrial quanto sequências ortólogas do genoma nuclear, permitindo a reconstrução filogenética destas diferentes fontes e, através de sua comparação, rastreamento de eventos biológicos complexos, como hibridismo e introgressão (De Ré et al., 2017; Zadra et al., 2021).

Para traçar limites fenotípicos entre espécies crípticas de *P. rivularis* devemos levar em consideração características que se demonstram úteis na diagnose de espécies de *Psalidodon*, e principalmente, do complexo *P. scabripinnis*. Dentre essas características, podemos citar: número de escamas perfuradas ao longo da linha lateral, número de estrias sulcadas nas escamas, forma e evidência da faixa lateral e mancha umeral, número de raios ramificados na nadadeira anal, número de manchas umerais, o padrão de cromatóforos na região anterior do corpo abaixo da linha lateral, presença/ausência de ganchos nas nadadeiras dos machos adultos e diferenças no número e morfologia dos cromossomos (Lütken, 1875; Bertaco & Malabarba, 2001; Bertaco & Lucena, 2006; Ingenito & Duboc, 2014; Oliveira, 2017; Oliveira, 2021).

Medidas morfométricas também têm se mostrado como grande aliadas na diagnose de espécies do complexo *P. scabripinnis* (Bertaco & Malabarba, 2001; Bertaco & Lucena, 2006; Bertaco et al., 2010; Oliveira et al., 2013; Ingenito & Duboc, 2014). Em geral, enquanto as contagens para as características merísticas seguem o trabalho de Fink & Weitzman (1974) as medidas morfométricas seguem Menezes & Weitzman (1990) e consistem em expressar medidas lineares do corpo dos peixes (ex: altura do corpo) em % do comprimento padrão, medido da ponta do focinho até o fim do pedúnculo caudal, ou no caso de medidas cranianas (ex: diâmetro da órbita) em % do comprimento da cabeça.

1.4 DNAs satélites como marcadores moleculares

A maior parte do genoma eucarioto é formado por elementos repetitivos, que podem estar organizados em *tandem* ou dispersos pelo genoma (López-Flores & Garrido-Ramos, 2012). Pertencentes ao grupo de elementos repetitivos em *tandem*, DNAs satélites (ou simplesmente, satDNAs) são conhecidos por formar longas matrizes de repetição que podem chegar até megabases (milhões de bases) de comprimento (Novák et al., 2017). Originalmente este tipo de sequência era obtida a partir do isolamento e fracionamento do DNA por centrifugação em gradiente de densidade de alta velocidade, levando à formação de bandas separadas devido à sua abundância e diferença no conteúdo de bases do resto do DNA (Kit, 1961). Hoje, no contexto das técnicas de NGS, ferramentas elaboradas de bioinformática foram construídas permitindo uma caracterização mais eficiente de sequências de satDNAs, como o Tandem repeats finder (Benson, 1999), RepeatExplorer (Novák et al., 2013) e TAREAN (Novák et al., 2017).

Alguns aspectos da natureza dos satDNAs tornam esse tipo de sequência relevante no estudo de complexos de espécies e espécies crípticas. Primeiro, os monômeros dos satDNAs possuem, normalmente, mais de uma centena de pares de bases e são altamente homogeneizados ao longo das repetições (Macas et al., 2002), processo que conhecemos como evolução concertada ou evolução em concerto. Segundo, os satDNAs podem ser organizados em famílias, ou mesmo superfamílias, de acordo com suas características moleculares, como tamanho do monômero, variações na sequência de nucleotídeos, abundância e localização no genoma (Garrido-Ramos, 2017; Šatović-Vukšić & Plohl, 2023). Por fim, podem haver centenas de famílias de satDNAs diferentes em um genoma eucarioto, cada uma com suas próprias dinâmicas evolutivas, o conjunto destas famílias é denominado “satelitoma” e tendem a ser

compartilhadas entre espécies próximas, com diferenças principalmente quantitativas devido a mecanismos estocásticos da evolução em concerto (Ruiz-Ruano et al., 2016).

Considerando o exposto acima, no segundo capítulo desta tese apresento um protocolo que desenvolvemos para a montagem, anotação e prospecção de sequências de satDNAs com potencial de marcadores moleculares taxonômicos ou citotaxonômicos. Embora o foco principal das análises seja o complexo *P. rivularis*, nossos dados nos permitiram trazer contribuições no estudo de outras espécies crípticas e populações problemáticas dos gêneros *Psalidodon* e *Astyanax* em Minas Gerais: *Psalidodon fasciatus*, cujas populações do São Francisco e Paraná foram apontadas em diferentes estudos como espécies crípticas (Pazza et al., 2017; Gavazzoni et al., 2023), *Psalidodon rioparanaibanus* e *Psalidodon paranae*, espécies irmãs na bacia do Alto rio Paraná (de Mesquita Alves et al., 2020); e *Astyanax lacustris* e “*Astyanax altiparanae*”, táxons que atualmente são sinônimos (Lucena & Soares, 2016), mas cuja sinonímia foi contestada por diferentes estudos (Cunha et al., 2019; Gavazzoni et al., 2024).

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo Geral

Nosso objetivo principal é a identificação e delimitação das diferentes espécies crípticas dentro do complexo *P. rivularis* e o estabelecimento de marcadores moleculares e diagnoses, não apenas para as espécies crípticas deste grupo, mas também espécies filogeneticamente relacionadas, com ocorrência em Minas Gerais.

1.5.2 Objetivos Específicos

- 1- Identificar quantas espécies crípticas de *P. rivularis* existem, pelo menos, na bacia do Alto rio São Francisco.
- 2- Compreender se existe correspondência entre os diferentes citótipos, morfotipos e linhagens genéticas do grupo *P. rivularis*.
- 3- Identificar marcadores genômicos ou características morfológicas que possam ser usadas na diagnose dentro grupo e para espécies aparentadas na mesma região geográfica.
- 4- Esclarecer as relações taxonômicas, filogenéticas e evolutivas do grupo.

2 CAPÍTULO 1 – DESVENDANDO UM ENIGMA DE 150 ANOS, *Psalidodon rivularis* (ACESTRORHAMPHIDAE: ACESTRORHAMPINAE) UM COMPLEXO DE ESPÉCIES OU UMA ESPÉCIE POLIMÓRFICA?

Igor Henrique Rodrigues-Oliveira, Iuri Batista da Silva, Renan Rodrigues Rocha, Priscila Martins de Assis, Luiz Guilherme Pereira Pimentel, Rafael Augusto Silva Soares, Fabiano Bezerra Menegidio, Rubens Pasa e Karine Frehner Kavalco

Resumo

Dentre os peixes da Bacia do rio São Francisco, *Psalidodon rivularis*, conhecido como “piaba do córrego”, tem sido considerado um complexo de espécies amplamente distribuído nesta região, com notável variabilidade morfológica e citogenética, mesmo em condições de simpatria. Outras duas espécies relacionadas e simpátricas são *Hyphessobrycon santae* descrita a partir de dois sítipos de *P. rivularis*, e *Astyanax turmalinensis*, descrita em afluentes do rio Jequitinhonha e posteriormente coletada nas bacias do rio Doce e São Francisco. Ambas não foram incluídas em revisões recentes que transferiram várias espécies destes gêneros para *Psalidodon*. Este trabalho busca entender se *P. rivularis* corresponde a uma espécie polimórfica ou diferentes espécies crípticas e/ou semicrípticas. Para tal, analisamos características merísticas, morfométricas e cariotípicas de um total de 398 espécimes de *P. rivularis*, *A. turmalinensis* e *H. santae*; além disso, inferimos a filogenia do grupo a partir de dados de NGS de 25 amostras do grupo, incluindo outgroups, utilizando tanto genes do genoma mitocondrial quanto sequências ortólogas do genoma nuclear. Nossas análises integrativas demonstram a existência de pelo menos cinco espécies diferentes no complexo *P. rivularis*. Propomos como *P. rivularis* sensu stricto apenas os exemplares mais aparentados ao lectótipo de *P. rivularis*, ao qual chamaremos de morfotipo 1, cujos indivíduos cariotipados possuem $2n=46$ cromossomos. As outras espécies seriam: *Psalidodon santae* comb. nov. (morfotipo 2), que corresponde aos exemplares do leste do rio São Francisco mais aparentados aos sítipos de *H. santae* e a série tipo de *A. turmalinensis*, e outras três possíveis espécies novas com diferenças em sua morfologia e distribuição (morfotipos 2, 3 e 4), todas com $2n=50$ cromossomos.

Palavras chaves: citótipos, espécies crípticas, filogenômica, morfometria, morfotipos.

2.1 Introdução

O gênero *Psalidodon* Eigenmann, 1911 é um antigo gênero proposto por Eigenmann para abrigar uma única espécie: *Psalidodon gymnodontus* (Eigenmann, 1911). Com a transferência de *P. gymnodontus* para o gênero *Astyanax* (Pavanelli & Oliveira, 2009), o gênero caiu em desuso, até ser “ressuscitado” por Terán et al. (2020) com uma diagnose expandida e diversas espécies incluídas. Hoje o gênero conta com 56 espécies, a maioria vinda do gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (46 spp.) seguida pelo gênero *Hyphessobrycon* Durbin, 1908 (5 spp.). Com a inclusão de diversos complexos de espécies ao gênero, como “*Astyanax*” *scabripinnis* (Moreira-Filho & Bertollo, 1991), é esperado que o número de espécies aumente nos próximos anos.

Dentre as adições de Terán et al. (2020) ao gênero *Psalidodon*, está a espécie *Psalidodon rivularis* Lütken, 1875 (descrita como “*Tetragonopterus*” *rivularis*). Essa pequena piaba é considerada endêmica da bacia do rio São Francisco e recentemente foi reconhecida como um complexo de espécies, com base em dados morfológicos, citogenéticos e genômicos, apresentando inclusive diferenças no número cromossômico, com citótipos de $2n=46$ e $2n=50$ cromossomos (Oliveira, 2021). A variação morfológica da espécie foi notada desde sua descrição, uma vez que Lütken (1875) mencionou uma informação dada a ele por Reinhardt, coletor dos espécimes, de que os cardumes de *P. rivularis* frequentemente possuíam características locais diferentes, associadas a coloração ou forma do corpo, e forneceu duas ilustrações com o intuito de registrar essa variação morfológica na espécie, que denominaremos aqui morfotipo 1 (prancha V: Fig. 13 da obra original) e morfotipo 2 (prancha V: Fig. 14 da obra original).

Outra fonte de variação morfológica mencionada por Lütken (1875) é a completude da linha lateral na espécie, que pode ser completa, incompleta ou interrompida. Entretanto, o mesmo autor alertou que esta não deveria ser considerada uma característica válida na diagnose de variantes ao nível de espécie ou subespécie, uma vez que esta característica pode variar até mesmo entre os dois lados de um mesmo indivíduo. Tal fato não foi levado em consideração por Eigenmann (1907) quem, ao analisar um lote contendo quatro tipos de “*T.*” *rivularis*, dois com linha lateral completa e dois com linha lateral incompleta, nomeou uma nova espécie para a variedade com linha lateral incompleta: *Hemigrammus santae* (mais tarde: *Hyphessobrycon santae*, Eigenmann, 1910). O autor também mencionou, sem especificar, diferenças em relação à forma e coloração do corpo. Ao analisar os tipos de *H. santae* de Eigenmann (1907) é possível notar sua semelhança com o morfotipo 2 de *P. rivularis*, caindo no hipodigma desta espécie.

Uma terceira espécie que entra no hipodigma *P. rivularis* é *Astyanax turmalinensis* Triques, Vono e Caiafa, 2003. Esta espécie foi descrita inicialmente para a bacia do rio Jequitinhonha, sem grandes comparações com *P. rivularis* (Triques et al., 2003), sendo, posteriormente, registrada nos rios Doce e rio das Velhas, no Parque Nacional Serra do Cipó, onde ocorre simpátrica a *P. rivularis* (Triques & Queiroz, 2010). Triques e Queiroz (2010) forneceram uma diagnose entre *A. turmalinensis* e *P. rivularis* utilizando quatro características morfológicas, entretanto, ao que parece, esta leva em consideração principalmente o morfotipo 1 de *P. rivularis*, enquanto, assim como *H. santae*, *A. turmalinensis* é mais aparentado ao morfotipo 2 de *P. rivularis*.

Delimitar espécies em complexos de espécies utilizando apenas caracteres morfológicos pode ser difícil, se não inviável, devido a vários fatores inerentes a complexo de espécies, como serem monomórficos em caracteres fenotípicos e com potencial de ocorrência em simpatria e intercruzamento (Grube & Kroken, 2001). No caso de peixes associados ao antigo complexo *P. scabripinnis*, podemos citar também a ausência de intervalos discretos em dados merísticos e morfométricos (Silva et al., 2025). Além disso, características morfológicas podem ser altamente homoplásticas, com diversos caracteres que evoluíram múltiplas vezes nos peixes associados à família “Characidae” (sensu lato), como é o caso da incompletude da linha lateral e perda da nadadeira adiposa, normalmente associados com eventos de miniaturização, além de outras características (Mirande, 2010).

Neste contexto, uma abordagem integrada que inclui dados fenotípicos e moleculares, especialmente com múltiplos loci, deve ser encorajada (Grube & Kroken, 2001). Abordagens integrativas utilizando múltiplas fontes de dados, como DNA barcode, citogenética, morfometria e morfologia, foram empregadas com sucesso em estudos recentes na delimitação de espécies em grupos problemáticos como *Astyanax lacustris* e espécies do complexo *P. scabripinnis* do Rio Grande do Sul, Brasil (Gavazzoni et al., 2024; Silva et al., 2025).

Neste trabalho nosso objetivo foi esclarecer se a variação morfológica e cariotípica em *P. rivularis* sensu lato é correspondente a uma espécie altamente polimórfica ou a diferentes espécies crípticas e semicrípticas simpátricas na bacia do Alto rio São Francisco. Definimos aqui *P. rivularis* sensu lato como todos os exemplares que se enquadram morfológicamente no hipodigma da espécie considerando sua descrição original (Lütken, 1875), que por consequência, abrange espécimes atribuídos a *H. santae* e *A. turmalinensis* (Oliveira, 2017). Para responder esse questionamento utilizamos uma abordagem integrada com diferentes dados

fenotípicos (cariótipo, morfologia e morfometria) e genômicos (mtDNA e diferentes loci ortólogos obtidos a partir de dados de NGS de *short reads*).

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Amostragem

Para este trabalho, nós analisamos um total de 452 espécimes, sendo 398 correspondentes ao *P. rivularis* sensu lato. Os espécimes analisados provêm de 26 pontos de coleta diferentes, a maioria (22 locais) na mesorregião hidrográfica do Alto rio São Francisco (Figura 1). Desta amostragem, dados morfológicos, moleculares e cariotípicos foram obtidos a partir de 260 espécimes de lambaris, coletados especificamente para este trabalho, entre os anos de 2021 e 2024; e 162 espécimes obtidos a partir de exemplares previamente depositados na Coleção de Ictiológica do Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva, da Universidade Federal de Viçosa – Campus Rio Paranaíba (LaGEEvo UFV CRP), coletados entre 2008 e 2024, cujos tecidos e suspensões celulares se encontram no banco de amostras de Tecidos e Suspensões o mesmo laboratório.

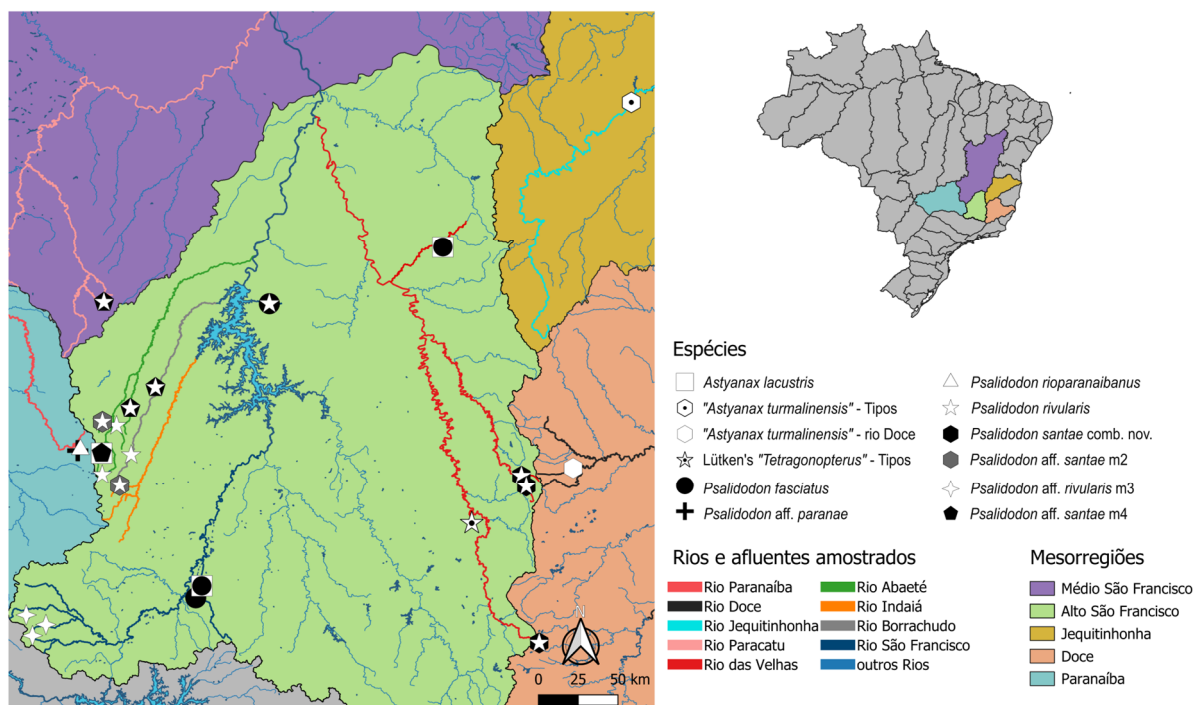


Figura 1: Mapa da região de estudo, evidenciando os pontos de amostragem utilizados neste trabalho para *P. rivularis* “sensu lato” e material comparativo. Dois pontos de coleta sobrepostos no Parque Nacional Serra do Cipó estão ocultos. A amostra de *"Astyanax turmalinensis"* do rio Doce não foi usada no presente estudo, mas foi incluída no mapa para demonstrar a presença do grupo *P. rivularis* “sensu lato” na bacia do rio Doce

Analizamos pessoalmente dados morfológicos e morfométricos de 20 exemplares da série tipo de *A. turmalinensis* (holótipo + 19 parátipos) depositados na coleção ictiológica do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Minas Gerais (DZUFMG). Incluímos nas análises fotografias de alta resolução e ct Scan do lectótipo de “*T.*” *rivularis*, e de sítipos de *Tetragonopterus lacustris* Lütken, 1875 (nome válido: *Astyanax lacustris*) e *Tetragonopterus cuvieri* Lütken, 1875 (nome válido: *Psalidodon fasciatus* Cuvier, 1819), disponibilizados no site das coleções biológicas do Museu de História Natural da Dinamarca (<https://collections.snm.ku.dk/en>). Por fim, analisamos também fotografias e anotações generosamente nos fornecidas pelo professor Carlos Alexandre Miranda Oliveira, de espécimes que incluem os sítipos de *H. santae* e paralectótipos de *P. rivularis* por ele analisados em sua Tese (Oliveira, 2017). Informações detalhadas a respeito dos lotes analisados nesse trabalho podem ser encontradas no material suplementar S1.

2.2.2 Coleta e obtenção dos tecidos e suspensões celulares

Para esse trabalho, realizamos coletas em 15 locais ao redor da mesorregião hidrográfica do Alto rio São Francisco, realizadas mediante a licenças emitidas pelo SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade, número de licença 25634-9) atribuídas a Karine Frehner Kavalco. Coletamos os espécimes principalmente pelo método passivo, utilizando armadilhas do tipo covo de 80 cm de diâmetro. Como iscas utilizamos pequenos cubos de 3 cm³ de carne vermelha misturada com farinha de trigo em flocos ou pão moído. Alternativamente, em alguns locais foi utilizada pesca ativa, com auxílio de tarrafas, peneiras e puçás, ou rede de espera com malha de 15 mm.

Após a coleta, os animais foram transportados em baldes contendo água limpa e munidos de aeradores até o LaGEEvo UFV CRP, onde foram eutanasiados para extração dos tecidos e suspensões celulares e posteriormente fixados para depósito na coleção ictiológica. A única exceção foram os exemplares coletados no Parque Nacional Serra do Cipó, que foram eutanasiados e processados nas dependências do parque. Os espécimes transportados até o LaGEEvo UFV CRP ficaram em aquários de 25 L, contendo filtros de água, aeradores e termostatos regulados a 27° C, onde ficaram acondicionados até o dia da eutanásia.

Os espécimes foram eutanasiados em Eugenol 1%, seguindo as diretrizes da Resolução Normativa Nº 37 do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal, do Ministério de Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (CONCEA - MCTI). Todos os

experimentos com animais vivos realizados neste trabalho foram conduzidos mediante aprovação do projeto submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV) (protocolo: 23/2023).

Depois das coletas de exemplares, retiramos os tecidos do coração e fígados e os armazenamos em eppendorfs de 1,5 ml com álcool PA para posterior extração de DNA. Para obtenção de suspensões celulares, retiramos os tecidos do baço, rim anterior e rim posterior, e utilizamos um protocolo adaptado de Bertollo (1978), que pode ser encontrado no material suplementar S2.

2.2.3 Obtenção de cariótipos, extração de DNA e análises genômicas

Para visualizar cromossomos metafásicos, pingamos as suspensões celulares em lâminas de vidro e prosseguimos com a coloração utilizando Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (PH 6,8). Caracterizamos a morfologia dos cromossomos de acordo com a razão entre os comprimentos dos braços longos e curtos seguindo as medidas propostas por Levan et al. (1964).

Nos estudos genômicos, nós realizamos a extração de DNA de 13 espécimes de *P. rivularis* sensu lato coletados em diferentes pontos do Alto rio São Francisco (12) e Médio rio São Francisco (1) e de um espécime de *Psilidodon* aff. *paranae* coletado na bacia do rio Paranaíba. Os indivíduos de *P. rivularis* sensu lato amostrados provêm de oito localidades distintas no Alto e Médio rio São Francisco, cobrindo afluentes de seis grandes rios (Abaeté, Borrachudo, Indaiá, Paracatu, São Francisco e das Velhas), e abrangendo todos os morfotipos identificados neste trabalho, com a maioria dos espécimes (11) tendo sido previamente cariotipados.

Para a obtenção do DNA a ser sequenciado, nós elaboramos um protocolo adaptado utilizando o kit Quick-DNA/RNA Viral Magbead da Zymo e o extrator automatizado Locus extracta 32. O protocolo utilizado está descrito no material suplementar S3. Após a extração, nós verificamos a integridade do DNA em gel de Agarose 1% e a pureza do mesmo em Nanodrop. As amostras foram sequenciadas em plataforma Element Bioscience Aviti System (*Department of Biosystems Science and Engineering, ETH Zurich, Basel, Switzerland*) onde foram geradas bibliotecas de 2x150 para cada amostra com até 5 Gb de dados.

Para as reconstruções filogenéticas, consideramos duas fontes de dados: genoma mitocondrial (mtDNA ou mitogenoma) e genes ortólogos de peixes (dados de treinamento: *Danio rerio*) preditos pela ferramenta Augustus v.3.4.0 (Keller et al., 2011). Para realizar as montagens, anotações, alinhamentos e filogenias, utilizamos a plataforma Galaxy Europe (The Galaxy Community, 2022). Em adição às 14 bibliotecas que sequenciamos, nós incorporamos em nossas análises mais 11 amostras. Tais amostras incluem oito genomas mitocondriais previamente montados e anotados (*Astyanax aeneus*, *Astyanax altiparanae*, *Astyanax lacustris*, *Astyanax mexicanus*, *Psalidodon fasciatus*, *Psalidodon rioparanaibanus* e duas amostras de *P. rivularis*) do trabalho de Pasa et al. (2021), o genoma mitocondrial de *Psalidodon paranae* (Silva et al., 2016), e dois genomas mitocondriais que montamos a partir de bibliotecas do NCBI SRA (*Psalidodon scabripinnis*: SRR9985989 e *Psalidodon correntinus*: SRR11147340).

Nós montamos os mitogenomas utilizando o software NOVOplasty v.4.3.1 (Dierckxsens et al., 2017), exceto para uma amostra (*P. rivularis* do córrego Crico, sub-bacia do rio Paracatu) para a qual utilizamos o software GetOrganelle v.1.7.7.1 (Jin et al., 2020). Os valores de K-mer e sementes utilizadas podem ser encontrados na Tabela 1. Os genomas mitocondriais foram anotados com o software MITOS2 v.2.1.9 (Donath et al., 2019) da plataforma Galaxy Europe, utilizando o código genético 2 (mtDNA de vertebrados) e o banco de dados RefSeq89 (Metazoa), e com o software MitoAnnotator da plataforma MitoFish (Iwasaki et al., 2013). Para as filogenias, extraímos e utilizamos os genes codificadores de proteína (PCGs) e genes ribossomais (rRNAs).

Tabela 1: Genomas mitocondriais montados. Para as duas bibliotecas retiradas do NCBI SRA o número do SRR é fornecido como “Origem da biblioteca”, para as bibliotecas sequenciadas para este trabalho, a proveniência da amostra é fornecida.

Amostra	Origem da biblioteca	Software	K-mer	seed
<i>P. correntinus</i>	SRR11147340	NOVOplasty	39	MW495301.1
<i>P. aff. paranae</i>	Córrego Olhos d’água, Rio Paranaíba	NOVOplasty	35	KX609386.1
<i>P. rivularis</i> m1	Córrego Lage, Rio Abaeté	NOVOplasty	39	MT428069.1
<i>P. rivularis</i> m1	Córrego Bonito, rio Borrachudo	NOVOplasty	39	MT428069.1

<i>P. rivularis</i> m1	Córrego Crico, Rio Paracatu	GetOrganelle	115	MT428069.1
<i>P. rivularis</i> m1	Rio Funchal, Rio Indaiá	NOVOplasty	39	MT428069.1
<i>P. rivularis</i> m1	Nascente do rio Borrachudo, Rio Borrachudo	NOVOplasty	39	MT428069.1
<i>P. rivularis</i> m1	Nascente do rio das Velhas, Rio das Velhas	NOVOplasty	39	MT428069.1
<i>P. rivularis</i> m1	Encontro dos rios Mascates e Bocaina, Rio das Velhas	NOVOplasty	39	MT428069.1
<i>P. rivularis</i> m2	Rio Funchal, Rio Indaiá	NOVOplasty	39	MT428070.1
<i>P. rivularis</i> m2	Córrego Lage, Rio Abaeté	NOVOplasty	39	MT428070.1
<i>P. rivularis</i> m2	Nascente do rio das Velhas, Rio das Velhas	NOVOplasty	39	MT428070.1
<i>P. rivularis</i> m2	Encontro dos rios Mascates e Bocaina, Rio das Velhas	NOVOplasty	39	MT428070.1
<i>P. rivularis</i> m3	Cachoeira Rasga Canga, Rio São Francisco	NOVOplasty	39	MT428069.1
<i>P. rivularis</i> m4	Córrego Bonito, rio Borrachudo	NOVOplasty	39	MT428070.1
<i>P. scabripinnis</i>	SRR9985989	NOVOplasty	35	KX609386.1

Para estimar as relações filogenéticas do grupo considerando uma fonte de dados diferente do mitogenoma, nós realizamos análises filogenômicas com PCGs ortólogas recuperadas em todas as bibliotecas, ou em pelo menos 90% delas. Além das bibliotecas que

enviamos para sequenciamento, e das bibliotecas já citadas de *P. scabripinnis* e *P. correntinus*, utilizamos as bibliotecas de *P. paranae* (SRR5461471), *A. aeneus* (SRR1927238), *A. mexicanus* (SRR2040423) e as demais bibliotecas do trabalho de Pasa et al. (2021) que nos foram fornecidas pelo autor.

Para obter esses loci ortólogos a partir dos dados brutos de *short reads*, utilizamos o protocolo de Roncoroni & Gallone (2022) com algumas modificações, com fluxo de trabalho dentro da plataforma Galaxy Europe (The Galaxy Community, 2022). O material suplementar S4 descreve o protocolo modificado, incluindo as referências para cada uma das ferramentas utilizadas. Após as montagens e anotações das PCGs em cada uma das bibliotecas, nós concatenamos todas as sequências obtidas em um único conjunto de dados, e filtramos este conjunto de dados para manter apenas sequências com no mínimo 300 nucleotídeos. Só após esta filtragem realizamos a busca das sequências ortólogas com a ferramenta Proteinortho6 v.6.3.4 (Klemm et al., 2023).

Tanto para os genes mitocondriais quando para as PCGs ortólogas, alinhamos cada gene utilizando a ferramenta MAFFT v.7.526 (Katoh & Standley, 2013), com o parâmetro FFT-NS-2 para os genes mitocondriais e L-INS-i para os genes ortólogos. Após os alinhamentos, os genes foram concatenados e particionados utilizando a ferramenta Concatenador v.0.3.1 (Vences et al., 2022). Para os PCGs, o particionamento por códon e por gene foi utilizado, para os rRNAs, o particionamento considerou apenas os genes. Três concatenamentos foram utilizados: mtDNA (PCGs + rRNAs do mitogenoma), matriz 100% (PCGs ortólogas recuperadas em todas as bibliotecas) e matriz 90% (PCGs ortólogas recuperadas em pelo menos 23 bibliotecas). Nós utilizamos a ferramenta ClipKIT (Steenwyk et al., 2020) para “trimar” os alinhamentos utilizando a opção smart-gap.

Para a construção das filogenias, utilizamos o software IQ-TREE v.2.4.0 (Minh et al., 2020) com mil replicações de *ultrafast bootstrap*. Como métodos de suporte de ramos adicionais, utilizamos mil replicações de SH-aLRT (--alrt) e bootstrap baseado em verossimilhança (--lbp), além de empregar o teste de Bayes aproximado (--abayes). Finalmente, com o intuito de se detectar possíveis eventos reticulados, como hibridizações e introgressões, utilizamos a matriz 90% para criar uma rede filogenética no software SplitsTree v.6.4.13 (Huson & Bryant, 2024), utilizando o algoritmo *Neighbor Net* a partir dos cálculos de *p-distance*, com 100 replicações de bootstrap, e empregamos o Phi Test (Φ Test) para detectar estatisticamente a presença de introgressões.

2.2.4 Análises morfológicas e morfométricas

Para a caracterização morfológica dos espécimes analisados, realizamos as contagens de características merísticas de acordo com Fink & Weitzman (1974), com exceção do número de escamas abaixo da linha lateral, para o qual seguimos Bertaco & Lucena (2006). O padrão de cromatóforos na região anterior do corpo abaixo da linha lateral foi interpretado seguindo Garutti & Langeani (2009). As medidas morfométricas foram tomadas de acordo com Menezes & Weitzman (1990), e como medidas adicionais, utilizamos uma adaptação distância órbita-opercular (OOL; Engelman, 2023) e a altura da cabeça (HH) e do pedúnculo caudal (CPH2) expressas em % da altura corporal.

Para as medições morfométricas, utilizamos um total de 140 espécimes, que incluem tanto espécimes analisados em primeira mão, quanto as fotografias dos espécimes analisados por Oliveira (2017) e dos tipos disponibilizados no site das coleções biológicas do Museu de História Natural da Dinamarca. Para a padronização e precaução, evitando vieses de medidas tomadas por diferentes pessoas, ou vieses associados a distorções fotográficas, todos os espécimes analisados foram digitalizados e as medições foram feitas no software Inkscape. Após as medições, selecionamos um total de 16 características morfométricas (Tabela 2) que foram possíveis de se obter em todos os espécimes, e incluímos ao dataset a informação do número de escamas ao longo da série longitudinal. Em seguida, utilizamos este dataset para análises estatísticas, que foram conduzidas no ambiente R v.4.4.2 (R Core Team, 2024) e R Studio v.2024.12.1+563 (Posit team, 2025).

Tabela 2: Medidas morfométricas utilizadas nas análises estatísticas.

Abreviação	Medida	Referência
PD	Distância pré-nadadeira dorsal	% do comprimento padrão
PP	Distância pré-nadadeira peitoral	% do comprimento padrão
PV	Distância pré-nadadeira pélvica	% do comprimento padrão
PA	Distância pré-nadadeira anal	% do comprimento padrão
BH	Altura corporal	% do comprimento padrão
CPH	Altura do pedúnculo caudal	% do comprimento padrão
CPL	Comprimento do pedúnculo caudal	% do comprimento padrão
AFBL	Comprimento da base da nadadeira anal	% do comprimento padrão
ODFD	Distância órbita-nadadeira dorsal	% do comprimento padrão
OOL*	Distância órbita-opérculo*	% do comprimento padrão*

HL	Comprimento da cabeça	% do comprimento padrão
OD	Diâmetro da órbita	% do comprimento da cabeça
SnL	Comprimento do focinho	% do comprimento da cabeça
UJL	Comprimento da maxila	% do comprimento da cabeça
CPH2	Altura do pedúnculo caudal 2	% da altura corporal
HH	Altura da cabeça	% da altura corporal

*Engelman (2023) estabeleceu a OOL como uma medida da margem anterior da órbita até a margem posterior do opérculo. Aqui, utilizamos essa medida como sendo da margem posterior da órbita até a margem posterior do opérculo.

Nós dividimos nossas amostras em cinco unidades taxonômicas operacionais (OTUs), baseado na congruência entre características morfológicas, citogenéticas e nos agrupamentos filogenéticos observados. Após importar os dados no ambiente R, nós checamos a normalidade dos dados com o teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias com o teste de Levene. Como estes pressupostos foram violados para algumas características, nós utilizamos o teste de Kruskal-Wallis para testar a hipótese nula de que os grupos são iguais para os dados morfológicos e empregamos comparações par-a-par utilizando o teste de Dunn. Nós também conduzimos uma análise de componentes principais (PCA) para diminuir a dimensionalidade dos dados e verificar quais características são mais influentes na variação morfológica entre os espécimes. Por fim, nós empregamos uma análise de *Random Forest* para verificar quais características são mais importantes na variação entre as OTUs analisadas e até que ponto os espécimes de cada OTU poderiam ser atribuídos ao seu próprio grupo.

2.3 Resultados

2.3.1 Morfotipos e citótipos de *P. rivularis* sensu lato

Neste trabalho, nós identificamos ao menos quatro morfotipos diferentes de *P. rivularis* sensu lato, sendo dois deles correspondentes aos morfotipos 1 e 2 ilustrados por Lütken (1875) (Figuras 2A – 2B). Estes morfotipos se encontram distribuídos ao longo de 17 afluentes de seis grandes rios (São Francisco, das Velhas, Abaeté, Indaiá, Borrachudo e Paracatu) das mesorregiões hidrográficas do Alto e Médio rio São Francisco, com vários casos de simpatria entre no máximo dois deles (Figura 1). Os morfotipos podem ser diferenciados principalmente com base na altura corporal, número de escamas ao longo da série longitudinal, padrão de

cromatóforos na região anterior do corpo abaixo da linha lateral e com base no número de cromossomos.

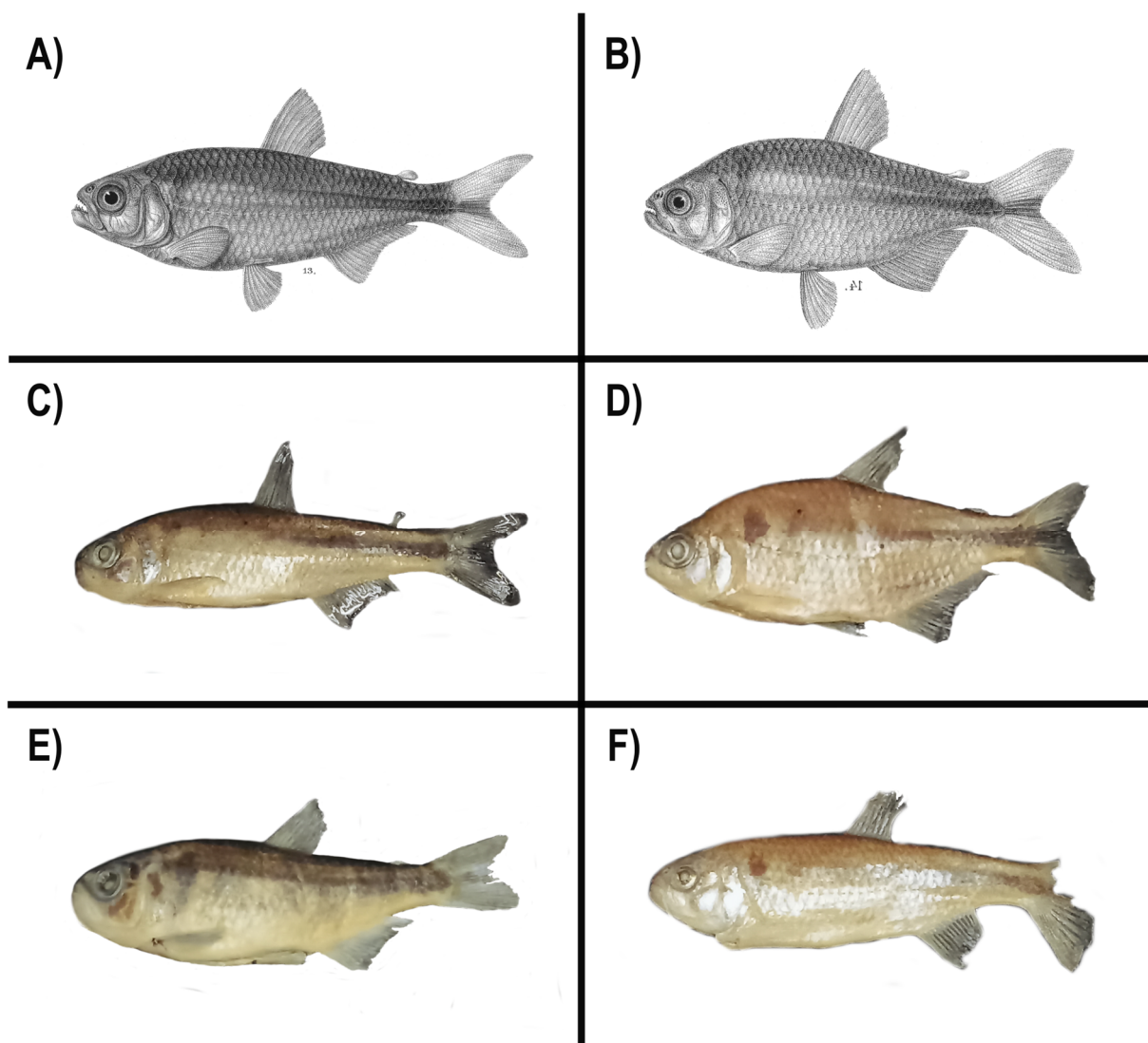


Figura 2: morfotipos de *P. rivularis*, A) morfotipo 1 de Lütken - adaptadas de Lütken (1875); conforme reproduzidas por Alves & Pompeu (2001), B) morfotipo 2 de Lütken - adaptadas de Lütken (1875); conforme reproduzidas por Alves & Pompeu (2001), C) morfotipo 1 – rio das Velhas, 69.5mm; D) morfotipo 2 – córrego Lage, 53mm; E) morfotipo 3 – cachoeira Rasga Canga, 77mm; F) morfotipo 4 – córrego Bonito, 73mm.

O morfotipo 1 corresponde a Fig. 13 da prancha V da obra de Lütken (1875) (Figuras 2A e 2C), e inclui também o lectótipo de “*T.*” *rivularis* depositado na coleção de peixes do Museu de História Natural da Dinamarca, além de outros paralectótipos. Este morfotipo é caracterizado por apresentar um corpo mais baixo, não mais do que 33% do comprimento padrão, 37-39 escamas ao longo da linha lateral e padrão reticulado de cromatóforos na região anterior do corpo. Todos os exemplares cariotipados desse morfotipo apresentaram $2n=46$

cromossomos, geralmente apresentando um, ou raramente dois, cromossomos Bs acrocêntricos de variação intercelular (Figura 3).

O morfotipo 2 corresponde a Fig. 14 da prancha V da obra de Lütken (1875) (Figuras 2B e 2D), e inclui paralectótipos de "*T.*" *rivularis*, além dos sítipos de *H. santae* e tipos de *A. turmalinensis*. Este morfotipo é caracterizado por apresentar um corpo relativamente mais alto que todos os demais, quase sempre mais do que 33% do comprimento padrão, 33-36 escamas ao longo da linha lateral e padrão reticulado de cromatóforos na região anterior do corpo. Todos os exemplares cariotipados desse morfotipo apresentaram $2n=50$ cromossomos, com um único exemplar do córrego Lage (sub-bacia do rio Abaeté) apresentando um pequeno cromossomo B acrocêntrico (Figura 3).

Os dois morfotipos restantes não possuem exemplares em qualquer uma das séries tipos de *P. rivularis*, *H. santae* e *A. turmalinensis*. O morfotipo 3 (Figura 2E) corresponde a espécimes coletados em três locais no Parque Nacional Serra da Canastra, e é caracterizado por apresentar um corpo mais baixo, raramente mais do que 33% do comprimento padrão, 37-39 escamas ao longo da linha lateral e padrão disperso de cromatóforos na região anterior do corpo. Todos os exemplares cariotipados desse morfotipo apresentaram $2n=50$ cromossomos, com alguns carregando um grande cromossomo B metacêntrico (Figura 3).

Por fim, o morfotipo 4 (Figura 2F) foi observado apenas em quatro afluentes de três rios a oeste do rio São Francisco (Abaeté, Borrachudo e Paracatu). Esse morfotipo é caracterizado por apresentar um corpo mais baixo, menor do que 33% do comprimento padrão, 33-36 escamas ao longo da linha lateral e padrão reticulado de cromatóforos na região anterior do corpo. Todos os exemplares cariotipados desse morfotipo apresentaram $2n=50$ cromossomos, com alguns carregando um grande cromossomo B metacêntrico (Figura 3). Os cariótipos montados se encontram na Figura 3 e sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3: Números cromossômicos e seus tipos para cada um dos quatro morfotipos de *P. rivularis*, separados pelo local em que foram coletados e que foi possível montar os cariótipos.

Morfótipo	Sub-bacia	Local	N° de metáfases analisadas	2n	FN	Cariótipo				
						M	SM	ST	A	Bs*
1	Abaeté	Córrego Lage	53	46 + 0-2Bs	84	8	22	8	8	0-2
		Córrego Tiros	24	46 + 0-1B	82	8	20	8	10	0-1
	Borrachudo	Córrego Bonito	17	46 + 0-1B	82	8	20	8	10	0-1
		Nascente do rio	5	46 + 0-1B	82	8	20	8	10	0-1
	Indaiá	Rio Funchal	30	46 + 0-1B	86	8	24	8	6	0-1
	Paracatu	Córrego Crico	10	46 + 0-1B	82	8	20	8	10	0-1
2	Abaeté	Córrego Lage	20	50 + 0-1B	90	8	24	8	10	0-1
	Indaiá	Rio Funchal	11	50	86	8	20	8	14	0
	Das Velhas	Rio Cipó	10	50	88	8	22	8	12	0
3	São Francisco	Serra da Canastra	31	50+0-1B	84	10	18	6	16	0-1
4	Abaeté	Usina Abaeté	26	50	90	8	22	10	10	0
	Borrachudo	Córrego Bonito	13	50	88	8	20	10	12	0-1

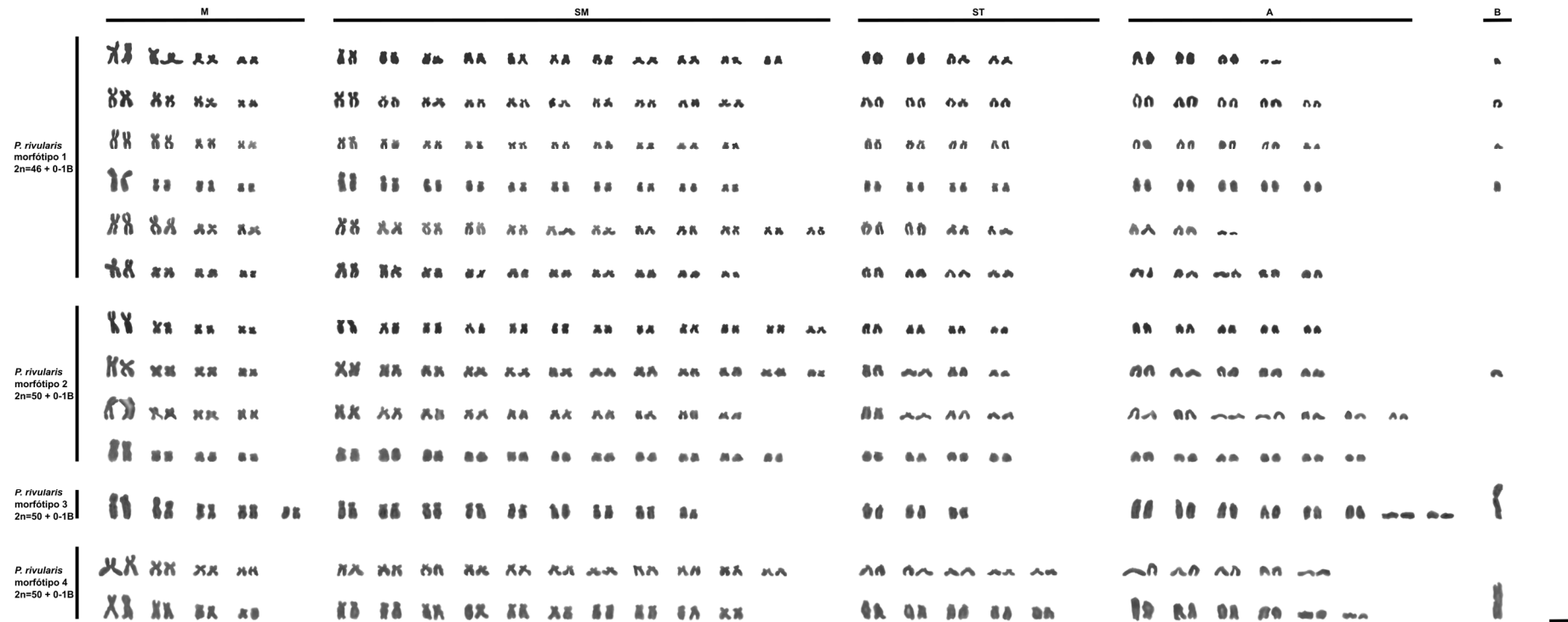


Figura 3: Cariótipos de *P. rivularis* separados pelos morfotipos identificados. De cima para baixo: córrego Lage (2n=46+B), córrego Tiros (2n=46+B), córrego Bonito (2n=46+B), rio Borrachudo (2n=46+B), rio Funchal (2n=46), córrego Crico (2n=46), córrego Lage (2n=50), córrego Lage (2n=50+B), rio Funchal (2n=50), rio Cipó (2n=50), cachoeira Rasga Canga da Serra da Canastra (2n=50+B), lagoa da barragem Usina do Abaeté (2n=50) e córrego Bonito (2n=50+B). Barra de escala: 5µ.

2.3.2 Análises genômicas

Todos os genomas mitocondriais montados apresentaram entre 16700 e 16900 pb e 43% de conteúdo GC, com exceção do genoma mitocondrial de *P. rivularis* m2 do Cipó (coletado no encontro dos rios Mascates e Bocaina, no Parque Nacional Serra do Cipó) que apresentou 17086 pb e 42% de conteúdo GC. Além disso, todos os mitogenomas tiveram o mesmo número de genes, composição e organização típica da maior parte dos mitogenomas de vertebrados, incluindo teleósteos, com: 13 PCGs, sendo apenas o *ND6* encontrado na cadeia leve, 2 rRNAs (*12S rRNA* e *16S rRNA*) na cadeia pesada, 22 tRNAs, com 8 encontrados na cadeia leve, e a região controle do mitogenoma (Miya et al., 2001).

Após o alinhamento, particionamento e *trimagem* dos genes mitocondriais, nós obtivemos um alinhamento com 14027 pb. Nossa filogenia por Máxima Verossimilhança no IQ-TREE apresentou um escore final de -41161.857758; e em geral, com concordância e altos valores para os diferentes métodos de suporte (Figura 4A). Nós obtivemos um clado contendo todas as espécies de *Psolidodon* relacionadas ao complexo *P. scabripinnis* (ou seja, sem *P. fasciatus* e *P. correntinus*). Em geral, quase todos os mitogenomas de *P. rivularis* sensu lato formaram um grupo monofilético, irmão de um clado contendo *P. paranae* e *P. scabripinnis*, ao qual denominamos Grupo “*paranae-scabripinnis*”.

Dentro do grupo monofilético contendo apenas *P. rivularis*, observamos dois clados bem estruturados, um contendo apenas exemplares do morfotipo 1 coletados em afluentes dos rios ao oeste da mesorregião do Alto rio São Francisco (rios Abaeté, Indaiá e Borrachudo), e o outro contendo exemplares do morfotipo 1 do córrego Crico, afluente do rio Paracatu no Médio São Francisco, e de afluentes dos rios Cipó e das Velhas no leste do Alto São Francisco, além de exemplares dos morfotipos 2 e 4, sem qualquer estruturação entre eles. Os únicos genomas mitocondriais que não recuperamos dentro deste grupo monofilético de *P. rivularis* foram *P. rivularis* m2 do Cipó, que recuperamos como grupo irmão de todos os demais membros do antigo complexo *P. scabripinnis* na análise e *P. rivularis* M3 do Parque Nacional Serra da Canastra, que recuperamos como grupo irmão de *P. rioparanaibanus* + *P. aff. paranae* do Rio Paranaíba, em um clado que denominamos Grupo “Paranaíba-Canastra”.

Nossa matriz 100% contém 51 genes ortólogos entre todas as bibliotecas, com um alinhamento final de 85827 pb, que resultou em um escore final de -201728,8494 na filogenia por máxima verossimilhança (Figura 4B). Nesta filogenia, também recuperamos um clado contendo todas as espécies relacionadas ao complexo *P. scabripinnis*, bem como os grupos

“*paranae-scabripinnis*” e “Paranaíba-Canastra”, todos com altos valores de suporte. Diferente da filogenia com mtDNA, nós obtivemos dois grandes clados dentro do complexo *P. scabripinnis*, um deles inteiramente composto por todos os exemplares de *P. rivularis* do morfotipo 1, que estão divididos em dois clados principais em acordo com o mtDNA: um com os espécimes do oeste da mesorregião do Alto São Francisco e outro com os espécimes do Médio São Francisco e leste do Alto São Francisco.

Dentro do outro clado do complexo *P. scabripinnis*, recuperamos os dois exemplares de *P. rivularis* do morfotipo 4 como um grupo monofilético irmão do grupo “*paranae-scabripinnis*”. Já os quatro exemplares de *P. rivularis* do morfotipo 2 formaram um agrupamento parafilético em relação ao grupo “Paranaíba-Canastra”, e se organizaram em dois clados: um com as amostras do leste da mesorregião do Alto rio São Francisco (nascente do rio das Velhas e rio Cipó), e outro das amostras do oeste da mesorregião do Alto rio São Francisco (córrego Lage e rio Funchal).

Já nossa matriz 90% contém um total de 568 PCGs ortólogas recuperadas em pelo menos 23 das 25 bibliotecas, apresentando um alinhamento final de 860113 pb e um escore final de -2203710.6475 na filogenia por máxima verossimilhança (Figura 4C). Todos os suportes de ramos apresentaram o valor máximo em cada um dos métodos aplicados (com exceção de um único agrupamento contendo as amostras de *P. rivularis* M1 do Cipó e das Velhas). Em geral, a topologia da filogenia ficou muito parecida com a da matriz 100%, com a exceção que os exemplares de *P. rivularis* m2 do leste da mesorregião do Alto rio São Francisco apareceram como grupo irmão do clado *P. rivularis* m4 + grupo “*paranae-scabripinnis*”, e com o clado *P. rivularis* m1 “trocando” de posição com o clado contendo *P. rivularis* m2 do oeste do Alto rio São Francisco + clado “Paranaíba-Canastra”.

O Phi Test rejeitou a hipótese nula de ausência de recombinação ($p=0.0$) na matriz 90% e a rede filogenética apresentou uma topologia reticulada com 62 ramificações (Figura 4D), sugerindo processos de hibridismo e introgressões na história evolutiva do grupo. Apesar da grande quantidade de reticulações, a rede filogenética tende a concordar com os agrupamentos dos clados *P. rivularis* M1 (bootstrap = 100), *P. rivularis* M4 (bootstrap = 100), grupo “*paranae-scabripinnis*” (bootstrap = 100) e grupo “Paranaíba-Canastra” (bootstrap = 96). Em contrapartida, um agrupamento unindo os *P. rivularis* M2 do leste e oeste do Alto rio São Francisco tem baixo suporte (bootstrap = 61).

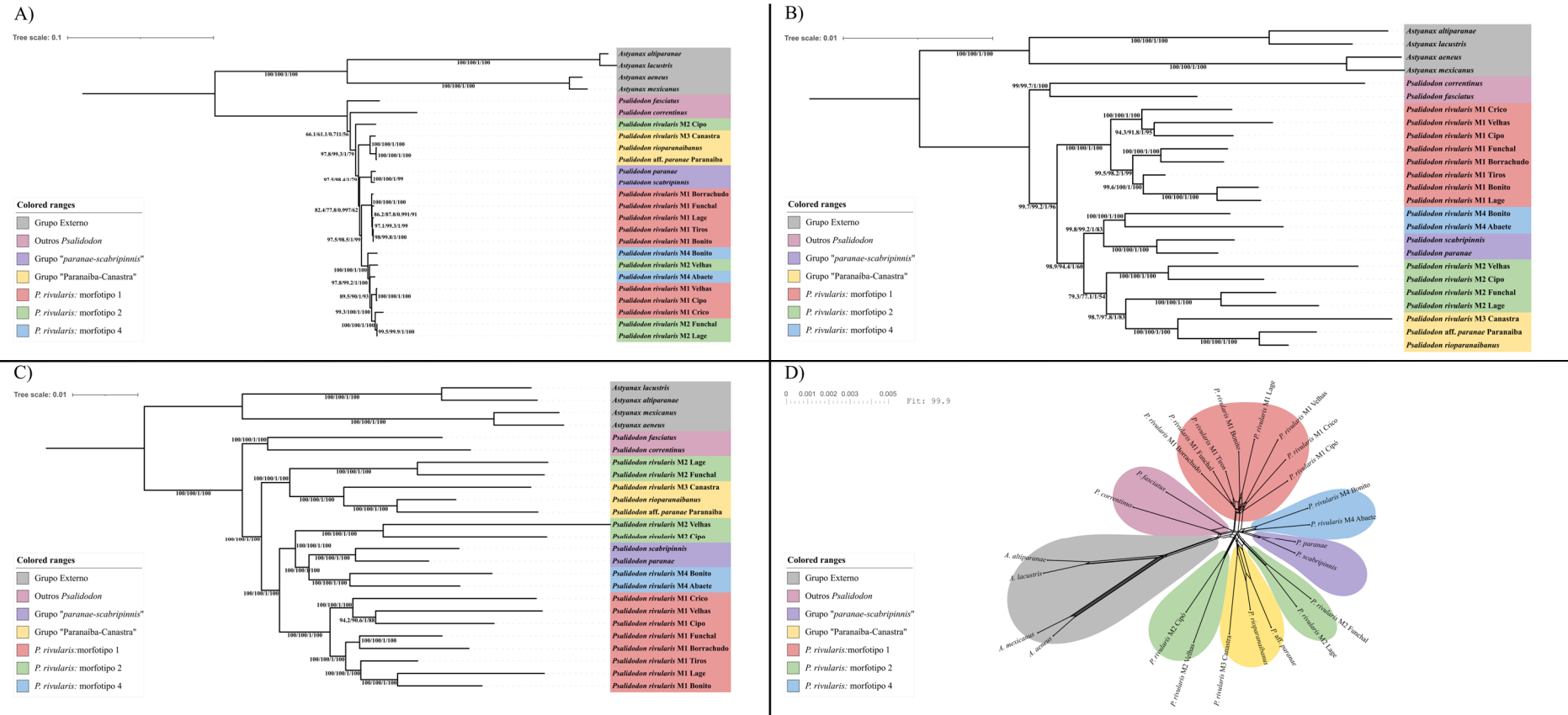


Figura 4: **A)** Árvore de Máxima Verossimilhança construída a partir de 15 genes do mtDNA, totalizando 14027 pb no alinhamento final. **B)** Árvore de Máxima Verossimilhança construída a partir de 51 PCGs ortólogas da matriz 100%, alinhamento final: 85827 pb. **C)** Árvore de Máxima Verossimilhança construída a partir de 568 PCGs ortólogas da matriz 90%, alinhamento final: 860113 pb. **D)** *Neighbor-Net* baseada no alinhamento de 860113 pb da Matriz 90%, caixas retangulares esticadas indicam relações com pouco conflito nos dados, enquanto caixas quase quadradas com comprimentos de ramificação curtos evidenciam clados com baixo suporte a alto conflito.

2.3.3 Análises morfológicas

Para as análises morfológicas estatísticas, separamos os exemplares de *P. rivularis* sensu lato em cinco grupos, correspondente aos quatro morfotipos identificados e, baseado nos resultados das análises filogenômicas, separando os exemplares do morfotipo 2 em dois grupos: oeste do rio São Francisco (córrego Lage e rio Funchal) e leste do rio São Francisco (séries tipos de *H. santae*, *A. turmalinensis*, e exemplares de *P. rivularis* do Parque Nacional Serra do Cipó e rio das Velhas). O teste de Kruskal-Wallis rejeitou a hipótese nula ($p < 0.05$) para todas as 16 características morfométricas e para o número de escamas ao longo da linha lateral, demonstrando diferenças significativas nestas características entre as cinco OTUs de *P. rivularis* sensu lato. Os resultados da comparação par-a-par do teste de Dunn para cada uma das 17 características estão sumarizadas na Tabela 4.

Tabela 4. Características com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) nas comparações par-a-par do teste de Dunn. ESF: leste do São Francisco e WSF: oeste do São Francisco.

	Morfotipo 1	Morfotipo 2 ESF	Morfotipo 2 WSF	Morfotipo 3	Morfotipo 4
Morfotipo 2 ESF	PD, PP, PV, PA, BH, CPH, CPL, AFBL, ODFD, OOL, HL, OD, SnL, UJL, HH, CPH, LL	-			
Morfotipo 2 WSF	PD, PP, PV, PA, BH, CPH, CPL, AFBL, ODFD, OOL, HL, OD, UJL, HH, CPH, LL	PD, PP, PV, CPH, CPL, OOL, HL, SnL, HH, CPH	-		
Morfotipo 3	PP, BH, CPH, CPL, AFBL, OOL, HL, OD, SnL, HH, CPH	PD, PP, PA, BH, CPH, CPL, AFBL, ODFD, OOL, HL, OD, SnL, UJL, HH, CPH, LL	PP, PV, PA, BH, CPH, CPL, AFBL, OOL, HL, OD, SnL, HH, LL	-	
Morfotipo 4	PP, BH, CPH, OOL, HL, OD, LL	PD, PV, PA, BH, CPL, AFBL, OOL, OD, HH, CPH	PP, PA, BH, CPL, AFBL, OOL, HL, OD, HH, CPH	CPH, HL, SnL, HH, CPH, LL	-

A ordenação dos espécimes na análise de componentes principais (PCA) mostrou uma separação clara do morfotipo 2 (tanto os exemplares do leste quanto do oeste do São Francisco) dos demais morfotipos de *P. rivularis* (morfotipos 1, 3 e 4) ao longo da PC1, responsável por 28,9% da variação (Figura 5A). Já na PC2, responsável por 17,4% da variação, pudemos observar principalmente a separação entre os dois grupos do morfotipo 2 e entre os exemplares dos morfotipos 1 e 3, com o morfotipo 4 ocupando uma posição intermediária entre estes. Ao plotar no gráfico as cinco características com maior contribuição aos dois eixos principais, pudemos observar que os exemplares do morfotipo 2 se diferenciam principalmente por apresentarem altura corporal (BH) e comprimento da base da nadadeira anal (AFBL) maiores. Já a separação entre os exemplares do morfotipo 2, e entre os exemplares dos morfotipos 1, 3 e 4; se devem principalmente pelo comprimento da cabeça (HL) distância pré-peitoral (PP) e distância órbita-opercular (OOL), com os exemplares do morfotipo 3 apresentando altos valores para estas características.

Nosso modelo de Random Forest teve uma acurácia geral de 93,57% (IC: 88,15% - 97,02%) e o teste de hipótese para a acurácia do modelo vs. a taxa de classificação ao acaso (NIR) rejeitou a hipótese nula de que o nosso modelo não é estatisticamente melhor do que a classificação baseada no NIR ($p = 2.2e-16$). A árvore de decisão gerada utilizou três características principais na classificação dos espécimes (Figura 5B): número de escamas ao longo da linha lateral (LL), distância órbita-opercular (OOL) e altura corporal (BH). A matriz de confusão gerada apresentou valores de sensibilidade e especificidade maiores do que 84% e 96%, respectivamente, para todas as classificações (Tabela 5).

Tabela 5: Classificação dos espécimes nos grupos de acordo com a Matriz de Confusão gerada pela análise de Random Forest. ESF: leste do São Francisco e WSF: oeste do São Francisco.

		Referência				
		<i>P. rivularis</i> m1	<i>P. rivularis</i> m2 ESF	<i>P. rivularis</i> m2 WSF	<i>P. rivularis</i> m3	<i>P. rivularis</i> m4
Predição	<i>P. rivularis</i> m1	100%	0	0	12,5%	0
	<i>P. rivularis</i> m2 ESF	0	90,48%	15,79%	0	0
	<i>P. rivularis</i> m2 WSF	0	4,76%	84,21%	0	0
	<i>P. rivularis</i> m3	0	0	0	87,5%	0
	<i>P. rivularis</i> m4	0	4,76%	0	0	100%

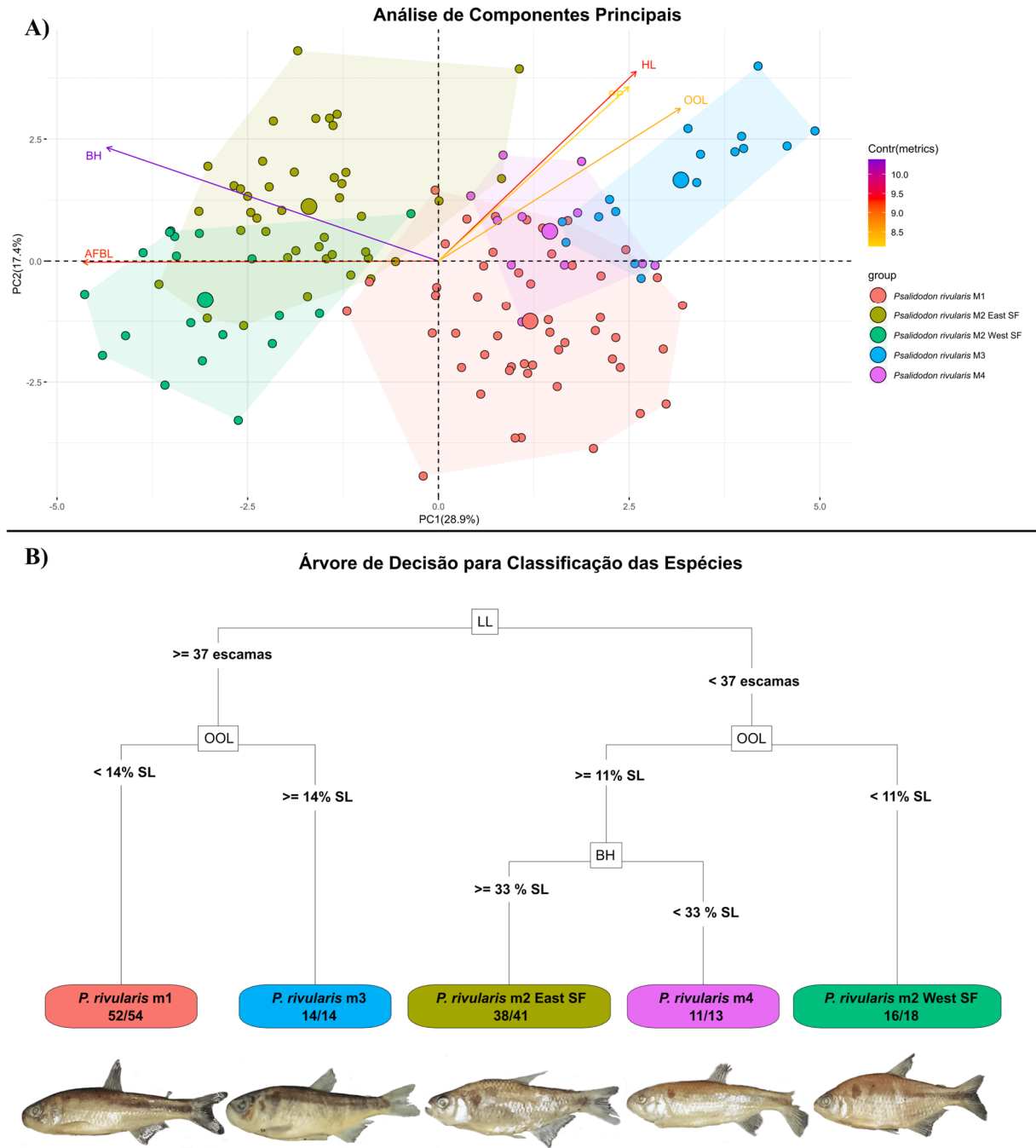


Figura 5: **A)** Análise de Componentes Principais das 16 características morfométricas utilizadas mais número de escamas ao longo da linha lateral, as cinco características com maior contribuição para as duas componentes principais estão desenhadas no gráfico. **B)** Árvore de Decisão para a Classificação dos morfotipos em espécies, os valores dentro de cada balão indicam a quantidade de exemplares classificados corretamente em cada grupo e a quantidade total de exemplares classificados no grupo.

2.3.4 Taxonomia

Considerando os gêneros presentes em Acestrorhamphidae Melo et al., 2024 com espécies historicamente atribuídas ao gênero *Astyanax* (Baird & Girard, 1854) (sensu lato), *H. santae* Eigenmann, 1907 e *A. turmalinensis* Triques, Vono & Caiafa, 2003, assim como *P. rivularis* Lütken, 1875, podem ser atribuídas ao gênero *Psalidodon* Eigenmann, 1911, e não a *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (sensu stricto), *Hemigrammus* Gill, 1858 (sensu stricto), *Deuterodon* Eigenmann, 1907, *Hyphessobrycon* Durbin, 1908 (sensu stricto), *Megalamphodus* Eigenmann, 1915, *Jupiaba* Zanata, 1997, *Andromakhe* Terán, Benitez e Mirande 2020 ou *Makunaima* Terán, Benitez e Mirande 2020; pela seguinte combinação de caracteres: ausência de *circuli* na borda posterior das escamas (vs. presente em *Astyanax* e *Jupiaba*), presença de mancha preta no pedúnculo caudal (vs. ausência *Hemigrammus*), poro laterossensorial anterior à fossa dilatadora orientado lateroventralmente (vs. orientado dorsomedialmente em *Deuterodon*), ausência da expansão dorsal do rinosfenóide entre os nervos olfatórios (vs. presente em *Deuterodon*, *Jupiaba* e *Makunaima*), numerosos e pequenos ganchos por raio na nadadeira anal dos machos (vs. um par de grandes ganchos por raio na nadadeira anal em *Hyphessobrycon* e ausência de ganchos em *Jupiaba*), ausência de uma mancha preta conspícua na nadadeira dorsal (vs. presente em *Megalamphodus*), início da nadadeira anal posterior a vertical situada no último raio da nadadeira dorsal (vs. anterior em *Andromakhe*) e presença de uma faixa preta longitudinal (vs. ausente em *Makunaima*).

***Psalidodon rivularis* (Lütken, 1875)**

(Figuras 6A – 6F, Tabela 6)

Tetragonopterus rivularis Lütken, 1875: 107-109, prancha V, fig. 13 (em parte; lectótipo e paralectótipos: ZMUC, MNHN 0000-9582, NMW 57707, SMNS 2046, ZMB 9199, USNM 44960, localidade tipo: rio das Velhas e seus Afluentes, estado de Minas Gerais, Brasil) —. Bertin, 1948:21 (catálogo de tipos de peixes do Muséum national d'Histoire Naturelle) —. Nielsen, 1974:46 (catálogo de tipos de peixes do Zoological Museum of Copenhagen) —. Fricke, 1995:9 (catálogo de tipos de peixes do Staatliches Museum für Naturkunde in Stuttgart).

Astyanax scabripinnis rivularis—. Eigenmann, 1910: 433 (transferência para *Astyanax* como subespécie de *Astyanax scabripinnis*) —. Moreira-Filho & Bertollo, 1991: 331-357 (citação como subespécie válida no complexo *A. scabripinnis*).

Astyanax rivularis—. Casatti & Castro, 1999:232 (espécie válida no gênero *Astyanax*) —. Buckup in Reis et al., 2003:112 (lista de espécies) —. Bertaco & Lucena, 2006: 58 (citação como espécie válida no complexo *A. scabripinnis*) —. Ingenito & Duboc, 2014: 282 (citação no complexo *A. scabripinnis*) —. Pasa et al., 2019:307-314 (distribuição no alto rio São Francisco) —. Silva et al., 2020:6 (lista de espécies, ampliação da distribuição para o estado da Bahia, Brasil).

Psalidodon rivularis—. Terán, Benitez & Mirande, 2020:11 (transferência para *Psalidodon*) —. Rodrigues-Oliveira et al., 2022 (distribuição no alto e médio rio São Francisco) —. Quintela, Teixeira & Pompeu, 2023:6 (ictiofauna Lagoa Santa, estado de Minas Gerais, Brasil).

Diagnose. Das demais espécies de *Psalidodon*, *P. rivularis* difere de *P. alleni*, *P. argentum*, *P. balbus*, *P. bifasciatus*, *P. biotae*, *P. bockmanni*, *P. chico*, *P. correntinus*, *P. dissensus*, *P. dissimilis*, *P. eigenmanniorum*, *P. erythropterus*, *P. fasciatus*, *P. gymnodontus*, *P. gymnogenys*, *P. henseli*, *P. hermosus*, *P. ita*, *P. jequitinhonhae*, *P. marionae*, *P. minor*, *P. ojiara*, *P. parahybae*, *P. pelegri*, *P. powelli*, *P. puka*, *P. pynandi*, *P. rutilus*, *P. saguazu*, *P. schubarti*, *P. troya*, *P. vermilion* e *P. xiru* por possuir a cabeça robusta com o contorno do focinho até a vertical posterior a órbita com um formato horizontal de “U” em vista lateral (vs. cabeça comprimida com o contorno do focinho até a vertical posterior a órbita com um formato horizontal de “V”). Das demais, difere de *P. anisitsi* e *P. xavante* por possuir de 14 a 20 raios ramificados na nadadeira anal (vs. 21-25 em *P. anisitsi* e 23-26 em *P. xavante*), de *P. brachypterygium*, *P. cremnobates*, *P. endy*, *P. goyanensis*, *P. paranae*, *P. rioparanaibanus* e *P. varzeae* por possuir padrão de cromatóforos reticulado na região anterior do corpo abaixo da linha lateral (vs. padrão disperso), de *Psalidodon crenuchoides*, *P. hamatus*, *P. kalunga*, *P. leonidas*, *P. pampa*, *P. pessalii*, *P. togoi*, *P. tumbayaensis*, *P. uaiso* e *P. uberaba* por apresentar a linha lateral variável (vs. sempre incompleta em *P. crenuchoides*, *P. hamatus*, *P. kalunga*, *P. pessalii*, *P. togoi*, *P. uaiso* e *P. uberaba*; e sempre completa em *P. leonidas*, *P. pampa* e *P. tumbayaensis*), e de *P. laticeps*, *P. scabripinnis* e *P. serratus* por possuir mancha umeral alongada verticalmente (vs. mancha umeral alongada horizontalmente com um prolongamento vertical em sua porção anterior conferindo um formato em “p”).

Descrição. Dados morfométricos disponíveis na Tabela 6. Corpo comprimido, região de maior altura corporal entre a vertical situada na metade da nadadeira peitoral (em indivíduos com altura corporal em até 30.5% do comprimento padrão) e a vertical situada próxima a origem da nadadeira dorsal (em indivíduos com altura corporal em mais de 30.5% do

comprimento padrão). Perfil dorsal da cabeça ligeiramente convexo entre a ponta do lábio superior e a vertical anterior a narina; usualmente convexo, mas podendo ser reto ou ligeiramente côncavo deste ponto até o processo supraoccipital; convexo deste ponto até a base o último raio da nadadeira dorsal; ligeiramente convexo, podendo ser reto, da nadadeira dorsal à adiposa; ligeiramente côncavo entre a nadadeira adiposa e a base do primeiro raio superior da nadadeira caudal. Perfil ventral da ponta do focinho até a base da nadadeira pélvica convexo; entre a nadadeira pélvica e a base do primeiro raio da nadadeira anal continuamente convexo ou reto; base da nadadeira anal reta; e ligeiramente côncavo entre o último raio da nadadeira anal e a base do primeiro raio inferior da nadadeira caudal.

Boca terminal com mandíbula inferior se projetando ligeiramente à frente da mandíbula superior. Pré maxilar com duas séries de dentes, a externa com 3- 4 dentes tricuspidados e a interna com 4 a 5 dentes com 4 a 7 cúspides. Maxilar com 1 a 2 dentes pequenos tricuspidados ou pentacuspidados. Dentes decrescendo de forma abrupta no dentário, com 4 a 5 dentes grandes com 5 a 6 cúspides seguido de 4 a 9 dentes menores. Em todos os dentes a cúspide central é maior que as laterais. Extensão da maxila posterior à vertical situada na borda anterior da órbita.

Nadadeira dorsal com ii+9 raios, com primeiro raio não ramificado com metade do comprimento do segundo. Nadadeira peitoral com i+11-13 raios, com origem próxima à vertical situada na metade do osso do opérculo, quando adpressa ao corpo nunca alcança a nadadeira pélvica em indivíduos maiores. Nadadeira pélvica com i+6-7 raios, com origem anterior a vertical situada no último raio da nadadeira dorsal, quando adpressa ao corpo nunca alcança a nadadeira anal em indivíduos maiores. Nadadeira anal com iii-iv+14-20, machos maduros com numerosos e pequenos ganchos por raio na nadadeira anal. Nadadeira caudal bifurcada com i+17+i e lobos de tamanho semelhante. Nadadeira adiposa presente.

Escamas cicloides, *circuli* ausentes na borda posterior das escamas, 4-17 estrias sulcadas nas escamas, em geral em maior quantidade em indivíduos maiores. Linha lateral variável podendo ser completa, incompleta ou interrompida, série lateral com 37-39 escamas. Série de escamas transversais com 5 – 6 escamas acima da linha lateral e 4 – 5 abaixo. Série de escamas pré-dorsais com 11-13 escamas. Série de escamas ao redor do pedúnculo caudal com 14-15 escamas. Série de escamas na base da nadadeira anal com 7 – 9 escamas.



Figura 6: Espécimes de *P. rivularis*, lectótipo (A; disponível em: <https://collections.snm.ku.dk/en/object/NHMD1634879>, sob licença: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), rio Borrachudo (B), córrego Crico (C), córrego Lage (D), rio das Velhas (E) e encontro dos rios Mascates e Bocaina (F).

Tabela 6. Dados morfométricos de *Psalidodon rivularis* sensu stricto. N = número amostral, ND = nadadeira dorsal, NP = nadadeira peitoral, NV = nadadeira pélvica, NA = nadadeira anal, PC = pedúnculo caudal, MS = Maxila Superior, OOL = distância órbita-opercular, DP = desvio padrão.

	<i>T. rivularis</i> Lectótipo	<i>T. rivularis</i> Paralectótipos	Não tipos	Média	DP
	N = 1	N = 2	N = 49		
Comprimento Padrão	80.7	36.7 – 67.8	41 – 84	60.57	10.91
	% do comprimento padrão				
Distância pré-dorsal	47.08	51.66 – 52.39	46.14 – 51.86	49.29	1.57
Distância pré-peitoral	21.76	21.4 – 23.52	19.42 – 27.10	22.83	1.53
Distância pré-pélvica	44.26	42.28 – 47.78	43.28 – 50.23	46.43	1.85
Distância pré-anal	63.94	64.19 – 65.87	60.87 – 70.50	65.27	1.80
Altura Corporal	33.10	30.84 – 31.12	25.30 – 32.71	29.06	1.84
Altura do PC	11.49	9.95 – 11.48	9.32 – 14.72	11.85	0.92
Comprimento do PC	14.86	12.60 – 13.58	11.51 – 22.77	14.68	1.84
Comprimento da ND	103.31	101.39	68.71 – 120.25	89.90	11.20
Comprimento da NP	42.6	45.35	28.91 – 47.23	39.20	4.66
Comprimento da NV	20.84	20.73 – 22.86	16.17 – 25.28	20.27	2.95
Comprimento da NA	40.35	55.20	36.51 – 61.70	46.70	6.14
Comprimento da base da NA	22.63	22.83 – 23.85	16.44 – 24.17	21.37	1.81
Distância órbita - ND	35.51	36.38 – 37.35	32.74 – 37.82	35.05	1.53
Comprimento da cabeça	24.36	24.70 – 26.46	21.40 – 28.67	25.56	1.45
OOL	10.60	9.67 – 11.08	9.35 – 13.71	11.36	0.98
	% da altura corporal				
Altura da Cabeça	74.89	66.69 – 75.34	67.45 – 83.72	75.03	3.96

Altura do PC	34.72	32.27 – 36.89	34.06 – 52.60	40.92	3.99
% do comprimento da cabeça					
Diâmetro da órbita	28.04	28.99 – 33.91	25.24 – 39.24	31.97	2.82
Comprimento do focinho	30.21	23.83 – 31.88	16.69 – 30.21	23.72	3.21
Comprimento da MS	43.96	39.78 – 46.96	29.45 – 47.40	41.03	3.87
Distância interorbital	-	36.48	26.79 – 39.61	34.03	2.90

Cor em álcool. Região dorsal do corpo, cabeça e ponta do focinho castanho-escuro. Região lateral e ventral do corpo castanho-amarelado ou levemente prateado. Regiões infraorbitais e operculares prateadas, com uma mancha escura de cromatóforos no opérculo. Padrão reticulado de cromatóforos na região anterior do corpo abaixo da linha lateral, isto é, restrito a borda posterior das escamas. Padrão disperso de cromatóforos entre a linha lateral e a base da nadadeira anal. Mancha umeral conspícua se estendendo de 2-3 escamas acima da linha lateral e 1-2 escamas abaixo, com borda superior mais larga do que a borda inferior. Alguns exemplares possuem uma segunda mancha umeral difusa após a primeira, a ausência dessa mancha em outros pode ocorrer devido ao processo de preservação do espécime. Região anterior e posterior a primeira mancha umeral clara, com alguns espécimes apresentando um padrão reticulado de cromatóforos após a mancha. Faixa lateral indo desde a segunda mancha umeral até os raios medianos da nadadeira caudal, com tonalidade prateada na sua porção anterior e adquirindo uma tonalidade mais escura à medida que se aproxima do pedúnculo caudal, onde se alonga dorso-ventralmente formando uma mancha distinta na borda do pedúnculo caudal. Nadadeiras raiadas hialinas, em geral com poucos cromatóforos ao longo da borda dos raios. Nadadeira adiposa hialina com padrão disperso de cromatóforos.

Cor em vida. Região dorsal do corpo e cabeça escura, castanho-esverdeado no dorso e adquirindo uma tonalidade verde-oliva mais para os flancos. Região ao redor da linha lateral prateada adquirindo uma tonalidade branca no ventre. Nadadeiras pares esbranquiçadas. Nadadeira dorsal esbranquiçada ou amarelada. Nadadeira adiposa amarelada. Nadadeira anal esbranquiçada, podendo apresentar a borda próxima ao corpo amarelada com avermelhada. Nadadeira caudal com largas bordas avermelhadas e amareladas ao redor da faixa lateral escura.

Distribuição. *Psalidodon rivularis* sensu stricto pode ser encontrado nas bacias do Alto e Médio São Francisco, desde sua porção mais ao leste no rio Cipó e das Velhas até sua porção mais a oeste nos rios Abaeté e Paracatu. Dentre os demais rios que esta espécie se encontra, podemos destacar as sub-bacias dos rios Indaiá, Borrachudo e afluentes menores que drenam diretamente para o rio São Francisco (Figura 1).

Dimorfismo sexual. Machos em fase reprodutiva com ganchos nas nadadeiras anal e pélvica, do último raio não ramificado até o 15º raio ramificado da nadadeira anal e do 3º ao 5º raio ramificado na pélvica.

Comentários. Após constatar a existência de duas espécies diferentes identificadas como “*Tetragonopterus*” *rivularis* na série tipo analisado por Lütken (1875), ou *Psalidodon* / “*Astyanax*” *rivularis* em outras coleções ictiológicas (como a coleção ictiológica do LaGEEvo UFV CRP), definimos como *Psalidodon rivularis* sensu stricto todos os exemplares pertencentes ao mesmo morfotipo do lectótipo de *Tetragonopterus rivularis* (NHMD1634879), cuja fotografia e radiografia estão disponibilizadas no site das coleções do Museu de História Natural da Dinamarca (<https://collections.snm.ku.dk/en>), e a figura 13 da prancha V da obra Velhas-Flodens Fiske de Lütken (1875).

Essa mudança impacta na descrição morfológica da espécie, reduzindo sua variabilidade. Dentre as características afetadas, podemos citar principalmente o número de escamas ao longo da linha lateral e proporções morfométricas, em especial a altura corporal. Lütken (1875) descreve *Tetragonopterus rivularis* como tendo de 33-38 escamas ao longo da linha lateral, outros trabalhos ampliam a variabilidade desta característica para 32-40 escamas ao longo da linha lateral (Triques, 2006; Pasa et al., 2019). Aqui definimos *Psalidodon rivularis* sensu strictu como possuindo de 37 – 39 escamas ao longo da linha lateral. Da mesma forma, a partir das anotações de Lütken (1875) é possível inferir que os espécimes por ele analisados apresentavam a altura corporal em 31.58% e 37.50% do comprimento padrão. Outros trabalhos ampliam essa condição em *Psalidodon rivularis* para 22.06% - 46.00% (Bertaco & Lucena, 2006; Pasa et al., 2019). Aqui definimos *Psalidodon rivularis* como indivíduos proporcionalmente mais baixos, com altura corporal contida entre 23.61 e 33.33% do comprimento padrão.

Material Examinado. 154 espécimes (4 a partir de fotografias), todos do estado de Minas Gerais, Brasil. **Tipos: Bacia do rio São Francisco. Sub-bacia do rio das Velhas:** ZMUC P241289 (fotografia), lectótipo de *Tetragonopterus rivularis*, 1 espécime, comprimento padrão: 80.7mm, município de Lagoa Santa - MG, J. T. Reinhardt, 1847-1870. USNM 44960 (fotografia), paralectótipos de *Tetragonopterus rivularis*, 2 espécimes, comprimento padrão: 36.6mm - 67.8mm, município de Lagoa Santa – MG, J. T. Reinhardt, 1847-1870. **Não Tipos. Bacia do rio São Francisco. Sub-bacia do rio Abaeté:** LaGEEvo-30, 12 espécimes, comprimento padrão: 45mm – 63.5mm, município de Arapuá – MG, córrego Lage, 19°1’25.18” S 46°6’18.74” O, I.H.R. Oliveira, P. M. de Assis, T. da S. Ramos, 05/11/2022. LaGEEvo-41, 17 de 31 espécimes, comprimento padrão: 48mm – 79.5mm, município de Arapuá – MG, córrego Lage, 19°1’25.18” S 46°6’18.74” O, P. Penteado, D. Reis, Denis, Paloma, Wanessa, 23/07/2010. LaGEEvo-56, 14 de 18 espécimes, comprimento padrão: 48mm – 69mm,

município de Tiros – MG, córrego Tiros, 18°56'34.08" S 45°56'18.20" O, P. Penteado, Denis, Gabriel, Rafael, 20/07/2010. LaGEEvo-74, 11 espécimes, comprimento padrão: 42mm – 91mm, município de São Gotardo – MG, córrego Confusão, 19°20'21.89" S 46° 6'21.38" O, I. H. R. Oliveira, P. M. de Assis, W. Cléber, 11/11/2024. LaGEEvo-75, 4 espécimes, comprimento padrão: 56mm – 87.5mm, município de Tiros – MG, córrego da Espinha, 19° 2'47.18" S 46° 1'12.93" O, Campos, M. A. da Silva, S. V. Resende, R. Pasa, 24/07/2016. **Sub-bacia do rio das Velhas:** MCZ 20874 (fotografia), 1 de 3 espécimes, comprimento padrão: 67.61mm, Lagoa Santa – MG, 19°27'26" S 44°14'30" O, G. Sceva & Thayer Expedition, julho 1865. LaGEEvo-33, 3 espécimes, comprimento padrão: 55.5mm – 69.5mm, município de Ouro Preto – MG, rio das Velhas, 20°20'38.4" S 43°29'58.4" O, I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, P. M. de Assis, L. G. P. Pimentel, R. Pasa, 15/09/2023. **Sub-bacia do rio Borrachudo:** LaGEEvo-34, 3 espécimes, comprimento padrão: 53mm – 69mm, município de Matutina – MG, rio Borrachudo, 19°13'02.6" S 45°55'58.2" O, I.H.R. Oliveira, P. M. de Assis, R. A. S. Soares, R. Pasa, 08/03/2023. LaGEEvo-40, 12 de 15 espécimes, comprimento padrão: 64mm – 86mm, município de Tiros – MG, córrego Bonito, 18°48'44.7" S 45°45'52.2" O, P. Penteado, Denis, Gabriel, Rafael, 20/07/2010. **Sub-bacia do rio Indaiá:** LaGEEvo-36, 4 espécimes, comprimento padrão: 41mm – 46mm, município de São Gotardo – MG, rio Funchal, 19°24'9.54" S 46°0'4.61" O, I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, P. M. de Assis, L. G. P. Pimentel, 02/12/2023. LaGEEvo-37, 2 espécimes, comprimento padrão: 47mm – 56mm, município de São Gotardo – MG, rio Funchal, 19°24'9.54" S 46°0'4.61" O, I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, L. Fainé, J. Godoy, 04/05/2019. LaGEEvo-59, 3 espécimes, comprimento padrão: 50mm – 65mm, município de São Gotardo – MG, rio Funchal, 19°24'9.54" S 46°0'4.61" O, I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, G. Bork, L. Fernandes, V. Augusto, 12/05/2018. **Sub-bacia do rio Paracatu:** LaGEEvo-43, 9 espécimes, comprimento padrão: 37mm – 63mm, município de Presidente Olegário – MG, córrego Crico, 18°18'44.36" S 46° 5'44.46" O, I. B. da Silva, M. L. C. B. de Campos, V. Augusto, S. V. Resende, 06/04/2019. **Sub-bacia do rio Cipó:** LaGEEvo-44, 4 espécimes, comprimento padrão: 43mm – 52mm, Parque Nacional Serra do Cipó – MG, cânion das Bandeirinhas, 19°25'8.33" S 43°34'12.37" O, M. L. C. B. de Campos, R. R. Rocha, S. V. Resende, F. Sassi, outubro 2017. LaGEEvo-46, 9 espécimes, comprimento padrão: 42mm – 59mm, Parque Nacional Serra do Cipó – MG, ribeirão das Bandeirinhas, 19°24'32.65" S 43°34'35.31" O, M. L. C. B. de Campos, R. R. Rocha, S. V. Resende, F. Sassi, outubro 2017. LaGEEvo-48, 23 espécimes, comprimento padrão: 47mm – 84mm, Parque Nacional Serra do Cipó – MG, encontro dos rios Mascates e Bocaina, 19°20'49.68" S 43°36'20.42" O, I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, P. M. de Assis, L. G. P. Pimentel, R. A. S. Soares, G. F. da Fonseca, G.

F. Matos, V. G. de Miranda, B. Alonso, 09/10/2023. LaGEEvo-60, 11 espécimes, comprimento padrão: 64mm – 99mm, Parque Nacional Serra do Cipó – MG, trilha da cachoeira da Farofa, 19°23'6.52" S 43°35'12.28" O, I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, P. M. de Assis, L. G. P. Pimentel, R. A. S. Soares, G. F. da Fonseca, G. F. Matos, V. G. de Miranda, B. Alonso, 10/10/2023. **Rio São Francisco:** LaGEEvo-63, 4 espécimes, comprimento padrão: 50mm - 81mm, Três Marias – MG, rio Vereda Grande, 18°19'18.62" S 45° 6'32.80" O, R. de M. Alves; R. R. Rocha; M. A. da Silva; S. V. Resende, 18/04/2017. LaGEEvo-64, 5 espécimes, comprimento padrão: 50mm - 81mm, Três Marias – MG, rio Vereda Grande, 18°19'18.62" S 45° 6'32.80" O, 2010-2012.

New combinations: *Psolidodon santae* (Eigenmann, 1907), comb. nov.

(Figuras 7A – 7D, Tabela 7)

Tetragonopterus rivularis Lütken, 1875: 107-109, prancha V, fig. 14 (em parte; paralectótipos: ZMUC, MNHN 0000-9582, NMW 57707, SMNS 2046, ZMB 9199, localidade tipo: rio das Velhas e seus Afluentes, estado de Minas Gerais, Brasil).

Hemigrammus santae Eigenmann 1907: 16-17, (sintipos: USNM 55652, localidade tipo: município de Lagoa Santa, estado de Minas Gerais, Brasil) —. Vari & Howe 1991:25 (catálogo de espécies do National Museum of Natural History, Smithsonian Institution).

Hyphessobrycon santae —. Eigenmann, 1910: 437 (Transferência para o gênero *Hyphessobrycon*) —. Lima & Malabarba in Reis et al. 2003:140 (lista de espécies) —. Silva et al. 2020:6 (lista de espécies, ampliação da distribuição para o estado da Bahia, Brasil).

Astyanax turmalinensis Triques, Vono & Caiafa 2003: 145–150, fig. 1 (Holótipo: DZUFMG: 005; Parátipos: DZUFMG: 006-009, localidade-tipo: córrego Divisão, afluyente da margem direita do rio Jequitinhonha, vila do Peixe Crú, município de Turmalina, estado Minas gerais, Brasil, 17°07' S 42°57' W.) —. Zanata & Camelier, 2008: 37 (inclusão no complexo *A. scabripinnis*) —. Triques & Queiroz, 2010: 400–401, fig. 1 (ampliação da distribuição para as bacias do rio São Francisco e rio Doce) —. Ingenito & Duboc, 2014: 282 (citação no complexo *A. scabripinnis*) —. Vieira-Guimarães, Martins-Pinheiro & Sarmiento-Soares 2024:37 (lista de espécies). [nova sinonímia].

Diagnose. Das demais espécies de *Psalidodon*, *P. santae* difere de *P. allenii*, *P. argentum*, *P. balbus*, *P. bifasciatus*, *P. biotae*, *P. bockmanni*, *P. chico*, *P. correntinus*, *P. dissensus*, *P. dissimilis*, *P. eigenmanniorum*, *P. erythropterus*, *P. fasciatus*, *P. gymnodontus*, *P. gymnogenys*, *P. henseli*, *P. hermosus*, *P. ita*, *P. jequitinhonhae*, *P. marionae*, *P. minor*, *P. ojiara*, *P. parahybae*, *P. pelegriini*, *P. powelli*, *P. puka*, *P. pynandi*, *P. rutilus*, *P. saguazu*, *P. schubarti*, *P. troya*, *P. vermilion* e *P. xiru* por possuir a cabeça robusta com o contorno do focinho até a vertical posterior a órbita com um formato horizontal de “U” em vista lateral (vs. cabeça comprimida com o contorno do focinho até a vertical posterior a órbita com um formato horizontal de “V”). Das demais, difere de *P. anisitsi*, *P. crenuchoides* e de *P. xavante* por possuir de 15–21 raios ramificados na nadadeira anal (vs. 21–25 em *P. anisitsi*, 11–14 em *P. crenuchoides* e 23–26 em *P. xavante*), de *P. hamatus*, *P. kalunga*, *P. leonidas*, *P. pampa*, *P. pessalii*, *P. togoi*, *P. tumbayaensis*, *P. uaiso* e *P. uberaba* por apresentar a linha lateral variável (vs. sempre incompleta em *P. hamatus*, *P. kalunga*, *P. pessalii*, *P. togoi*, *P. uaiso* e *P. uberaba*; e sempre completa em *P. leonidas*, *P. pampa* e *P. tumbayaensis*), de *P. brachypterygium*, *P. cremnobates*, *P. endy*, *P. goyanensis*, *P. paranae*, *P. rioparanaibanus* e *P. varzeae* por possuir padrão de cromatóforos reticulado na região anterior do corpo abaixo da linha lateral (vs. padrão disperso), de *P. laticeps*, *P. scabripinnis*, *P. serratus* e *P. togoi* por possuir mancha umeral alongada verticalmente (vs. mancha umeral alongada horizontalmente com um prolongamento vertical em sua porção anterior conferindo um formato em “p”) e de *P. rivularis* por apresentar 33–36 escamas na série lateral e $2n=50$ cromossomos (vs. 37–39 e $2n=46$ cromossomos).

Descrição. Dados morfométricos disponíveis na Tabela 7. Corpo comprimido, região de maior altura corporal situada na vertical próxima a origem da nadadeira pélvica, podendo ser mais próxima a ponta ou a metade da nadadeira peitoral em indivíduos com altura corporal menor do que 30.5% do comprimento padrão. Perfil dorsal da cabeça ligeiramente convexo entre a ponta do lábio superior e a vertical anterior a narina; levemente convexo deste ponto até a vertical situada próxima a metade do olho, e então reto ou ligeiramente côncavo deste ponto até o processo supraoccipital. Perfil convexo do processo supraoccipital até a base o último raio da nadadeira dorsal; ligeiramente convexo da nadadeira dorsal a adiposa, e ligeiramente côncavo entre a nadadeira adiposa e a base do primeiro raio superior da nadadeira caudal. Perfil ventral da ponta do focinho até a base da nadadeira pélvica convexo; entre a nadadeira pélvica e a base do primeiro raio da nadadeira anal continuamente convexo ou reto; base da nadadeira anal reta; e ligeiramente côncavo entre a nadadeira adiposa e a base do primeiro raio inferior da nadadeira caudal.

Boca terminal com mandíbula inferior se projetando ligeiramente à frente da mandíbula superior. Pré-maxilar com duas séries de dentes, a externa com 3-5 dentes tricuspidados e a interna com 4 a 5 dentes com 3 a 7 cúspides. Maxilar com 1 a 3 dentes pequenos tricuspidados ou pentacuspidados. Dentes decrescendo de forma abrupta no dentário, com 4 a 5 dentes grandes com 4 a 5 cúspides seguido de 3 a 8 dentes menores. Em todos os dentes a cúspide central é maior que as laterais. Extensão da maxila posterior à vertical situada na borda anterior da órbita.

Nadadeira dorsal com ii+9 raios, com primeiro raio não ramificado com metade do comprimento do segundo. Nadadeira peitoral com i+11-13 raios, com origem próxima à vertical situada na metade do osso do opérculo, quando adpressa ao corpo nunca alcança a nadadeira pélvica em indivíduos maiores. Nadadeira pélvica com i+6-7 raios, com origem anterior a vertical situada no último raio da nadadeira dorsal, quando adpressa ao corpo nunca alcança a nadadeira anal em indivíduos maiores. Nadadeira anal com iii-iv+15-21, machos maduros com numerosos e pequenos ganchos por raio na nadadeira anal. Nadadeira caudal bifurcada com i+17+i e lobos de tamanho semelhante. Nadadeira adiposa presente.

Escamas cicloides, *circuli* ausente na borda posterior das escamas, 4-17 estrias sulcadas nas escamas, em geral em maior quantidade em indivíduos maiores. Linha lateral variável podendo ser completa, incompleta ou interrompida, série lateral com 33-36 escamas. Série de escamas transversais com 5 – 6 escamas acima da linha lateral e 4 – 5 abaixo. Série de escamas pré-dorsais com 10-13 escamas. Série de escamas ao redor do pedúnculo caudal com 13 - 15 escamas. Série de escamas na base da nadadeira anal com 3 – 8 escamas.

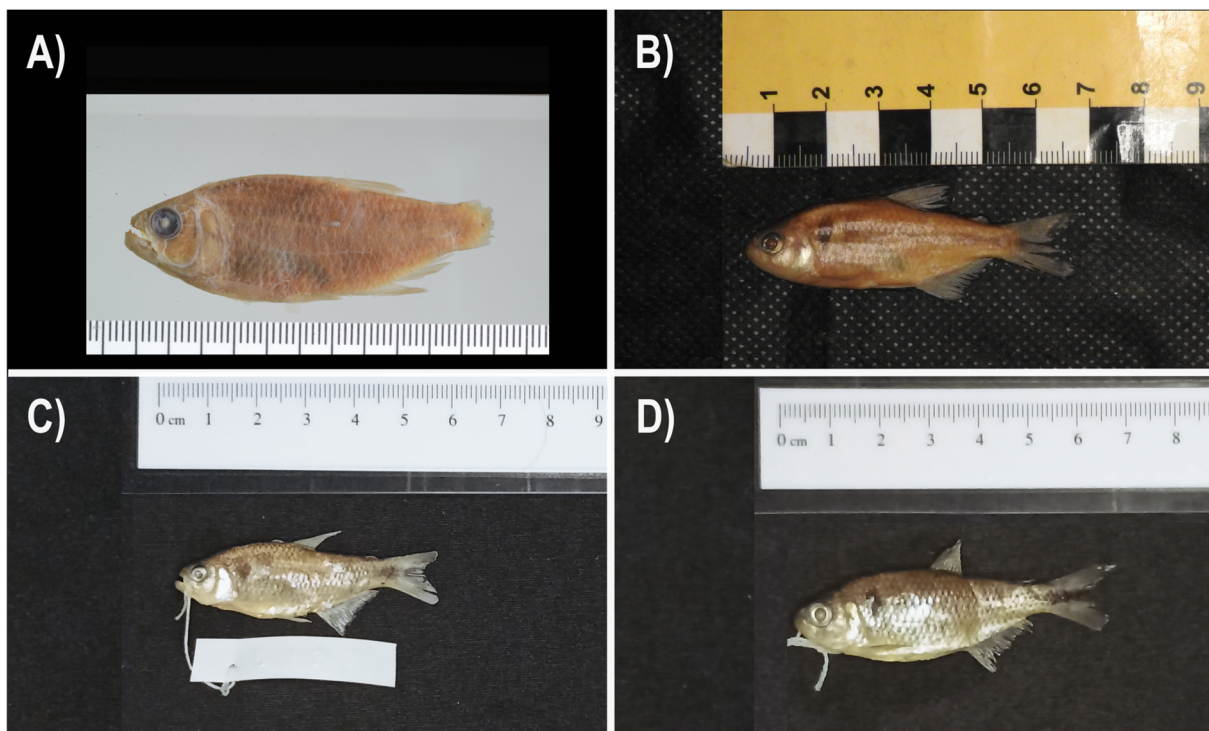


Figura 7: Espécimes de *P. santae*, sintipo (A, fornecida pelo prof. Carlos Alexandre Miranda Oliveira), holótipo de “*A. turmalinensis*” – afluente do rio Jequitinhonha (B), nascente do rio das Velhas (C) e encontro dos rios Mascates e Bocaina (D).

Cor em álcool. Região dorsal do corpo, cabeça e ponta do focinho castanho-escuro. Região lateral do corpo castanho-amarelado ou levemente prateado em sua porção anterior. Região ventral do corpo castanho-amarelado podendo apresentar reflexos alaranjados ou avermelhados. Regiões infraorbitais e operculares prateadas, com uma mancha escura de cromatóforos no opérculo, podendo ser mais discreta em alguns indivíduos. Padrão reticulado de cromatóforos (restrito a borda posterior das escamas) na região anterior do corpo abaixo da linha lateral. Padrão disperso de cromatóforos entre a linha lateral e a base da nadadeira anal. Mancha umeral conspicua se estendendo de 2-3 escamas acima da linha lateral e 1-2 escamas abaixo, com borda superior mais larga do que a borda inferior. Em geral, apresentam uma área clara após a mancha umeral com padrão reticulado de cromatóforos, seguida por uma segunda mancha umeral difusa. Em poucos indivíduos foi notada a ausência desta mancha, o que pode ocorrer devido ao processo de preservação do espécime. Faixa lateral indo desde a segunda mancha umeral até os raios medianos da nadadeira caudal, com tonalidade prateada na sua porção anterior e adquirindo uma tonalidade mais escura à medida que se aproxima do pedúnculo caudal, onde se alonga dorso-ventralmente formando uma mancha distinta na borda do pedúnculo caudal. Nadadeiras raiadas hialinas, em geral com poucos cromatóforos ao longo da borda dos raios. Nadadeira adiposa hialina com padrão disperso de cromatóforos.

Tabela 7. Dados morfométricos de *Psalidodon santae* comb. nov. N = número amostral, ND = nadadeira dorsal, NP = nadadeira peitoral, NV = nadadeira pélvica, NA = nadadeira anal, PC = pedúnculo caudal, MS = Maxila Superior, OOL = distância órbita-opercular, DP = desvio padrão.

	<i>H. santae</i> sintipos	<i>“A. turmalinensis”</i> tipos	Não tipos	Média	DP
	N = 2	N = 20	N = 19		
Comprimento Padrão	32.5 – 54.1	30 – 54.9	35.71 – 70.1	45.20	7.94
	% do comprimento padrão				
Distância pré-dorsal	53.72 – 55.00	49.38 – 53.29	48.98 – 54.15	51.42	1.44
Distância pré-peitoral	24.82 – 24.97	18.10 – 27.73	18.85 – 27.77	23.62	2.09
Distância pré-pélvica	47.70 – 50.34	44.74 – 48.79	43.34 – 50.34	47.15	1.80
Distância pré-anal	63.59 – 63.78	61.07 – 65.49	60.83 – 68.76	63.67	1.76
Altura Corporal	33.75 – 35.47	32.22 – 38.48	30.52 – 38.33	34.72	1.68
Altura do PC	12.42 – 12.50	12.19 – 15.46	9.86 – 14.13	13.03	1.03
Comprimento do PC	11.70 – 13.55	11.28 – 14.16	9.38 – 16.25	13.48	1.42
Comprimento da ND	88.95 – 89.14	86.35 – 137.78	77.14 – 119.67	99.48	12.36
Comprimento da NP	38.39	41.04 – 44.63	36.93 – 51.74	42.81	3.45
Comprimento da NV	18.75 – 20.49	21.33 – 27.74	21.39 – 27.71	24.67	2.45
Comprimento da NA	60.67 – 60.79	42.86 – 60.87	39.12 – 63.63	49.82	6.50
Comprimento da base da NA	23.74 – 26.84	23.86 – 28.45	20.40 – 26.45	24.83	1.91
Distância órbita - ND	37.94 – 39.46	33.27 – 38.73	33.99 – 39.22	36.56	1.60
Comprimento da cabeça	26.95 – 28.15	24.77 – 28.84	23.05 – 30.11	26.63	1.46
OOL	11.41 – 12.36	9.94 – 14.57	10.67 – 14.04	11.86	0.95
	% da altura corporal				
Altura da Cabeça	71.75 – 73.00	65.14 – 78.79	61.95 – 77.79	70.94	4.05

Altura do PC	35.02 – 37.05	34.35 – 46.14	29.39 – 41.35	37.58	3.11
% do comprimento da cabeça					
Diâmetro da órbita	29.52 – 32.98	29.57 – 39.06	24.37 – 35.41	33.12	3.27
Comprimento do focinho	24.69 – 26.55	15.60 – 24.63	18.42 – 27.34	22.17	2.53
Comprimento da MS	45.40 – 48.13	30.26 – 43.72	32.52 – 43.96	38.14	3.97
Distância interorbital	32.42 – 34.02	31.91 – 43.35	30.92 – 38.56	35.97	3.04

Cor em vida. Região dorsal do corpo e cabeça escura, castanho-esverdeado no dorso e adquirindo uma tonalidade verde-oliva mais para os flancos. Região ao redor da linha lateral prateada adquirindo uma tonalidade branca ou amarelada no ventre. Nadadeiras peitorais variando de uma tonalidade levemente amarelada a alaranjadas. Nadadeiras pélvicas variando de uma tonalidade amarelada a fortemente avermelhadas. Nadadeira dorsal amarelo-esverdeada adquirindo uma tonalidade avermelhada mais para o topo. Nadadeira adiposa amarelada ou alaranjada. Nadadeira anal avermelhada em sua maior porção próxima ao corpo, perdendo a cor à medida que se afasta. Nadadeira caudal com largas bordas avermelhadas e amareladas ao redor da faixa lateral escura.

Distribuição. *Psalidodon santae* comb. nov. pode ser encontrado ao leste do rio São Francisco nas bacias do Alto São Francisco, Jequitinhonha e Doce, e possivelmente no Médio São Francisco. Nos ambientes do leste da bacia do Alto rio São Francisco, observamos que *P. santae* é simpátrica a *P. rivularis* em pelo menos duas localidades: nascente do rio das Velhas em Ouro Preto – MG, e nos diferentes afluentes do rio Cipó no Parque Nacional Serra do Cipó (Figura 1).

Dimorfismo sexual. Machos em fase reprodutiva com ganchos nas nadadeiras anal e pélvica, do último raio não ramificado até o 15º raio ramificado da nadadeira anal e do 3º ao 5º raio ramificado da nadadeira pélvica.

Comentários. *Hemigrammus santae* Eigenmann, 1907 foi descrito por Eigenmann com base em um lote contendo quatro síntipos de *Tetragonopterus rivularis* Lütken, 1875 (USNM 44960). Os exemplares continham duas variedades de “*T.*” *rivularis* com dois espécimes cada, diferenciados por apresentarem a linha lateral completa ou interrompida (Eigenmann, 1907). Destes, Eigenmann descreveu a nova espécie com base na variedade com linha lateral interrompida (*Tetragonopterus rivularis* var. *interrupta* Lütken 1875), atribuindo aos espécimes o tombo USNM 55652.

Anos depois o próprio Eigenmann transferiu a espécie para o gênero *Hyphessobrycon*, utilizando como diagnose entre os dois gêneros a nadadeira caudal nua em *Hyphessobrycon* (Eigenmann, 1910). Eigenmann, no entanto, não considerou um aspecto importante ao propor a espécie: Lütken (1875) havia pontuado em sua obra que não considerava a interrupção na linha lateral uma característica válida para nomear uma nova espécie, uma vez que em muitos casos essa característica estava em desacordo nos dois lados do corpo do mesmo espécime de “*T.*” *rivularis*. Esse equívoco se perpetuou em trabalhos posteriores, como no manual de

identificação de peixes da região de Três Marias (Britski et al., 1988), onde na chave de identificação para peixes da bacia do rio São Francisco a característica linha lateral incompleta leva aos gêneros *Hemigrammus* e *Hyphessobrycon*, e a linha lateral completa ao gênero *Astyanax*, que a época incluía *P. rivularis*.

Apesar de considerar *P. santae* Eigenmann, 1907 como uma espécie válida, destacamos que não é a linha lateral que a distingue de *P. rivularis* Lütken 1875, uma vez que mesmo na série tipo temos exemplares que pertencem a *P. rivularis* sensu strictu e possuem a linha lateral interrompida. Cabe destacar que nos últimos anos, várias espécies de *Hyphessobrycon* foram transferidas para o gênero *Psalidodon*, ampliando o número de espécies do grupo que apresentam exemplares com linha lateral interrompida (Melo et al., 2024; Terán et al., 2020).

A análise dos tipos de *Astyanax turmalinensis* Triques, Vono & Caiafa, 2003, demonstra que esta corresponde a mesma espécie de *P. santae* Eigenmann, 1907. Devido a pertencerem a gêneros diferentes, Triques et al. (2003) e Triques & Queiroz (2010) não forneceram diagnoses entre essas espécies. Assim, consideramos que a sobreposição de caracteres merísticos, morfométricos e distribuição espacial justifica a sinonímia de ambas.

Em relação a diagnose morfológica de *P. santae* Eigenmann, 1907 e *P. rivularis* Lütken, 1875 elencamos como principais características o número menor de escamas ao longo da linha lateral em *P. santae* (33-36 vs. 37-39) e o maior número de cromossomos ($2n=50 + 0-1Bs$ vs. $2n=46 + 0-2Bs$). Outras diferenças entre estas espécies incluem a coloração e características morfométricas do corpo, tal como notado por Eigenmann (Eigenmann, 1907), com *P. santae* apresentando corpo mais escuro e nadadeiras mais coloridas e, em geral, um corpo mais alto, com a altura entre 28.26% a 40.20% (provavelmente mais) do comprimento padrão. Outras características apontadas por Triques & Queiroz (2010) na diagnose de *A. turmalinensis* e “*Astyanax*” *rivularis* também podem ser utilizadas, embora com cautela: a origem da nadadeira peitoral é, em geral, anterior em *P. rivularis*, situando-se na vertical próxima a metade do osso do opérculo nesta espécie e após o fim do opérculo em *P. santae*; a região de maior altura corporal é, em geral, mais deslocada em direção vertical situada na origem da nadadeira pélvica em *P. santae* e a vertical situada no meio da nadadeira peitoral em *P. rivularis*, embora essa característica possa inverter nos dois táxons em espécimes relativamente mais altos de *P. rivularis* (altura do corpo > 30.5% do comprimento padrão) e relativamente baixos de *P. santae* (altura do corpo < 30.5% do comprimento padrão); o padrão de cromatóforos após a primeira mancha umeral é, em geral, reticulado (cromatóforos restritos a borda posterior das escamas) em *P. santae* e disperso em *P. rivularis*. Triques & Queiroz (2010) também pontuaram a

existência de duas manchas umerais em *P. santae* vs. uma em *P. rivularis*. Aqui destacamos que, na verdade, observamos exemplares com duas manchas em ambas as espécies, e a ausência da segunda mancha muitas vezes se deve a esta ser menos nítida, e se perder no processo de preservação, embora, vale mencionar que em espécimes vivos ou recém fixados fica evidente que a segunda mancha tende a ser mais nítida em *P. santae*.

Material Examinado. 74 espécimes (4 a partir de fotografias), todos do estado de Minas Gerais, Brasil. **Tipos: Bacia do rio São Francisco. Sub-bacia do rio das Velhas:** ZMUC P241372 (fotografia), paralectótipo de *Tetragonopterus rivularis*, 1 espécime, comprimento padrão: 70.1mm, município de Lagoa Santa - MG, J. T. Reinhardt, 1847-1870. ZMUC P241376 (fotografia), paralectótipo de *Tetragonopterus rivularis*, 1 espécime, comprimento padrão: 35.7mm, município de Lagoa Santa - MG, J. T. Reinhardt, 1847-1870. USNM 55652 (fotografia), sítipos de *Hemigrammus santae*, 2 espécimes, comprimento padrão: 32.5mm – 54.1mm, município de Lagoa Santa – MG, J. T. Reinhardt, 1847-1870. **Bacia do rio Jequitinhonha:** DZUFMG 005, holótipo de *Astyanax turmalinensis*, 1 espécime, comprimento padrão 48.2mm, município de Turmalina – MG, vila do Peixe-Crú, córrego Divisão, tributário da margem direita do rio Jequitinhonha, 17°07' S 42°57' O, V. Vono, maio 1989. DZUFMG 009, parátipos de *Astyanax turmalinensis*, 19 de 25 espécimes, comprimento padrão 33.5mm – 54.9mm, município de Turmalina – MG, vila do Peixe-Crú, córrego Divisão, tributário da margem direita do rio Jequitinhonha, 17°07' S 42°57' O, V. Vono, agosto 1989. **Não Tipos. Bacia do rio São Francisco. Sub-bacia do rio das Velhas:** LaGEEvo-32, 22 espécimes, comprimento padrão: 31mm – 49mm, município de Ouro Preto – MG, rio das Velhas, 20°20'38.4" S 43°29'58.4" W, I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, P. M. de Assis, L. G. P. Pimentel, R. Pasa, 15/09/2023. **Sub-bacia do rio Cipó:** LaGEEvo-45, 9 espécimes, comprimento padrão: 43mm – 53mm, Parque Nacional Serra do Cipó – MG, cânion das Bandeirinhas, 19°25'8.33" S 43°34'12.37" O, M. L. C. B. de Campos, R. R. Rocha, S. V. Resende, F. Sassi, outubro 2017. LaGEEvo-47, 6 espécimes, comprimento padrão: 42mm – 49mm, Parque Nacional Serra do Cipó – MG, ribeirão das Bandeirinhas, 19°24'32.65" S 43°34'35.31" O, M. L. C. B. de Campos, R. R. Rocha, S. V. Resende, F. Sassi, outubro 2017. LaGEEvo-49, 8 espécimes, comprimento padrão: 41mm – 59.5mm, Parque Nacional Serra do Cipó – MG, encontro dos rios Mascates e Bocaina, 19°20'49.68" S 43°36'20.42" O, I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, P. M. de Assis, L. G. P. Pimentel, R. A. S. Soares, G. F. da Fonseca, G. F. Matos, V. G. de Miranda, B. Alonso, 09/10/2023. LaGEEvo-58, 4 espécimes, comprimento padrão: 56mm – 72mm, cânion das Bandeirinhas, 19°25'8.33" S 43°34'12.37" O, I.H.R.

Oliveira, I. B. da Silva, P. M. de Assis, L. G. P. Pimentel, R. A. S. Soares, G. F. da Fonseca, G. F. Matos, V. G. de Miranda, B. Alonso, 11/10/2023. LaGEEvo-62, 1 espécime, comprimento padrão: 63mm, Parque Nacional Serra do Cipó – MG, trilha da cachoeira da Farofa, 19°23'6.52" S 43°35'12.28" O, I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, P. M. de Assis, L. G. P. Pimentel, R. A. S. Soares, G. F. da Fonseca, G. F. Matos, V. G. de Miranda, B. Alonso, 10/10/2023.

Provável nova espécie: *Psalidodon* aff. *santae* m2

(Figuras 8A – 8B, Tabela 8)

Diagnose. A diagnose de *Psalidodon* aff. *santae* m2 é a mesma de *P. santae*. Não encontramos nenhuma característica discreta que diferenciem estas duas OTUs, entretanto, ambas podem ser diferenciadas por características morfométricas sobrepostas, porém estatisticamente diferentes: distância órbita opercular (8.60% – 12.71%, média de 10.14% em *P. aff. santae* m2 vs. 9.94% – 14.57%, média 11.86% em *P. santae*) e comprimento da cabeça (23.05% - 30.11%, média de 26.63% em *P. aff. santae* m2 vs. 21.60% - 26.19%, média de 24.17% em *P. santae*).

Descrição. Dados morfométricos disponíveis na Tabela 8. Em geral, para as características que foram possíveis de analisar neste trabalho, a descrição desta OTU é a mesma de *P. santae*, porém com uma menor variabilidade associada ao número de raios ramificados na nadadeira anal (19 – 21 vs. 15 – 21 em *P. santae*) e na altura corporal (31.33% - 38.68% vs. 28.26% - 39.5% em *P. santae*), com quase todos os exemplares apresentando a região de maior altura corporal próxima a origem da nadadeira dorsal.

Distribuição. *P. aff. santae* m2 foi coletada em apenas dois locais, córrego Lage e rio Funchal, afluentes dos rios Abaeté e Indaiá, respectivamente. Sendo assim, essa OTU é endêmica na porção oeste do Alto rio São Francisco, sendo simpátrica a *P. rivularis* em ambos os locais (Figura 1).

Comentários. *P. aff. santae* m2 é extremamente aparentada a sua contraparte do leste do Alto rio São Francisco, tanto pelo ponto de vista morfológico quando cariotípico, apresentando 2n=50 cromossomos, com o mesmo número de cromossomos metacêntricos e subtelocêntricos do que *P. santae* (8 cromossomos para ambas as morfologias). Em relação ao número de cromossomos submetacêntricos e acrocêntricos, a variação observada entre os exemplares nos dois locais amostrados é inclusive maior do que entre eles e *P. santae*: 24

submetacêntricos e 10 acrocêntricos para os exemplares do córrego Lage, 20 submetacêntricos e 14 acrocêntricos para o rio Funchal; e 22 submetacêntricos e 12 acrocêntricos para *P. santae* do encontro dos rios Mascates e Bocaina, afluentes do rio Cipó (Figura 3).

Desta forma, o principal argumento para se propor esta OTU como uma possível nova espécie é a ausência de monofila entre esses exemplares e suas contrapartes do leste do rio São Francisco em qualquer uma das reconstruções filogenéticas realizadas (Figura 4). Finalmente, destaco aqui que os exemplares desta OTU tendem a ter uma região craniana comparativamente menor do que *P. santae*, fato que se reflete em nossa análise de *Random Forest*, com a maior parte dos espécimes sendo classificados corretamente de acordo com a distância órbita-opercular (Figura 5).

Material Examinado. 33 espécimes, todos do estado de Minas Gerais, Brasil. **Bacia do rio São Francisco. Sub-bacia do rio Abaeté:** LaGEEvo-31, 23 espécimes, comprimento padrão: 38mm – 54mm, município de Arapuá – MG, córrego Lage, 19°1'25.18" S 46°6'18.74" O, I.H.R. Oliveira, P. M. de Assis, T. da S. Ramos, 05/11/2022. LaGEEvo-42, 3 de 10 espécimes, comprimento padrão: 42mm – 49mm, município de Arapuá – MG, córrego Lage, 19°1'25.18" S 46°6'18.74" O, P. Penteado, D. Reis, Denis, Paloma, Wanessa, 23/07/2010. **Sub-bacia do rio Indaiá:** LaGEEvo-36, 6 espécimes, comprimento padrão: 35mm – 54mm, município de São Gotardo – MG, rio Funchal, 19°24'9.54" S 46°0'4.61" O, I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, P. M. de Assis, L. G. P. Pimentel, 02/12/2023. LaGEEvo-38, 1 espécime, comprimento padrão: 59mm, município de São Gotardo – MG, rio Funchal, 19°24'9.54" S 46°0'4.61" O, I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, L. Fainé, J. Godoy, 04/05/2019.

Provável nova espécie: *Psalidodon* aff. *rivularis* m3

(Figuras 8C – 8D, Tabela 8)

Diagnose. Das demais espécies de *Psalidodon*, *Psalidodon* aff. *rivularis* m3 difere de *P. alleni*, *P. argentum*, *P. balbus*, *P. bifasciatus*, *P. biotae*, *P. bockmanni*, *P. chico*, *P. correntinus*, *P. dissensus*, *P. dissimilis*, *P. eigenmanniorum*, *P. erythropterus*, *P. fasciatus*, *P. gymnodontus*, *P. gymnogenys*, *P. henseli*, *P. hermosus*, *P. ita*, *P. jequitinhonhae*, *P. marionae*, *P. minor*, *P. ojiara*, *P. parahybae*, *P. pelegriini*, *P. powelli*, *P. puka*, *P. pynandi*, *P. rutilus*, *P. saguazu*, *P. schubarti*, *P. troya*, *P. vermilion* e *P. xiru* por possuir a cabeça robusta com o contorno do focinho até a

vertical posterior a órbita com um formato horizontal de “U” em vista lateral (vs. cabeça comprimida com o contorno do focinho até a vertical posterior a órbita com um formato horizontal de “V”). Das demais, difere de *P. anisitsi*, *P. crenuchoides*, *P. kalunga* e *P. xavante* por possuir de 16 a 19 raios ramificados na nadadeira anal (vs. 21-25 em *P. anisitsi*, 11-14 em *P. crenuchoides*, 13-14 em *P. kalunga* e 23-26 em *P. xavante*), de *P. brachypterygium*, *P. cremnobates* e *P. goyanensis* pelo comprimento pré-dorsal (47.6% - 51.4% vs. 51.2% - 58.2% em *P. brachypterygium*, 51.1% - 57.4% em *P. cremnobates* e 51.7% - 58% em *P. goyanensis*), de *P. endy* e *P. pampa* por apresentar uma menor altura corporal (25.93% - 34.78% vs. 36.6% - 42.2% em *P. endy* e 36.9% - 42.2% em *P. pampa*), de *P. hamatus*, *P. leonidas*, *P. pessalii*, *P. rivularis*, *P. santae*, *P. tumbayaensis* e *P. uberaba* por possuir padrão disperso de cromatóforos na região anterior do corpo abaixo da linha lateral (vs. padrão reticulado), de *P. laticeps*, *P. scabripinnis* e *P. serratus* por possuir mancha umeral alongada verticalmente (vs. mancha umeral alongada horizontalmente com um prolongamento vertical em sua porção anterior conferindo um formato em “p”), e de *P. paranae*, *P. rioparanaibanus*, *P. togoi*, *P. uaiso* e *P. varzeae* por apresentar a linha lateral variável (vs. sempre completa em *P. paranae*, *P. rioparanaibanus* e *P. varzeae*; e sempre incompleta em *P. togoi* e *P. uaiso*).

Descrição. Dados morfométricos disponíveis na Tabela 8. *P. aff. rivularis* m3 pode ser distinguido de todos as demais OTUs em *P. rivularis* sensu lato por apresentar um padrão disperso de cromatóforos na região anterior do corpo (vs. padrão reticulado), além disso, pode ser diferenciada de *P. santae*, *P. aff. santae* m2 e *P. aff. santae* m4 por possuir de 37-39 escamas ao longo da série longitudinal de escamas (vs. 33-36). Em geral, para demais características que foram possíveis de analisar neste trabalho, a descrição desta OTU é a mesma de *P. rivularis*, porém com uma menor variabilidade associada ao número de raios ramificados na nadadeira anal (16 – 19 vs. 14 – 20 em *P. rivularis*) e com diferenças estatisticamente significativas na distância órbita opercular (12.45% - 17.25%, média de 14.89% para *P. aff. rivularis* m3 e 9.35% - 13.71%, média de 11.36% para *P. rivularis*).

Distribuição. *P. aff. rivularis* m3 foi coletada em apenas três locais, todos afluentes das cabeceiras rio São Francisco, no Parque Nacional Serra da Canastra: nascente histórica do rio São Francisco, cachoeira Rasga Canga (parte alta e baixa) e cachoeira Casca d’ Anta (parte alta) (Figura 1).

Comentários. *P. aff. rivularis* m3 é claramente uma OTU distinta das demais OTUs em *P. rivularis* sensu lato, apoiada por todos as fontes de dados usadas neste trabalho, assim como é a única a não apresentar simpatria com nenhuma das demais. Além do já mencionado padrão

de cromatóforos na região anterior do corpo, essa OTU apresenta $2n=50$ cromossomos (vs. $2n=46$ em *P. rivularis*), com uma fórmula cariotípica bem distinta das demais, com 10 cromossomos metacêntricos (vs. 8 em todas as demais OTUs), 18 cromossomos submetacêntricos (vs. 20 ou mais), 6 cromossomos subtelocêntricos (vs. 8-10), e 16 cromossomos acrocêntricos (vs. 14 ou menos), apresentando também alguns exemplares com um distinto cromossomo B metacêntrico, maior que qualquer outro cromossomo do cariótipo, observado também apenas nos exemplares de *P. aff. santae* m4.

Do ponto de vista molecular, esta OTU é filogeneticamente próxima de *P. rioparanaibanus* e *P. aff. paranae* em um clado bem estruturado que denominamos “Paranaíba-Canastra”. Isto também se reflete em semelhanças morfológicas entre estas espécies, já que ambas também possuem padrão disperso de cromatóforos na região anterior do corpo abaixo da linha lateral. *P. aff. rivularis* m3 pode ser diagnosticada de *P. rioparanaibanus* por possuir de 37-39 escamas ao longo da série longitudinal (vs. 34-36) e por não possuir o padrão de escamas prateadas intercaladas com escamas escuras no dorso características de *P. rioparanaibanus*. Além disso, assim como as demais espécies em *P. rivularis* sensu latu, *P. aff. rivularis* m3 possui linha lateral variável (vs. completa nas demais espécies do clado “Paranaíba-Canastra”).

Material Examinado. 107 espécimes, todos do Parque Nacional Serra da Canastra, estado de Minas Gerais, Brasil. **Rio São Francisco:** LaGEEvo-50, 16 espécimes, comprimento padrão: 49mm – 89mm, Parque Nacional Serra da Canastra – MG, parte alta da cachoeira Rasga Canga, 20°10'39.13" S 46°33'33.68" O, I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, P. M. de Assis, L. G. P. Pimentel, R. A. S. Soares, T. da S. Ramos, J. Godoy, S. S. N. Pereira, 28/07/2023. LaGEEvo-51, 34 espécimes, comprimento padrão: 43mm – 83mm, Parque Nacional Serra da Canastra – MG, cachoeira Casca d’Anta, 20°18'2.24" S 46°31'18.99" O, I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, P. M. de Assis, L. G. P. Pimentel, R. A. S. Soares, T. da S. Ramos, J. Godoy, S. S. N. Pereira, 28/07/2023. LaGEEvo-52, 34 espécimes, comprimento padrão: 40mm – 81mm, Parque Nacional Serra da Canastra – MG, nascente histórica do rio São Francisco, 20°14'4.79" S 46°26'29.38" O, I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, P. M. de Assis, L. G. P. Pimentel, R. A. S. Soares, T. da S. Ramos, J. Godoy, S. S. N. Pereira, 28/07/2023. LaGEEvo-53, 23 espécimes, comprimento padrão: 50mm – 93mm, Parque Nacional Serra da Canastra – MG, parte baixa da cachoeira Rasga Canga, 20°10'39.13" S 46°33'33.68" O, I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, P. M. de Assis, L. G. P. Pimentel, R. A. S. Soares, T. da S. Ramos, J. Godoy, S. S. N. Pereira, 28/07/2023.

Provável nova espécie: *Psalidodon aff. santae* m4

(Figuras 8E – 8F, Tabela 8)

Diagnose. A diagnose de *Psalidodon aff. santae* m4 é a mesma de *P. santae*, e tal qual *P. aff. santae* m2, a principal evidência de que se trata de uma OTU separada veio das análises filogenômicas. Esta OTU pode ser diferenciada de *P. aff. santae* m2 por apresentar um comprimento menor da base da nadadeira anal, com 15.51% - 22.38% do comprimento padrão, média de 19.91% (vs. 22.48% - 29.16%, média de 26.17% em *P. aff. santae* m2), e embora com sobreposições, essa característica também a diferencia estatisticamente de *P. santae* (20.40% - 26.45%, média de 24.73%). Adicionalmente, *P. aff. santae* m4 também pode ser diagnosticada de *P. santae* e *P. aff. santae* m2 por apresentar uma altura corporal estatisticamente menor, com 27.03% - 32.53% do comprimento padrão, média de 29,6% (vs. 31.33% - 38.68%, média de 34.56% em *P. aff. santae* m2 e 28.26% - 39,5%, média de 33.44% em *P. santae*) e por, em geral, apresentar a região de maior altura corporal próxima da vertical situada na metade ou na ponta da nadadeira peitoral (vs. região de maior altura corporal, em geral, próxima da vertical situada na origem da nadadeira dorsal e/ou pélvica).

Descrição. Dados morfométricos disponíveis na Tabela 8. Em geral, para as características que foram possíveis de analisar neste trabalho, a descrição desta OTU é a mesma de *P. santae*, com ligeiras diferenças no número de raios ramificados na nadadeira anal (14 – 20 vs. 15 – 21 em *P. santae*) e geralmente apresentando maior altura corporal na vertical situada entre a metade e a ponta da nadadeira peitoral (vs. geralmente região de maior altura corporal próxima a vertical situada na origem da nadadeira dorsal).

Distribuição. *P. aff. santae* m4 foi coletada em afluentes dos rios Abaeté, Borrachudo e Paracatu no oeste do rio São Francisco sendo, portanto, distribuída nas bacias hidrográficas do Alto e Médio rio São Francisco. Em três dos quatro locais em que foi coletada (córrego Bonito, córrego Tiros e córrego Crico), esta OTU é simpátrica a *P. rivularis*, já no quarto local (Lagoa da Barragem Usina do Abaeté) é simpátrica a *A. lacustris* (Figura 1).

Comentários. *P. aff. santae* m4 é aparentada *P. santae* e *P. aff. santae* m2 quando analisadas as características merísticas e morfológicas, contudo, suas proporções morfométricas relembram mais *P. rivularis* e *P. aff. rivularis* m3, especialmente pela menor altura corporal,

como observado nas análises de PCA e Random Forest (Figura 3). Do ponto de vista da citogenética, esta população possui $2n=50 + 0-1B$ cromossomos, distinguindo-se de *P. rivularis* ($2n=46 + 0-2Bs$). Esta OTU também pode ser diagnosticada de *P. rivularis*, *P. santae* e *P. aff. santae* m2 pelo maior número de cromossomos subtelocêntricos (10 vs. 8), além de alguns espécimes apresentarem um grande cromossomo B metacêntrico, tal qual *P. aff. rivularis* m3 (vs. alguns espécimes apresentando um pequeno cromossomo B acrocêntrico de variação intercelular) (Figura 3). Do ponto de vista molecular, excluindo-se o resultado do genoma mitocondrial, esta OTU parece estar relacionada ao grupo “*paranae-scabripinnis*” (Figura 4).

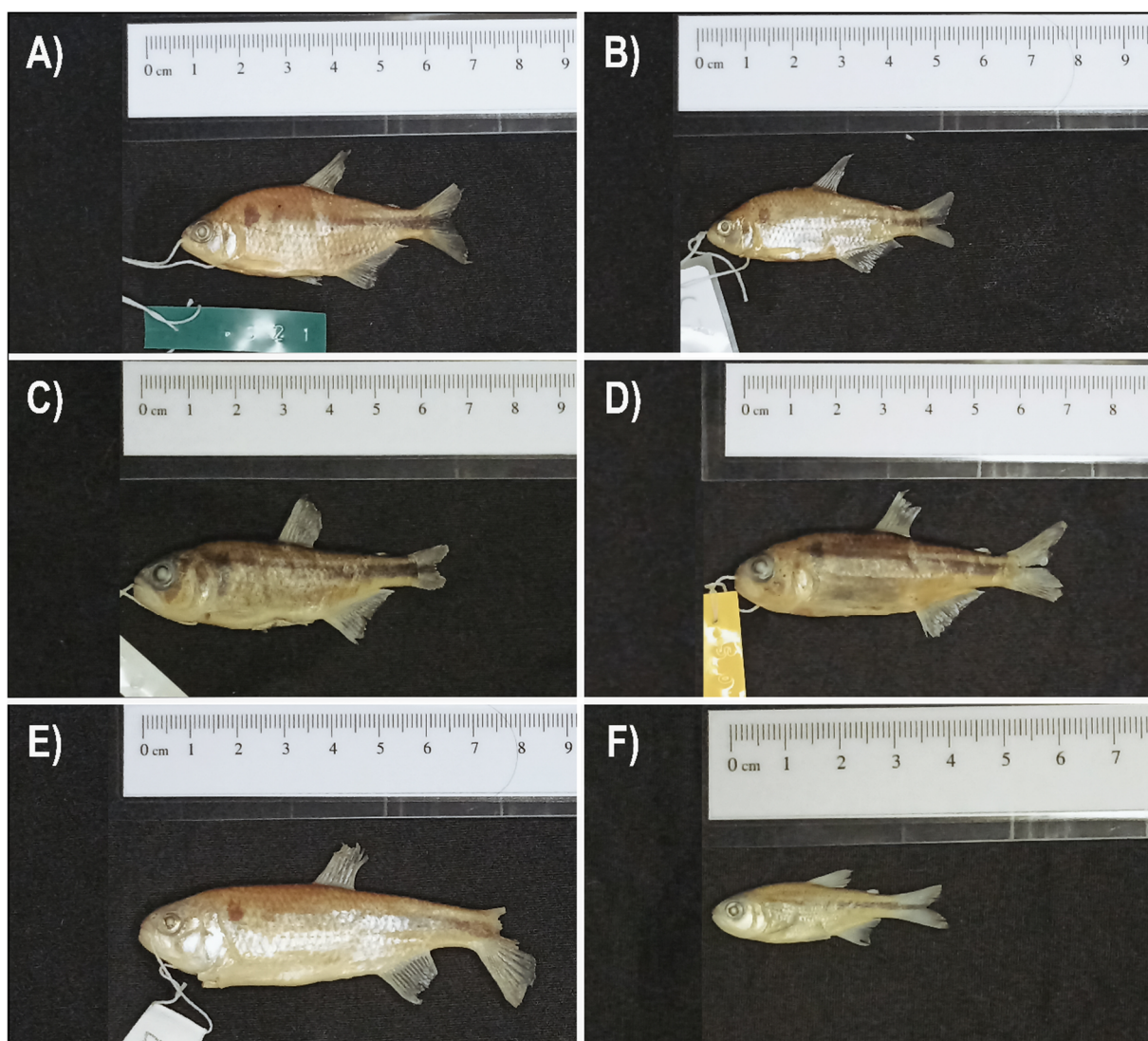


Figura 8: Espécimes de *P. aff. santae* m2 do córrego Lage (A), espécimes de *P. aff. santae* m2 do rio Funchal (B), espécimes de *P. aff. rivularis* m3 da cachoeira Rasga Canga (C), espécimes de *P. aff. rivularis* m3 da cachoeira Casca d'Anta (D), espécimes de *P. aff. santae* m4 do córrego Bonito (E) e espécimes de *P. aff. santae* m4 da lagoa da barragem Usina do Abaeté (F).

	<i>Psolidodon</i> aff. <i>santae</i> m2		<i>Psolidodon</i> aff. <i>rivularis</i> m3		<i>Psolidodon</i> aff. <i>santae</i> m4	
	N = 19		N = 16		N = 11	
	amplitude	Média / SD	amplitude	Média / SD	amplitude	Média / SD
Comprimento Padrão	38-59	47.87 / 6.05	49 - 89	69.03 / 12.13	31.5 - 77	53.32 / 16.67
	% do comprimento padrão					
Distância pré-dorsal	47.26 – 53.41	50.15 / 1.41	47.60 – 51.43	49.80 / 0.80	48.09 – 51.66	49.71 / 0.91
Distância pré-peitoral	14.72 – 23.80	20.82 / 2.31	22.26 – 28.16	25.56 / 1.90	22.16 – 27.47	24.55 / 2.00
Distância pré-pélvica	41.93 – 49.34	45.30 / 1.90	43.90 – 49.19	46.88 / 1.57	42.55 – 48.15	46.02 / 1.67
Distância pré-anal	59.50 – 69.79	63.66 / 2.32	64.17 – 67.69	65.93 / 0.96	62.83 – 68.21	66.06 / 1.88
Altura Corporal	33.97 – 38.90	35.88 / 1.55	28.06 – 33.40	30.87 / 1.48	28.64 – 32.66	30.94 / 1.37
Altura do PC	11.23 – 14.56	12.51 / 0.78	9.10 – 12.71	11.03 / 0.92	11.41 – 13.16	12.44 / 0.45
Comprimento do PC	10.47 – 15.78	12.72 / 1.32	13.54 – 18.15	16.26 / 1.07	12.47 – 18.60	15.32 / 1.88
Comprimento da ND	93.53 – 171.43	116.90 / 20.09	57.16 – 95.91	73.78 / 9.80	76.99 – 113.32	96.27 / 13.17
Comprimento da NP	37.95 – 48.51	42.72 / 3.11	37.66 – 42.12	39.94 / 1.51	35.51 – 41.08	37.50 / 3.11
Comprimento da NV	18.17 – 28.82	23.09 / 2.72	19.00 – 25.62	22.53 / 2.26	19.01 – 27.43	22.22 / 4.55
Comprimento da NA	22.33 – 49.10	38.77 / 7.17	24.90 – 52.55	41.81 / 7.45	39.89 – 61.20	49.58 / 8.29
Comprimento da base da NA	22.48 – 29.16	26.17 / 1.83	16.21 – 23.26	19.96 / 1.74	15.51 – 22.38	19.91 / 2.23
Distância órbita - ND	33.36 – 37.99	36.12 / 1.26	34.41 – 37.10	35.68 / 0.75	33.42 – 39.70	35.99 / 1.95
Comprimento da cabeça	21.60 – 26.19	24.17 / 1.33	26.12 – 31.93	28.96 / 1.74	24.42 – 29.92	27.04 / 1.86
OOL	8.60 – 12.71	10.14 / 1.07	12.45 – 17.25	14.89 / 1.27	12.37 – 14.83	13.30 / 0.73
	% da altura corporal					

Altura da Cabeça	59.24 – 78.33	64.87 / 4.01	75.44 – 87.22	80.98 / 3.72	68.34 – 79.25	75.49 / 3.81
Altura do PC	31.34 – 38.01	34.87 / 1.89	30.82 – 41.84	35.76 / 2.83	35.28 – 43.16	40.27 / 2.37
% do comprimento da cabeça						
Diâmetro da órbita	26.95 – 39.11	33.90 / 2.61	23.22 – 34.42	28.20 / 3.14	23.27 – 34.72	27.89 / 3.91
Comprimento do focinho	16.47 – 30.71	24.05 / 3.09	15.75 – 24.45	20.41 / 2.41	18.09 – 26.67	22.60 / 2.59
Comprimento da MS	33.84 – 45.69	39.50 / 3.29	35.28 – 48.40	40.54 / 3.05	33.80 – 43.47	39.28 / 3.41
Distância interorbital	29.98 – 39.61	34.34 / 3.26	27.58 – 39.73	32.79 / 3.19	29.47 – 39.38	34.33 / 2.75

Material Examinado. 30 espécimes, todos do estado de Minas Gerais, Brasil. **Bacia do rio São Francisco. Sub-bacia do rio Abaeté:** LaGGEvo-54, 5 de 23 espécimes, comprimento padrão: 42mm – 72mm, município de Rio Paranaíba – MG, lagoa da barragem Usina Abaeté, 19°12'35.69" S 46° 6'33.79" O, W. Lopes-Silva, C. H. M. Fernandes, M. A. da Silva, A. C. M. Fernandes, 17/07/2012. LaGGEvo-55, 8 de 13 espécimes, comprimento padrão: 31,5mm – 44mm, município de Rio Paranaíba – MG, lagoa da barragem Usina Abaeté, 19°12'35.69" S 46° 6'33.79" O, I. H. R. Oliveira, I. B. da Silva, M. A. da Silva, 07/07/2017. LaGGEvo-57, 2 de 10 espécimes, comprimento padrão: 67mm – 67.5mm, município de Tiros – MG, córrego Tiros, 18°56'34.08" S 45°56'18.20" O, 2010-2012. **Sub-bacia do rio Borrachudo:** LaGGEvo-39, 6 espécimes, comprimento padrão: 52mm – 77mm, município de Tiros – MG, córrego Bonito, 18°48'44.7" S 45°45'52.2" O, P. Penteado, Denis, Gabriel, Rafael, 20/07/2010. **Sub-bacia do rio Paracatu:** LaGGEvo-76, 9 espécimes, comprimento padrão: 37mm – 45mm, município de Presidente Olegário – MG, córrego Crico, 18°18'44.36" S 46° 5'44.46" O, I. B. da Silva, M. L. C. B. de Campos, V. Augusto, S. V. Resende, 06/04/2019.

Material comparativo analisado. *Astyanax lacustris*: ZMUC P241329 (fotografia), sintipo de *Tetragonopterus lacustris*, 1 espécime, comprimento padrão: 51.12mm, município de Lagoa Santa - MG, 19°37'52" S 43°54'07" O, J. T. Reinhardt, 1850-1856. LaGGEvo-65, 2 espécimes, comprimento padrão: 69mm – 78.5mm, Lagoa da Prata – MG, córrego Retiro de Baixo, 20° 0'15.75" S 45°30'42.13" O, I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, R. A. S. Soares, L. da C. de Santos, 06/05/2023. LaGGEvo-66, 3 espécimes, comprimento padrão: 69mm – 79mm, Augusto de Lima - MG, córrego Teixeira, 17°58'58.53" S 44°4'26.566" O, V. G. de Miranda, julho de 2024. LaGGEvo-71, 12 espécimes, comprimento padrão: 49mm – 59mm, Rio Paranaíba – MG, lagoa da barragem Usina Abaeté, 19°12'35.69" S 46°6'33.79" O, I.H.R. Oliveira, P. M. de Assis, L. G. P. Pimentel, R. A. S. Soares, 10/01/2022. *Psalidodon fasciatus*: ZMUC P241291 (fotografia), sintipo de *Tetragonopterus cuvieri*, 1 espécime, comprimento padrão: 86.5mm, município de Lagoa Santa - MG, 19°37'52" S 43°54'07" O, J. T. Reinhardt, 1850-1856. LaGGEvo-67, 1 espécime, comprimento padrão: 98mm, Lagoa da Prata – MG, córrego Retiro de Baixo, 20° 0'15.75" S 45°30'42.13" O, I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, R. A. S. Soares, L. da C. de Santos, 06/05/2023. LaGGEvo-68, 3 espécimes, comprimento padrão: 68mm – 83mm, Augusto de Lima - MG, córrego Teixeira, 17°58'58.53" S 44°4'26.566" O, V. G. de Miranda, julho de 2024. LaGGEvo-69, 7 espécimes, comprimento padrão: 38.5mm - 89mm, Lagoa da Prata – MG, rio Santana, 20° 0'15.75" S 45°30'42.13" O, I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, R. A. S. Soares, L. da C. de Santos, 06/05/2023. LaGGEvo-70, 1 espécime,

comprimento padrão: 64mm, Três Marias – MG, rio Vereda Grande, 18°19'18.62" S 45° 6'32.80" O, R. de M. Alves; R. R. Rocha; M. A. da Silva; S. V. Resende, 18/04/2017. *Psalidodon paranae*: LaGEEvo-72, 7 espécimes, comprimento padrão: 53.5mm – 77.5mm, Rio Paranaíba – MG, córrego Lava-Pés, 19°11'41.22" S 46°15'7.32" O, M. L. C. B. de Campos, F. Sassi, T. Lunardi, R. Pereira, M. Trevisanuto, novembro de 2015. LaGEEvo-73, 3 espécimes, comprimento padrão: 77mm – 83mm, Rio Paranaíba – MG, córrego Lava-Pés, 19°11'41.22" S 46°15'7.32" O, M. L. C. B. de Campos, F. Sassi, T. Lunardi, R. Pereira, M. Trevisanuto, novembro de 2015. *Psalidodon rioparanaibanus*: LaGEEvo-12, holótipo de *Psalidodon rioparanaibanus*, 1 espécime, comprimento padrão: 84mm, Rio Paranaíba – MG, córrego Rita, 19°11'15.77" S 46°14'10.24" O, M. A. da Silva e I. B. da Silva, 21/08/2017. LaGEEvo-13, parátipos de *Psalidodon rioparanaibanus*, 8 de 15 espécimes, comprimento padrão: 43mm - 84mm, Rio Paranaíba – MG, córrego Rita, 19°11'15.77" S 46°14'10.24" O, I. H. R. Oliveira, I. B. da Silva, R. L. Oliveira, G. Leles, T. Castaño, 23/09/2018. LaGEEvo-14, parátipos de *Psalidodon rioparanaibanus*, 4 espécimes, comprimento padrão: 40mm - 84mm, Rio Paranaíba – MG, córrego Rita, 19°11'15.77" S 46°14'10.24" O, M. A. da Silva e I. B. da Silva, 21/08/2017.

2.4 Discussão

Neste trabalho nós conseguimos, através de uma abordagem integrada, delimitar cinco espécies diferentes dentro do grupo *P. rivularis* sensu lato distribuídas em diversos afluentes na mesorregião do Alto rio São Francisco. Apesar de inicialmente surpreender, esse número de espécies é plausível quando consideramos que, mesmo levando em conta *P. santae*, o Alto rio São Francisco conta apenas com quatro espécies válidas de *Psalidodon* (*P. rivularis*, *P. santae* comb. nov., *P. pessalii* e *P. fasciatus*). Este número é relativamente menor que outras mesorregiões hidrográficas brasileiras, como rio Paranaíba (8 spp.), rio Grande (7 spp.) e rio Iguaçu (8 spp.) (Fricke et al., 2025b). Neste cenário, não só trouxemos avanços no conhecimento da biodiversidade do gênero *Psalidodon* no Alto rio São Francisco, como evidenciamos aqui a necessidade de abordagens integrando dados de diferentes origens, i.e., moleculares, fenotípicos e biogeográficos, no estudo de complexos de espécies (Grube & Kroken, 2001), uma vez que, como discutiremos abaixo, todas essas fontes de dados apresentaram méritos e desafios na delimitação das diferentes OTUs do grupo.

Duas das OTUs que identificamos correspondem aos dois morfotipos de Lütken (1875): *P. rivularis* sensu strictu e *P. santae* comb. nov., sendo a segunda uma nova combinação para

H. santae (Eigenmann, 1907). Também fornecemos uma nova diagnose para as duas espécies, uma vez que a completude da linha lateral mencionada por Eigenmann (1907) não é capaz de diagnosticar estas duas espécies, ou nenhuma das cinco OTUs identificadas nesse estudo, uma vez que todas são dotadas de linha lateral variável, podendo ser completa, incompleta ou interrompida. Esta característica é considerada pedomórfica em caracídeos, resultante do truncamento do desenvolvimento da linha lateral, aparecendo diversas vezes independentemente em Acestrorhamphidae, inclusive no gênero *Psalidodon*, tendo sido relatada, além de *P. rivularis* e *P. santae*, em *P. balbus*, *P. brachypterygium*, *P. cremnobates* e *P. anisitsi* (Marinho et al., 2021).

Das características morfológicas que se demonstraram úteis na diagnose das diferentes OTUs de *P. rivularis* sensu lato, e assim como em nosso trabalho anterior (Rodrigues-Oliveira et al., 2023), observamos aqui que a altura corporal é a característica com maior variação no grupo, sendo inclusive, a característica que mais diferencia os exemplares do morfotipo 2 (*P. santae* e *P. aff. santae* m2) dos demais morfotipos do grupo (Figura 5). As diferenças entre o morfotipo 2 e os demais morfotipos de *P. rivularis* sensu lato relembram as transformações cartesianas, relacionadas a morfogênese em peixes, abordadas por D'Arcy Thompson em sua obra *On Growth and Form* (D'Arcy, 1942). Hoje reconhecemos estas transformações como mudanças nas taxas ontogenéticas, relacionadas aos processos de heterocronia (mudanças na taxa e tempo do desenvolvimento) e heteroropia (mudanças no padrão espacial do desenvolvimento) (Zelditch & Fink, 1996).

Uma vez que a altura corporal em peixes é intensamente modulada por fatores ambientais, em especial a velocidade da água (Webb, 1984; Santos & Araújo, 2015; Rodrigues-Oliveira et al., 2023), é possível que as mudanças na altura corporal dos exemplares do morfotipo 2 em relação aos demais seja fruto de mudanças nas taxas ontogenéticas do seu desenvolvimento, permitindo a estes espécimes a ocupação de um nicho ecológico diferente dos exemplares do morfotipo 1, com quem são simpátricos em vários locais no Alto rio São Francisco. Tal explicação já foi proposta para outras espécies de peixes filogeneticamente relacionadas, mas com discrepâncias em sua altura corporal (Aguilar-Medrano, 2013; Delariva & Neves, 2020).

Outra característica morfométrica que se mostrou resolutive na diagnose das OTUs de *P. rivularis* sensu lato foi a distância órbita-opercular (OOL), e aqui precisamos contextualizar o uso da OOL como característica morfométrica. Esta medida foi recentemente utilizada por Engelman (2023) como um método para estimar o tamanho corporal do extinto peixe

placodermo *Dunkleosteus terrelli*. De acordo com o autor, essa medida pode ser utilizada para estimar o tamanho de vários grupos de peixes, desde peixes agnatos até peixes ósseos, por ter seu tamanho fortemente restrito, uma vez que abrange o neurocrânio e a câmara branquial. No caso da câmara branquial, ela é extremamente importante pela sua demanda funcional no consumo de oxigênio (Engelman, 2023).

No entanto, utilizamos uma adaptação da OOL, excluindo a órbita da medida. As razões para essa mudança são devidas ao nosso entendimento de que o crânio dos peixes é composto por três regiões diferentes e independentes entre si: focinho, órbita e região pós-orbital, com as duas primeiras já sendo contempladas nas medidas morfométricas tradicionais de caracídeos (Menezes & Weitzman, 1990). O focinho dos peixes, definido da ponta do rostro até a margem anterior da órbita, é conhecido por variar mesmo entre espécies próximas pela sua relação direta com os hábitos alimentares da espécie (Aguilar-Medrano, 2013; Delariva & Neves, 2020; Engelman, 2023). A órbita também é conhecida por apresentar variação em espécies próximas de peixes, sendo inclusive uma das características distintivas de “*Astyanax turmalinensis*” (Triques et al., 2003). Por fim, o alongamento pós-orbital é reconhecido como um processo ontogenético importante em peixes (Zelditch & Fink, 1996), e em nosso trabalho anterior com morfometria geométrica, identificamos que o recuo da placa suborbital em relação ao opérculo era a segunda característica que mais variava em *P. rivularis* (Rodrigues-Oliveira et al., 2023).

Em nosso trabalho, observamos que a OOL foi estatisticamente diferente entre *P. santae* e *P. aff. santae* m2, e entre *P. rivularis* e *P. aff. rivularis* m3. Curiosamente, em ambos estes casos essas amostras são separadas geograficamente. Como apresentamos anteriormente, *P. santae* e *P. aff. santae* m2 habitam os lados diferentes do rio São Francisco, com a primeira ocorrendo ao leste do rio São Francisco (cabeceiras dos rios das Velhas, Cipó, Jequitinhonha e Doce) e a segunda ao oeste do rio (cabeceiras dos rios Abaeté e Indaiá). Como as demais espécies do complexo *Psalidodon scabripinnis*, estas espécies são conhecidas pelo hábito de ocuparem apenas ambientes de cabeceiras, e desta forma, a própria calha principal de grandes rios age como uma barreira natural, isolando populações e promovendo sua evolução cromossômica e morfológica (Moreira-Filho & Bertollo, 1991).

Isso se aplica bem a estas OTUs, que só são coletadas em córregos (como córrego Lage no rio Abaeté e córrego Divisão no rio Jequitinhonha), rios de menor porte (como rio Funchal, afluente do rio Indaiá, e os rios Mascates e Bocaina, afluentes do rio Cipó) ou nascente dos grandes rios (como a nascente do rio das Velhas, em Ouro Preto – MG). Já nos rios de maior porte da mesorregião hidrográfica do Alto rio São Francisco, as espécies coletadas passam a ser

P. fasciatus e *A. lacustris*, sendo que observamos poucos casos de simpatria entre estas últimas e *P. rivularis* sensu lato (Figura 1).

Entre *P. rivularis* e *P. aff. rivularis* m3 o fator de isolamento geográfico aparenta ser outro. Enquanto *P. rivularis* está distribuído ao longo de vários afluentes na mesorregião do Alto rio São Francisco, *P. aff. rivularis* m3 está confinado em tributários próximos a nascente do rio São Francisco nos ambientes altos do Parque Nacional Serra da Canastra (acima de 1100 metros de altitude). Neste cenário, propomos uma explicação filogeográfica para a ocorrência desta segunda OTU na bacia do rio São Francisco. Quando consideramos que a região em que *P. aff. rivularis* m3 é coletada no Parque Nacional Serra da Canastra faz fronteira com as Bacias hidrográficas do Paranaíba e Grande, e que essa OTU agrupa com as espécies do rio Paranaíba, *P. rioparanaibanus* e *P. aff. paranae*, em todas as filogenias realizadas, é possível que a ocorrência desta OTU no rio São Francisco seja explicada por processos vicariantes de captura de cabeceiras ocorridas durante as atividades tectônicas extensas durante a transição do Plioceno-Pleistoceno (Ribeiro, 2006).

Desta forma, a existência do clado “Paranaíba-Canastra” que reportamos aqui, composto por espécies de *Psalidodon* do grupo *P. scabripinnis*, soma-se a vários outros exemplos de vicariância entre espécies irmãs ou espécies crípticas de Acestorhamphidae associada ao soerguimento do Arco do Paranaíba (Pazza et al., 2017; Cunha et al., 2019; Rodrigues Rocha et al., 2019). Este evento, responsável pelo isolamento das bacias do rio Paranaíba e Alto São Francisco (Campos & Dardenne, 1997), pode ter sido responsável pela criação de várias zonas de endemismo em ambientes altos próximos a fronteira dessas duas bacias, o que explica a ocorrência restritas de algumas espécies como *P. aff. rivularis* M3 e *P. rioparanaibanus* (de Mesquita Alves et al., 2020). Além disso, processos geológicos intensos são conhecidos por ocasionar fenômenos como capturas de cabeceiras, que por sua vez, podem levar tanto a eventos vicariantes, como de dispersão ou geodispersão (Dagosta & Pinna, 2017). Capturas de cabeceiras podem não só explicar a presença de *P. aff. rivularis* M3 na Serra da Canastra, como a presença de *P. aff. santae* M4, grupo relacionado ao clado “*paranae-scabripinnis*”, na bacia do Alto rio São Francisco.

Outro importante aspecto evolutivo e critério diagnóstico na delimitação das OTUs de *P. rivularis* sensu lato é, sem dúvida, sua diversidade cromossômica (Figura 3). O conhecimento da diversidade cromossômica dos “*P. scabripinnis*” do rio São Francisco não é algo novo, com a primeira documentação de populações com diferentes números diploides ($2n=46$ e $2n=50$) datando do final do século XX (Moreira-Filho & Bertollo, 1991). Aqui demonstramos que, além

de diferenças cariotípicas entre os diferentes morfotipos de *P. rivularis* sensu lato, as diferenças no número diploide distinguem os exemplares do morfotipo 1 (*P. rivularis* sensu stricto, $2n=46$) dos demais morfotipos ($2n=50$). É importante destacar que a existência de diferentes citótipos/cariomorfos não é, por si só, um diagnóstico para a existências de diferentes espécies, uma vez que são conhecidas espécies com diferentes números cromossômicos e com potencial de inter cruzamento, ocasionando múltiplas formas híbridas, como por exemplo, *P. fasciatus* (Pazza et al., 2006).

Porém, é conhecido que alterações no número cromossômico podem levar ao isolamento reprodutivo pós-zigótico, com o grau de fertilidade dos híbridos decaindo, podendo até chegar a infertilidade, conforme mais geneticamente distantes sejam os parentais (Cursino et al., 2014). Esse grau isolamento reprodutivo parece estar ocorrendo ao menos entre os citótipos com diferentes números cromossômicos de *P. rivularis* sensu lato, o que explicaria o fato de que todos os casos de simpatria observados ocorreram em pares, sempre envolvendo os exemplares de *P. rivularis* sensu stricto ($2n=46$) com exemplares de outra OTU, podendo ser *P. santae*, *P. aff. santae* m2 ou *P. aff. santae* m4 ($2n=50$). Outra evidência reside no fato de que não observamos formas intermediárias entre esses citótipos neste trabalho. Metáfases com 48 cromossomos foram raras, e análises posteriores demonstraram que eram artefatos de metáfases incompletas de exemplares com $2n=50$ cromossomos, ou fruto da presença de 2 cromossomos Bs em alguns poucos exemplares ($n=3$) de *P. rivularis* sensu stricto no córrego Lage.

É interessante observar também que a filogenia do genoma mitocondrial não recuperou os exemplares de *P. rivularis* sensu stricto, *P. santae* ou *P. aff. santae* M4 como agrupamentos monofiléticos. Na verdade, todos esses exemplares (com exceção de *P. santae* do rio Cipó) foram recuperados em um único clado que inclui também *P. aff. santae* M2 (Figura 4A). Em geral, quase todos os genomas mitocondriais de *P. rivularis* sensu lato apresentam baixas distâncias genéticas entre si (menor que 2%), o que faz com que as diferentes OTUs de *P. rivularis* sensu lato se enquadrem dentro do modelo de radiação cromossômica (Kavalco & Pasa, 2023).

Quando comparamos a filogenia mitocondrial com as filogenias dos dados multilocus (Figuras 4B e 4C), fica claro que a filogenia mitocondrial pode falhar em recuperar corretamente as relações filogenéticas do grupo. Esse tipo de fenômeno, chamado de discordância mito-nuclear, pode ser fruto de diversos fatores, como amostragem de linhagem incompleta, manutenção de haplótipo ancestral, seleção, dispersão enviesada pelo sexo, introgressão, captura de mitocondrial e hibridismo (De Ré et al., 2017; Després, 2019; Zadra et

al., 2021). Por exemplo, enquanto um histórico passado de hibridismo poderia explicar a ausência de estruturação entre as OTUs do grupo, uma introgressão com captura de mitocondrial poderia explicar a divergência observada no mitocondrial de *P. santae* do rio Cipó (Després, 2019). Apesar de ser um indicativo de eventos biológicos importantes na evolução do grupo, a discordância mito-nuclear observada aqui reforça que a delimitação e identificação de espécies utilizando genes mitocondriais, o chamado DNA barcode animal, é ineficiente em complexos de espécies ou entre grupos de espécies crípticas.

Soma-se a este problema, possíveis identificações equivocadas presentes nos bancos de dados públicos. Como exemplo, atualmente no NCBI e no BOLD existem cinco amostras de DNA barcode para “*Hyphessobrycon*” *santae* (voucher no BOLD: BSB287-10 - BSB291-10; NCBI: HM405126.1- HM405130.1), todas com uma similaridade entre 83% e 85% com nossas amostras de *P. santae* ou *P. aff. santae* (M2 e M4). Entretanto, os mesmos espécimes estão listados como “*Hyphessobrycon*” *micropterus* (Nome válido: *Megalamphodus micropterus*) no SpeciesLink (MCP-Peixes 45159). Ao consultar o Professor Roberto Esser dos Reis da PUCRS, onde os espécimes estão depositados, foi possível constatar através de fotografias que estes espécimes possivelmente correspondem a *M. micropterus*, apresentando a mancha preta conspícua na nadadeira dorsal característica do gênero *Megalamphodus* (Reis, comunicação pessoal).

Voltando ao contexto sobre a possível importância que um histórico de hibridismos e introgressões teve na evolução do grupo, observamos em nossas filogenias com dados multilocus seis clados bem estruturados dentro do complexo *P. scabripinnis* (Figura 4B – 4C). Entretanto, observamos diferenças entre as duas filogenias, principalmente relacionadas às relações filogenéticas entre os clados. Nossa rede filogenética ilustra estas discordâncias, o que nos leva a supor que um intenso grau de hibridismos e introgressões possa ter acontecido durante a radiação adaptativa dos principais clados do grupo (Figura 4D). Desta forma, é possível que as relações filogenéticas entre diferentes OTUs do complexo *P. scabripinnis* não possa ser ilustrada na forma de uma filogenia bifurcada e bidimensional, independente da fonte ou quantidade de dados usados, sendo necessário recorrer a uma representação na forma de redes filogenéticas que acomode os eventos reticulados que ocorreram na evolução do grupo (Huson & Bryant, 2006; Hallström & Janke, 2010).

Finalmente, embora não seja o foco deste trabalho, aproveitamos a oportunidade para destacar a possibilidade de uma possível nova espécie, relacionada ao complexo “*P. scabripinnis*”, na mesorregião hidrográfica do rio Paranaíba. Esta região conta atualmente com

duas espécies desse grupo, a espécie endêmica do córrego Rita, município Rio Paranaíba/MG, *P. rioparanaibanus* e sua espécie irmã *P. aff. paranae* (de Mesquita Alves et al., 2020). Ambas foram inicialmente catalogadas na coleção ictiológica do LaGEEvo UFV CRP como possíveis exemplares de *P. paranae*, mas ao analisar nossos resultados, ambas definitivamente não pertencem a esta espécie. Além de não agruparem com *P. paranae* do rio Tietê em nenhuma de nossas filogenias (Figura 4), *P. rioparanaibanus* pode ser diagnosticada de *P. paranae* e *P. aff. paranae* por possuir de 34-36 escamas ao longo da linha lateral (vs. 37-41 escamas) e pela presença de um distinto padrão de escamas claras intercaladas com as escamas escuras do dorso (de Oliveira, em preparação), já *P. aff. paranae* pode ser diagnosticada de *P. paranae* por possuir duas manchas umerais (vs. 1) (Oliveira, 2017).

2.5 Conclusão

Neste trabalho, nos propusemos a decifrar algo que denominamos aqui o “enigma de Lütken”. Inicialmente, esse enigma se refere ao contraste entre a hipótese nula de que os morfotipos 1 e 2 de “*T.*” *rivularis* correspondem a uma ampla variação morfológica intraespecífica vs. a hipótese alternativa de que correspondem a diferentes espécies. Esse enigma, no entanto, pode ser expandido às diferenças no número cromossômico e linhagens genéticas. Aqui demonstramos que ao integrar todas essas fontes de dados pudemos chegar à conclusão de que *P. rivularis* sensu lato corresponde a não apenas duas ou três, mas provavelmente cinco OTUs diferentes, cuja especiação é fruto da combinação de vários fatores evolutivos. Nossos resultados também nos permitem enfatizar a importância no estudo e conservação de ambientes altos próximos ao limite de diferentes mesorregiões hidrográficas, como o córrego Rita e o Parque Nacional Serra da Canastra, uma vez que correspondem a ambientes propícios ao endemismo de espécies do complexo *P. scabripinnis* (aqui exemplificados por *P. rioparanaibanus* e *P. aff. rivularis* m3). Além disso, enfatizamos a importância na preservação de pequenos afluentes, que muitas vezes são negligenciados, mas que na verdade são ambientes complexos e biodiversos, como observado aqui através de vários casos de simpatria de diferentes OTUs de *P. rivularis* sensu lato.

3. CAPÍTULO 2 - *SATFISHER PROTOCOL*: UMA FERRAMENTA PARA CARACTERIZAR, COMPARAR E VALIDAR DNAs SATÉLITES E NOVAS PERSPECTIVAS SOBRE A EVOLUÇÃO DE SATDNAs EM *Astyanax* E *Psalidodon* (ACESTRORHAMPHIDAE: ACESTRORHAMPHINAE)

Igor Henrique Rodrigues-Oliveira, Rafael Augusto Silva Soares, Luiz Guilherme Pereira Pimentel, Priscila Martins de Assis, Iuri Batista da Silva, Fabiano Bezerra Menegidio, Rubens Pasa, John Seymour (Pat) Heslop-Harrison, Trude Schwarzacher e Karine Frehner Kavalco

Resumo

Neste artigo, desenvolvemos um protocolo (*SatFisher Protocol*) que envolve a montagem e caracterização de satelitomas com dados de sequenciamento do genoma completo (WGS) de leituras curtas, prospecção de satDNAs com potencial de marcadores moleculares, e quantificação e validação desses marcadores por qPCR. Para a aplicação do protocolo descrevemos o satelitoma de dois citótipos do complexo de espécies *Psalidodon rivularis* sensu lato (*P. rivularis* 2n=46 e *P. aff. rivularis* M4 2n=50), *Psalidodon fasciatus* e *Astyanax lacustris* da bacia do Rio São Francisco, e de *Psalidodon rioparanaibanus* e *Astyanax "altiparanae"* da bacia do Rio Paranaíba, e quantificamos as diferenças relacionadas ao número de cópias de DNAs satélites (satDNAs) nos genomas dessas e outras espécies relacionadas. Nossa análise demonstra que a maior parte da diferenciação entre os satelitomas analisados é decorrente de diferenças no número de cópias de cada família de satDNA entre diferentes genomas, o que é compatível com a "Hipótese da Biblioteca". Adicionalmente, nosso protocolo se mostrou útil na prospecção de marcadores para espécies crípticas dos complexos *P. rivularis* e *P. fasciatus*. Além disso, fomos capazes de demonstrar que as bibliotecas de satDNAs variam fortemente entre espécies sulamericanas dos gêneros *Astyanax* e *Psalidodon*, com pelo menos seis marcadores capazes de discriminar espécies destes gêneros.

Palavras chaves: Elementos Repetitivos, Citótipos, Complexo de Espécies, Hipótese da Biblioteca

3.1 Introdução

A família “Characidae”, que engloba peixes conhecidos popularmente como piabas, lambaris ou tetras, é historicamente a família com maior diversidade de táxons ao nível de gêneros e espécies na ordem Characiformes, o que levou à sua divisão em quatro novas famílias, com Acestrorhamphidae sendo a mais diversa (Melo et al., 2024). Esta família engloba alguns gêneros altamente diversos e sabidamente não monofiléticos, como *Astyanax*, *Hemigrammus* e *Hyphessobrycon*, o que se deve em grande parte ao uso de caracteres diagnósticos que surgiram múltiplas vezes no grupo, como por exemplo, a incompletude da linha lateral (Mirande, 2010, 2019; Marinho et al., 2021).

Após revisão taxonômica conduzida por Terán et al. (2020), várias espécies do gênero *Astyanax* foram realocadas para outros gêneros, alguns já existentes e em uso, outros recém-criados ou, no caso de *Psalidodon*, um gênero que estava em desuso e que fora “ressuscitado”, nas palavras dos autores. Dentre as espécies realocadas para *Psalidodon*, se encontram muitas historicamente atribuídas aos complexos de espécies “*Astyanax fasciatus*” (Nome válido: *Psalidodon fasciatus*) e “*Astyanax scabripinnis*” (Nome válido: *Psalidodon scabripinnis*), conhecidas por apresentar plasticidade fenotípica e ampla variabilidade cromossômica e genética (Moreira-Filho & Bertollo, 1991; Pazza et al., 2006, 2018).

Uma abordagem que tem se demonstrado útil no estudo de grupos próximos com grande diversidade cromossômica é a Hibridização Fluorescente In Situ (FISH) com DNAs satélites (satDNAs), que inclusive foi empregada nos complexos de espécies *P. fasciatus* e *P. scabripinnis* utilizando o satDNA As51 (Mestriner et al., 2000; Abel et al., 2006; Kantek et al., 2009). O termo “DNA satélite” foi cunhado devido ao padrão que esses DNAs apresentavam após centrifugação em gradiente de alta velocidade, que por serem abundantes e terem composição de bases diferentes do resto do DNA, formavam bandas satélites (Gall & Pardue, 1969; John et al., 1969; Biscotti et al., 2015).

Esses elementos estão entre os grupos de DNAs repetitivos de evolução mais rápida no genoma (Ruiz-Ruano et al., 2016; Silva et al., 2017), com monômeros usualmente com mais de 100 pb, organizados em longas matrizes de repetições de até milhões de bases de comprimento (Novák et al., 2017). Essas sequências podem ser organizadas em diferentes famílias de satDNAs, de acordo com as variações em suas sequências de bases, tamanho do motivo de repetição, cobertura e localização no genoma (Garrido-Ramos, 2017). O conjunto, ou biblioteca,

dessas famílias é denominado satelitoma e tende a ser compartilhado entre espécies próximas, porém com diferenças quantitativas no número de repetições, o que é conhecido como “hipótese da biblioteca” (Fry & Salser, 1977; Ruiz-Ruano et al., 2016; Garrido-Ramos, 2017).

Com o advento das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) foram desenvolvidos vários protocolos e ferramentas para caracterização de elementos repetitivos em *tandem*, tanto em dados de leituras longas como o Tandem Repeats Finder (Benson, 1999), quanto em dados de leituras curtas, como o RepeatExplorer, satMiner toolkit protocol e TAREAN (Novák et al., 2013, 2017; Ruiz-Ruano et al., 2016). Dentre essas ferramentas, o TAREAN se destaca por ser uma pipeline computacional totalmente automatizada, baseada em agrupamentos de repetições baseados em grafos, com ferramentas para identificação e caracterização de satDNAs sem necessidade de inspeção visual (Novák et al., 2017).

Grande parte dos trabalhos recentes com satDNAs envolvem a caracterização e comparação de satelitomas por bioinformática seguida pela inspeção e visualização cromossômica dos satDNAs por FISH (Ruiz-Ruano et al., 2016; Silva et al., 2017; Silva et al., 2019; Sena et al., 2020; Goes et al., 2022; Rocha-Reis et al., 2024). Entretanto, cada vez mais têm sido observados estudos com satelitomas e satDNAs que não envolvem a localização física desses elementos nos cromossomos, como trabalhos de caracterização, comparação e análise da sua contribuição genômica *in silico* (Haq et al., 2022; Silva et al., 2023), análises filogenéticas (Ramírez et al., 2017; Dias et al., 2021), detecção e quantificação de patógenos (Françoise et al., 2007; Enriquez et al., 2014; Ramírez et al., 2017; Muñoz-Calderón et al., 2021), análises funcionais relacionadas à expressão gênica (Feliciello et al., 2015) e na prospecção de biomarcadores para doenças, como por exemplo, diferentes tipos de câncer humano (Özgür et al., 2021).

Até o momento, quatro espécies dos gêneros *Psalidodon* e *Astyanax* possuem seus satelitomas publicados em periódicos científicos: *Psalidodon paranae*, *Psalidodon fasciatus*, *Psalidodon bockmani* e *Astyanax lacustris* (Silva et al., 2017; Goes et al., 2022). Contudo, uma ressalva importante deve ser feita em relação a *P. fasciatus* e *A. lacustris*. Os satelitomas publicados foram obtidos a partir de espécimes coletados na bacia do rio Paraná, e ambas as espécies foram inicialmente descritas na bacia do rio São Francisco, com diversos trabalhos questionando se os espécimes de ambas as bacias pertencem de fato a mesma espécie (Pazza et al., 2017; Cunha et al., 2019; Gavazzoni et al., 2023, 2024). Ainda, em relação a *A. lacustris*, até uma revisão feita por Lucena & Soares (2016), os espécimes da bacia do rio Paraná eram,

até recentemente, referidos como *Astyanax altiparanae*, tendo sido recentemente proposto que esse táxon deveria ser “ressuscitado” (Gavazzoni et al., 2024), muito embora já tivesse ficado clara a estruturação filogenética existente entre *A. altiparanae* do rio Paraná e *A. lacustris* do rio São Francisco (Pazza et al., 2018) e dos rios costeiros (Kavalco et al., 2011).

Outras espécies problemáticas do gênero *Psalidodon* são *Psalidodon rivularis* e *Psalidodon rioparanaibanus*. A primeira espécie é complexo de espécies, evidenciado por sua variação morfológica e presença de diferentes citótipos de 46 e 50 cromossomos (Pasa et al., 2019; Rodrigues-Oliveira et al., 2023), já a segunda, é endêmica de um pequeno córrego no município de Rio Paranaíba (MG), sendo separada da espécie *P. paranae*, sua espécie irmã que ocorre no entorno, por análises morfométricas e genéticas (de Mesquita Alves et al., 2020).

Neste trabalho apresentamos um protocolo que denominamos “SatFisher Protocol”, baseado nos servidores públicos Galaxy Europe (The Galaxy Community, 2022) e RepeatExplorer (Novák et al., 2013). O protocolo tem como objetivos: 1- pré-processamento de dados brutos de NGS para montagem de satelitomas; 2- montagem e caracterização de satelitomas; 3- análises comparativas entre satelitomas de espécies próximas; 4- prospecções de satDNAs com potencial como marcadores moleculares ou citotaxonômicos; 5- validação e comparação quantitativa dos satDNAs por qPCR, 6- reprodutibilidade, replicabilidade e acessibilidade de todas as ferramentas utilizadas no protocolo por outros pesquisadores. Apesar de não apresentarmos, como usual em trabalhos com satDNAs, análises de FISH, a validação via FISH de nosso protocolo já foi realizada em nosso trabalho anterior (Rocha-Reis et al., 2024).

3.2 Materiais e Métodos

3.3.1 Coleta e Sequenciamento

Selecionamos para sequenciamento o DNA extraído a partir do tecido de exemplares armazenados no Banco de Tecidos e Suspensão do Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva da Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Rio Paranaíba, sob os números de voucher: LaGEEVo-2030 (macho de *P. rivularis*, 2n=46: 8m+20sm+8st+10a), LaGEEVo-2614 (macho de *P. aff. rivularis* M4, 2n=50: 8m+22sm+10st+10a), LaGEEVo-4285 (macho de *P. rioparanaibanus*), LaGEEVo-2096 (fêmea de *P. fasciatus* da bacia do Rio São Francisco),

LaGEEVo-4121 (macho de *A. altiparanae* da bacia do Rio Paranaíba) e LaGEEVo-3732 (macho de *A. lacustris* da bacia do rio São Francisco).

Os DNAs foram extraídos utilizando um kit da Invitrogen ©, seguindo as instruções do fabricante. Verificamos a qualidade do DNA extraído através de eletroforese em gel de Agarose 1% e a pureza em Nanodrop. Em seguida, enviamos as amostras para sequenciamento em um Novaseq 6000 (Illumina, São Diego, CA) na empresa Novogene, Reino Unido. Foram geradas duas bibliotecas de 2x150bp para cada amostra.

Para as análises laboratoriais deste trabalho, realizamos coletas em doze localidades da bacia do rio São Francisco, além de quatro locais da bacia do rio Paranaíba (Figura 1, Tabela 1). Todas as coletas e experimentos laboratoriais foram realizados em conforme com autorização do SISBIO (25634-9) atribuída a Karine Frehner Kavalco e aprovação do CEUA-UFV (Comissão de Ética no Uso de Animais, protocolo: 23/2023).

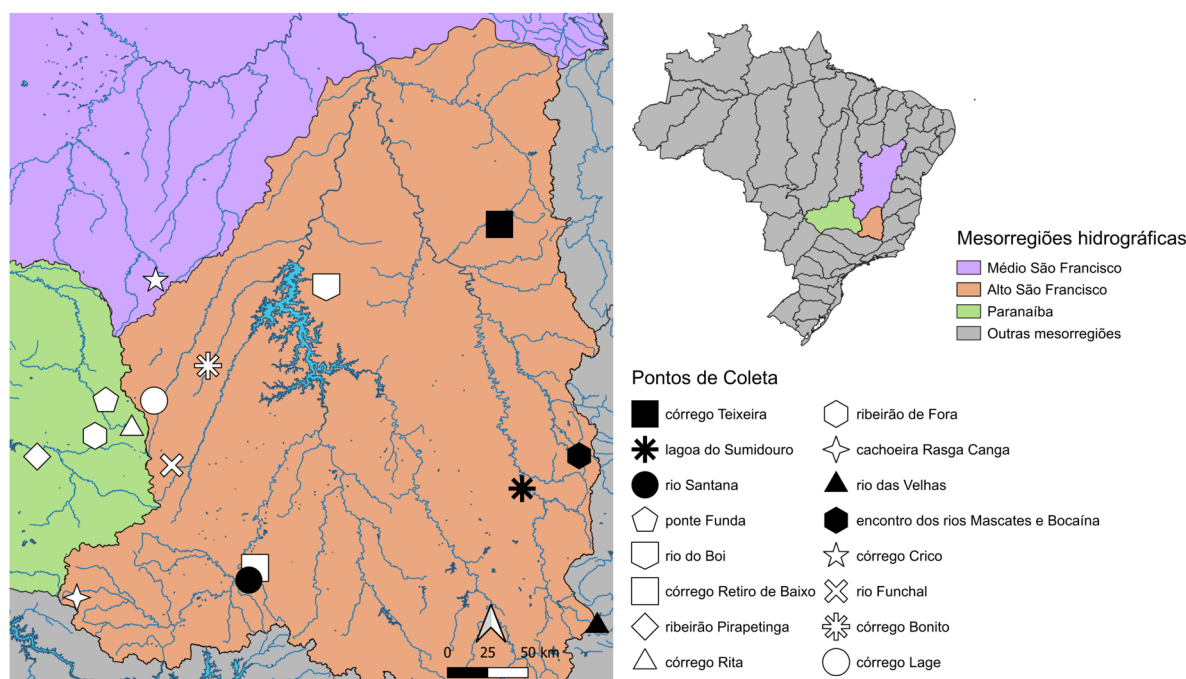


Figura 1: Mapa da área amostral, destacando as mesorregiões hidrográficas brasileiras aos quais os pontos de coleta pertencem.

3.2.2 Caracterização dos satelitomas e prospecção dos satDNAs

Os dados brutos de todos os genomas sequenciados foram importados na plataforma online Galaxy Europe (The Galaxy Community, 2022), onde realizamos o corte de qualidade, filtragem e remoção dos adaptadores usando a ferramenta fasp v0.23.2 (Chen et al., 2018) com

todos os parâmetros no default. Em seguida, utilizamos a ferramenta Trimmomatic v0.38 (Bolger et al., 2014) para cortar todos os reads em 100 pb. Por fim, realizamos uma reamostragem de 2x5000000 reads, que utilizamos em todas as análises subsequentes. Estes procedimentos fazem parte do pré-processamento dos dados brutos para montagem de satelitomas.

Tabela 1: Táxons amostrados por ponto de coleta e região hidrográfica. *P. rivularis* separado em quatro OTUs e mesorregião do Alto São Francisco dividida em porções leste e oeste, seguindo Rodrigues-Oliveira (em preparação).

Região hidrográfica	Pontos de coleta	Táxons amostrados
Leste do Alto rio São Francisco	Rio das Velhas	<i>P. rivularis</i> M1, 2n=46
		<i>P. aff. rivularis</i> M2, 2n=50
	Lagoa do Sumidouro	<i>A. lacustris</i>
		<i>P. fasciatus</i>
	Encontro dos rios Mascates e	<i>P. rivularis</i> M1, 2n=46
	Bocaina, PN Serra do Cipó	<i>P. aff. rivularis</i> M2, 2n=50
	Córrego Teixeira	<i>A. lacustris</i>
		<i>P. fasciatus</i>
	Rio do Boi	<i>P. fasciatus</i>
		<i>P. fasciatus</i>
Oeste do Alto rio São Francisco	Cachoeira Rasga Canga, PN Serra da Canastra	<i>P. aff. rivularis</i> M3, 2n=50
	Rio Santana	<i>P. fasciatus</i>
	Córrego Retiro de Baixo	<i>A. lacustris</i>
		<i>P. fasciatus</i>
	Rio Funchal	<i>P. rivularis</i> M1, 2n=46
		<i>P. aff. rivularis</i> M2, 2n=50
	Córrego Lage	<i>P. rivularis</i> M1, 2n=46
		<i>P. aff. rivularis</i> M2, 2n=50
	Córrego Bonito	<i>P. rivularis</i> M1, 2n=46
		<i>P. aff. rivularis</i> M4, 2n=50
Médio rio São Francisco Paranaíba	Córrego Crico	<i>P. rivularis</i> M1, 2n=46
	Córrego Rita	<i>P. rioparanaibanus</i>
	Ponte Funda	<i>P. aff. fasciatus</i>
	Ribeirão de Fora	<i>P. aff. paranae</i>

	Ribeirão Pirapitinga	<i>A. altiparanae</i>
		<i>P. fasciatus</i>
Aquariofilia	-	<i>A. cf. lacustris</i>
	-	<i>A. mexicanus</i>

Os dados pré-processados foram importados no servidor RepeatExplorer (Novák et al., 2013), onde receberam uma etapa adicional de processamento, com reamostragem de 500 mil reads e entrelaçamento das leituras fastq emparelhadas. Após este processo, executamos a ferramenta Tarean v2.3.8.1 (*Tandem Repeat Analysis*, Novák et al., 2017), com todos os parâmetros no default, para caracterização dos monômeros de satDNAs. Para caracterizar possíveis sequências não encontradas na primeira rodada, elaboramos um multifasta com todas as sequências dimeradas (ou replicadas até no mínimo 80 nucleotídeos), importamos servidor do Galaxy Europe e alinhamos as sequências contra nossas bibliotecas usando a ferramenta Bowtie2 v2.5.0 (Langmead & Salzberg, 2012), com a opção *very sensitive local*. Depois extraímos todos os reads não-alinhados e realizamos uma nova corrida no Tarean. Esse procedimento foi repetido até todas as sequências obtidas apresentassem menos de 0.05% de abundância genômica ou até totalizar 10 corridas.

Após todas as corridas, juntamos todas as sequências em uma única biblioteca. Eliminamos possíveis sequências de famílias multigênicas (rDNAs e elementos LTR) e removemos variantes da mesma família com o CD-HIT v4.8.1 (Fu et al., 2012) ao nível de similaridade de 80%. Após isso, alinhamos as bibliotecas de satDNAs contra as respectivas bibliotecas genômicas usando o Bowtie2 v2.5.0 (Langmead & Salzberg, 2012), com a opção *very sensitive local*, e extraímos estatísticas de bases mapeadas com o QualiMap BAM QC v2.2.2c (Okonechnikov et al., 2016) para o cálculo da abundância de cada satDNA no genoma. O conteúdo GC foi calculado com a ferramenta geecee e a distância intragenômica com a ferramenta Pairwise.seqs, ambas na plataforma Galaxy Europe.

Nós nomeamos as sequências de acordo com Ruiz-Ruano et al. (2016): Abreviação do nome da espécie + citótipo ou região do espécime + Sat + ordem decrescente de abundância da sequência no genoma + comprimento da sequência em pares de base (ex: Pri46Sat01-51). Seguindo os padrões de similaridade propostos por Ruiz-Ruano et al. (2016) para sequências de satDNAs, consideramos as sequências com mais de 50% de similaridade como pertencentes a mesma superfamília, as com mais de 80% de similaridade como pertencentes à mesma família,

e as com mais de 95% de similaridade como a mesma variante. Os valores de similaridades foram calculados com a ferramenta NCBI BLAST+ blastn (Cock et al., 2015).

Para as análises comparativas, juntamos as bibliotecas de satDNAs de todas as espécies em uma única biblioteca e acrescentamos as sequências de satDNAs de *P. paranae* disponíveis no genbank (Silva et al., 2017). Incluímos também sete genes de cópia única de peixes para padronização das coberturas de alinhamento e estimativa do número de cópias gênicas (*Astyanax mexicanus* fox2 protein, *A. mexicanus* lactbl1 mRNA, *A. mexicanus* ppfia1 mRNA, *Pygocentrus nattereri* coq6, *P. nattereri* msh4, *P. nattereri* zdhhc22 e *P. nattereri* znf106a). Nós eliminamos possíveis sequências redundantes entre as bibliotecas com o CD-HIT v4.8.1 (Fu et al., 2012) ao nível de similaridade de 80%, e alinhamos cada genoma contra nossa biblioteca total usando Bowtie2 v2.5.0 (Langmead & Salzberg, 2012), com a opção *very sensitive local*, e usamos o QualiMap BAM QC v2.2.2c (Okonechnikov et al., 2016) para extrair as estatísticas de cobertura do alinhamento. Construímos gráficos e realizamos análises comparativas no ambiente R v.4.4.2 (R Core Team, 2024) e R Studio v.2024.12.1+563 (Posit team, 2025).

As análises comparativas geradas no R (diagramas de Venn, gráficos de plot simples e análises de componentes principais) tiveram como objetivo verificar possíveis sequências compartilhadas entre as espécies com número de cópias gênicas discrepantes, e assim, possível aplicação como marcador molecular ou citotaxonômico. As sequências com maior potencial para este objetivo foram utilizadas nas análises laboratoriais.

3.3.3 Confeção dos primers e quantificação por qPCR

Com base nas análises de bioinformática, escolhemos 20 satDNAs para confecção dos primers (Pri46Sat1-51, Pri46Sat2-184, Pri46Sat4-91, Pri46Sat5-195, Pri46Sat6-592, Pri46Sat13-107, Pri46Sat33-191, Pri50Sat1-236, Pri50Sat5-152, Pri50Sat21-514, PrpSat1-236, PrpSat7-54, PrpSat27-191, PfaSFSat1-235, PfaSFSat3-434, AalSat1-178, AalSat3-549, AalSat9-93, AalSat50-418, AlaSFSat1-152). Usamos a ferramenta CircPrimer (Zhong & Feng, 2022) para alterar a sequência dos monômeros de satDNAs com o intuito de criar primers divergentes, de modo a amplificar apenas sequências que estejam em Tandem. Os primers foram desenhados no servidor Primer3Plus (Untergasser et al., 2007).

Para as reações de qPCR, usamos o supermix e protocolo da BIO-RAD (iTaQ Universal Probes Supermix) e monitoramos a reação com o corante fluorescente Diamond™ Nucleic Acid

Dye. As quantidades de cada reagente utilizadas na qPCR foram: 5ul do supermix, 0.25ul de Diamond Dye, 0.2 ul de cada Primer (diluídos em 100uM), 2.35 ul de água nuclease-free e 2ul de DNA (diluídos em 1ng/ul). As condições da reação foram conduzidas seguindo as instruções do fabricante do supermix: 5 minutos em 95°C para ativação da polimerase e desnaturação inicial do DNA e 40 ciclos com 5 segundos a 95°C para desnaturação, 60 segundos a 60°C para extensão e anelamento, e leitura da placa.

Verificamos a eficiência da amplificação em cada conjunto de primers utilizando a fórmula: $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) * 100$. Para isso, realizamos uma diluição seriada do DNA em um fator de 10x e conduzimos as reações de qPCR, em seguida, plotamos os valores dos Cts obtidos (em log) vs. a concentração do DNA, e conduzimos uma análise de Regressão para obter a inclinação da reta de regressão (*slope*). Para os casos necessários, incluímos um fator de correção nos cálculos de quantificação. Quantificamos os satDNAs utilizando o método ΔC_t : razão (referência/alvo) = $2^{C_t(\text{referência}) - C_t(\text{alvo})}$ (Bel et al., 2011), utilizando como referência o gene de cópia única *ypoxanthine phosphoribosyltransferase (hprt1)*. Todas as análises foram conduzidas em triplicata.

Seguindo as classificações do complexo *P. rivularis* (Rodrigues-Oliveira, em preparação), utilizamos nas reações seis exemplares de *P. rivularis* 2n=46, do oeste do Alto São Francisco (1973_Lage, 2070_Bonito e 4336_Funchal), leste do Alto São Francisco (5126_Velhas e 5177_Cipó) e Médio São Francisco (4326_Crico); quatro exemplares de *P. aff. rivularis* M2 2n=50, do oeste do rio São Francisco (4531_Lage e 5228_Funchal) e leste do rio São Francisco (5129_Velhas e 5175_Cipó); um exemplar de *P. aff. rivularis* M3 2n=50 (5068_Canastra) e um exemplar de *P. aff. rivularis* M4 2n=50 (2067_Bonito). Também utilizamos dois exemplares de *P. aff. paranae* (4200_Fora e 4202_Fora), quatro exemplares de *P. rioparanaibanus* (4857_Rita, 4858_Rita, 4577_Rita e 4583_Rita), cinco exemplares de *P. fasciatus* da bacia do rio São Francisco (4881_Santana, 4883_Santana, 2271_Boi, 5214_Sumidouro e 5275_Teixeira), quatro exemplares de *P. fasciatus* da bacia do rio Paraná (4077_Funda, 4078_Funda, 4111_Pirapitinga e 4112_Pirapitinga), dois exemplares de *A. "altiparanae"* (4119_Pirapitinga e 4121_Pirapitinga), dois exemplares de *A. lacustris* (4882_Retiro e 4884_Retiro), dois exemplares de *A. cf. lacustris* (4862_Aquario e 4863_Aquario) e um exemplar de *A. mexicanus* (601_Aquario).

3.3 Resultados

3.3.1 Satelitomas e análises In Silico

Ao todo realizamos 10 corridas de Tarean para todos os espécimes de *Psalidodon* amostrados, oito corridas para *A. "altiparanae"* e seis corridas para *A. lacustris*. As informações sobre as bibliotecas obtidas para cada genoma se encontram sumarizadas na Tabela 1. Informações detalhadas para cada família de satDNAs em cada satelitoma, como número de variantes, RUL (*repeat unit length*), conteúdo GC, abundância e divergência intragenômica se encontram no [material suplementar S1](#).

Tabela 1: Dados por biblioteca do número de famílias de satDNAs (variantes com 80% de similaridade) encontrados, número de variantes, tamanho mínimo e máximo dos monômeros da biblioteca (em pb), tamanho médio das sequências da biblioteca (em pb), porcentagem mínima e máxima no conteúdo GC dos monômeros da biblioteca e porcentagem média do conteúdo GC das sequências da biblioteca.

	Nº de famílias	Nº de variantes	Tamanho (variação)	Tamanho (média)	GC % variação	CG % média
<i>P. rivularis</i> , 2n=46	75	171	18 - 2062	330,92	23 - 61	41,11
<i>P. aff. rivularis</i> M4, 2n=50	87	398	18 - 5391	314,94	23 - 60	41,44
<i>P. fasciatus</i>	83	312	20 - 2009	296,84	22 - 68	41,17
<i>P. rioparanaibanus</i>	80	319	18 - 6017	475,5	23 - 67	42,5
<i>A. "altiparanae"</i>	70	125	19 - 4389	464,21	24 - 68	41,37
<i>A. lacustris</i>	58	67	18 - 3374	597,43	23 - 57	40,60

Após unir sequências de todas as famílias de satDNAs em uma única biblioteca (incluindo as de *P. paranae*) e remover variantes da mesma família, obtivemos um conjunto de 287 sequências diferentes, usadas nas análises comparativas. Nós pudemos observar que, com exceção de uma única sequência exclusiva de *P. fasciatus*, nenhuma sequência é exclusiva de nenhuma biblioteca, sendo a grande maioria (254 sequências), compartilhada entre todas (Figura 2A). Entretanto, quando consideramos apenas sequências com alto número de cópias gênicas (cobertura padronizada >100x), o número de sequências compartilhadas entre todas as bibliotecas cai consideravelmente (101 sequências), e o número de sequências com alto número de cópias “exclusivas” (ou seja, com mais de 100x de cobertura) variou de um em *A. altiparanae* até seis em *P. rivularis* 2n=50, com 29 “exclusivas” entre as espécies do gênero *Psalidodon* e 23 para o gênero *Astyanax* (Figura 2B).

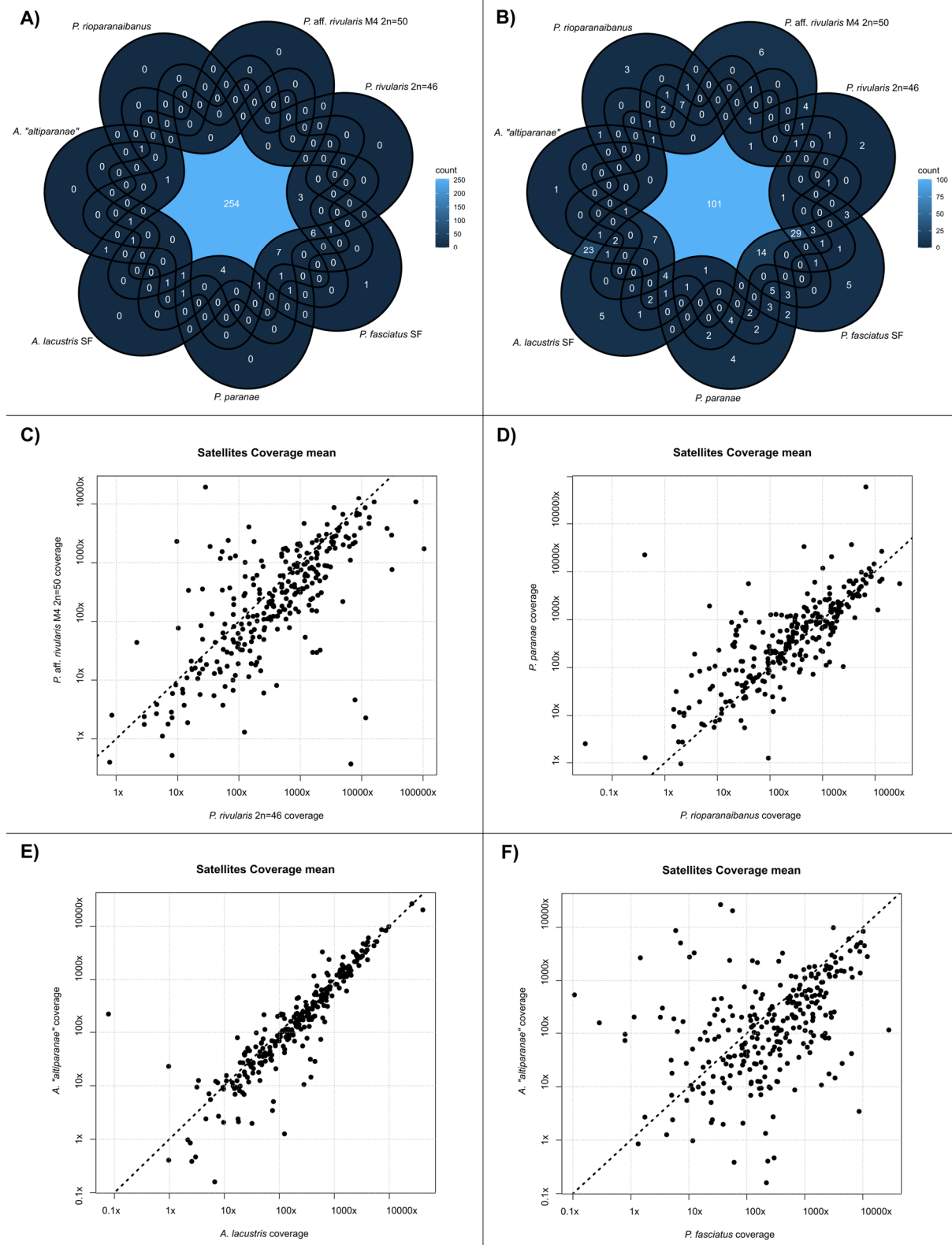


Figura 2: Diagramas de Venn evidenciando o compartilhamento de seqüências entre os genomas com mais de 0x de cópias estimadas (A) e no mínimo 100x de cópias estimadas (B). Comparações par-a-par entre o número de cópias estimadas entre os citótipos de *P. rivularis* sensu lato (C), *P. paranae* e *P. rioparanaibanus* (D), *A. lacustris* e *A. "altiparanae"* (E) e *A. "altiparanae"* e *P. fasciatus* (F).

Ao comparar a estimativa de cópias gênicas entre espécies irmãs (*P. rivularis* 2n=46 vs. *P. aff. rivularis* M4 2n=50, *P. paranae* vs. *P. rioparanaibanus* e *A. lacustris* vs. *A. altiparanae*), observamos grande variação neste parâmetro entre as espécies irmãs do gênero *Psalidodon*, com algumas situações em que o mesmo satDNA repetia-se mais de 1000x em um genoma e menos de 10x no genoma da outra espécie (Figura 2C e 2D). Essa discrepância nas coberturas de alinhamento chegou a ser maior entre os citótipos de *P. rivularis* sensu lato do que entre *P. paranae* e *P. rioparanaibanus*, mas em ambos os casos é possível prospectar sequências com grande possibilidade de servirem como marcadores moleculares e citotaxonômicos.

Ao contrário das espécies de *Psalidodon*, observamos nas espécies gênero *Astyanax* um padrão muito mais conservado deste parâmetro, com as sequências com coberturas mais discrepantes possuindo baixo valor de cobertura padronizada em ambos as bibliotecas (aproximadamente 100x), tornando mais desafiador a prospecção de marcadores considerando apenas a abundância/número de cópias para estas espécies (Figura 2E). Também realizamos uma comparação par a par dos valores de coberturas das sequências entre as bibliotecas de *A. "altiparanae"* e *P. fasciatus*. Como esperado, a comparação demonstrou o maior grau de diferenciação observado, com uma grande quantidade de sequências apresentando mil, ou mesmo 10 mil cópias em uma biblioteca e menos de cem cópias estimadas na outra, evidenciando a discrepância no número de cópias de diversos satDNAs entre *Astyanax* e *Psalidodon* (Figura 2F).

Algumas sequências, como AalSat1-178 e AlaSFSat1-151, aparentam ter alto número de cópias gênicas (cobertura > 10000x) apenas no gênero *Astyanax*, enquanto outras, como ApaSat01-51, PrpSat1-236, PrpSat20-27, PfaSFSat1-235 e Pri50Sat16-86, apenas no gênero *Psalidodon*. Várias sequências possuem valores discrepantes entre todas, ou quase todas as bibliotecas, e podem ter aplicação sozinhas, ou em conjunto, como marcadores específicos, como por exemplo: ApaSat1-51, AlaSFSat1-151, PrpSat1-236, Pri50Sat1-236, Pri46Sat2-184, Pri50Sat69-91, ApaSat20-18, ApaSat8-35, PfaSFSat1-235 e Pri46Sat81-41 (Figura 3A).

Quando nós analisamos a similaridade dos satelitomas através de uma Análise de Componentes Principais (PCA), onde os valores de cobertura de cada satDNA foi considerada como uma variável, percebemos que a PC1, responsável por 41,5% da variação, separa os satelitomas as espécies do gênero *Astyanax* (*A. lacustris* e *A. "altiparanae"*), das demais espécies do gênero *Psalidodon* (*P. paranae*, *P. rioparanaibanus*, *P. fasciatus* e os dois citótipos de *P. rivularis*), demonstrando que as bibliotecas de satDNAs podem ser utilizadas para diferenciar os dois gêneros irmãos. Já a PC2, responsável por 17,5% da variação, é responsável

principalmente por separar as espécies do gênero *Psalidodon*, embora aparentemente sem nenhuma correlação com as filogenias conhecidas do grupo (Figura 3B).

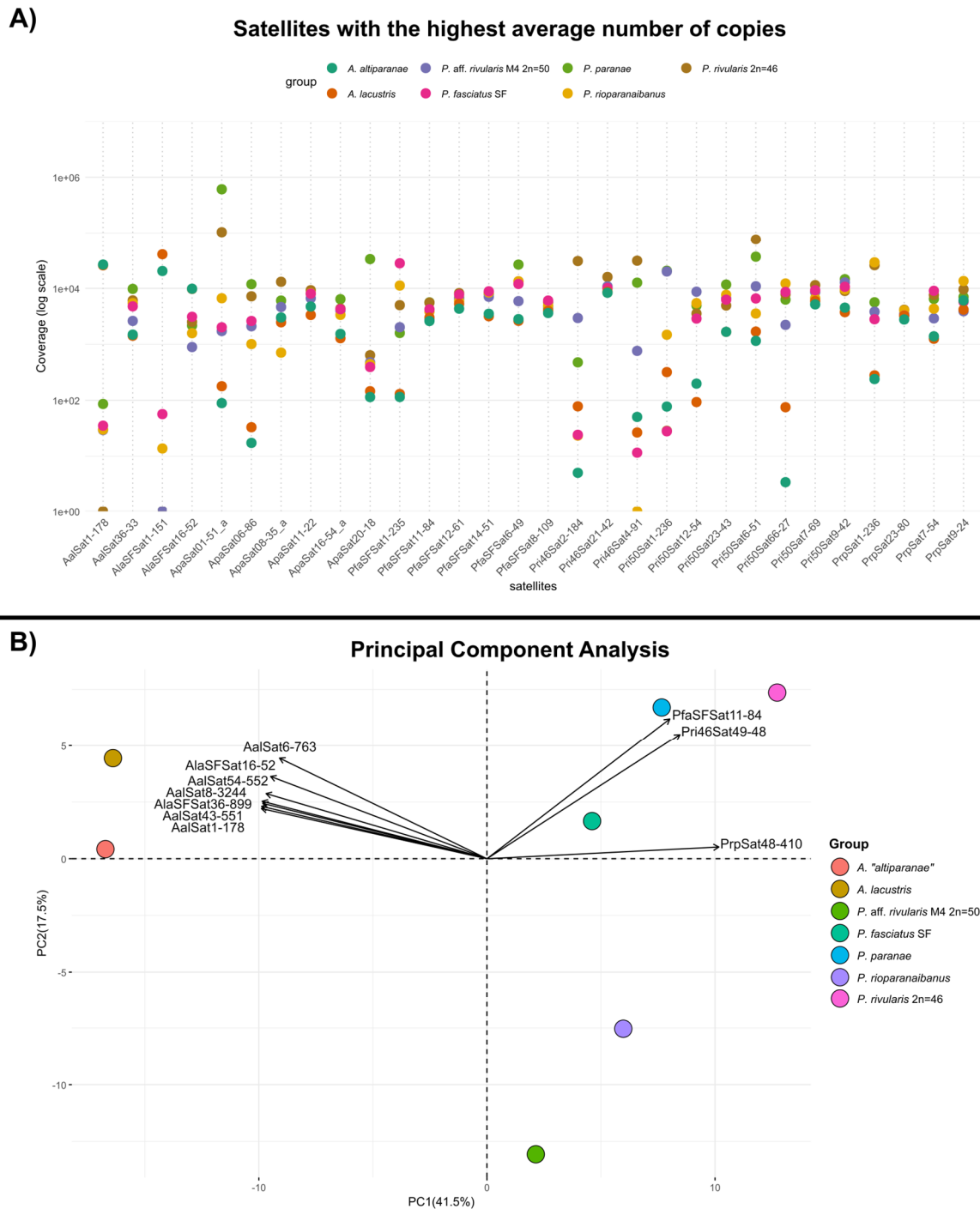


Figura 3: A) Comparação das trinta sequências com os maiores valores de cobertura média entre todas as bibliotecas. B) Análise de Componentes Principais dos satelitomas utilizando a cobertura de alinhamento padronizada de cada satDNA como uma variável. Os 10 satDNAs com maiores contribuições para as componentes principais estão evidenciados no gráfico.

3.3.2 Quantificações via qPCR

3.3.2.1 Falsos satDNAs ou experimentos falhos

Alguns dos satDNAs testados não amplificaram, ou amplificaram tardiamente em todos os indivíduos testados, apresentando valores de quantificação incompatíveis com DNAs satélites. Este foi o caso de AalSat3-549, AalSat9,93, Pri46Sat5-195, Pri46Sat6-592, PrpSat7-54, PrpSat27-191. Falhas na amplificação com primers de satDNAs caracterizados por ferramentas de bioinformática, como o Tarean ou o RepeatExplorer, são comuns em trabalhos com satelitomas, e podem corresponder a falso satDNAs, artefatos de técnicas ou problemas no design do primers (Silva et al., 2017; Silva et al., 2019; Goes et al., 2022; Rocha-Reis et al., 2024).

3.3.2.2 SatDNAs em *P. rivularis* sensu lato

Sete conjunto de primers puderam ser validados como satDNAs do grupo *P. rivularis*: Pri46Sat1-51, Pri46Sat2-184, Pri46Sat4-91, Pri46Sat13-107, Pri46Sat33-191, Pri50Sat1-236 e Pri50Sat5-152. Destes, apenas o Pri46Sat33-191 apresentou um número muito baixo de cópias estimadas (< 400) em todas as amostras testadas. Já os outros satDNAs validados para o grupo apresentaram mais de 8 mil cópias estimadas em pelo menos uma amostra (Figura 4). Os dados de homologia com satDNAs de outros trabalhos estão sumarizados na tabela 02.

Tabela 2: Dados de Homologia dos satDNAs validados no grupo *P. rivularis* com satDNAs de outros trabalhos disponíveis no banco de dados do NCBI nt. Referências: a = Silva et al., 2017; b = Goes et al., 2022; c = Mestriner et al., 2000; d = dos Santos, 2024.

	Homologia	Similaridade	Cobertura	e-value	Referência
Pri46Sat2-184	ApaSat27-178	93.53%	100%	5e-47	<i>P. paranae</i> ^a
	AlaSat29-185	86.36%	83%	5e-37	<i>A. lacustris</i> ^b
Pri50Sat1-236	PboSat02-235	98.36%	100%	1e-83	<i>P. bockmanni</i> ^b
	P0boSat04-235	82.35%	81%	3e-26	
	PfaSat23-236	82.35%	86%	1e-39	<i>P. fasciatus</i> ^b
	PfaSat02-237	82.02%	75%	2e-32	
	AlaSat08-236	84.18%	66%	3e-31	<i>A. lacustris</i> ^b
	ApaSat04-233	81.14%	74%	2e-28	<i>P. paranae</i> ^a
	ApaSat02-236	80.41%	98%	3e-20	
Pri46Sat4-91	ApaSat03-91	94.44%	99%	4e-29	<i>P. paranae</i> ^a

	PboSat38-91	91.86%	95%	2e-23	<i>P. bockmanni</i> ^b
	PfaSat13-91	95.83%	98%	1e-10	<i>P. fasciatus</i> ^b
	AlaSat01-91	95.45%	48%	2e-08	<i>A. lacustris</i> ^b
Pri50Sat5-152	PfaSat27-197	93.04%	76%	1e-37	<i>P. fasciatus</i> ^b
	AlaSat04-151	79.65%	91%	6e-11	<i>A. lacustris</i> ^b
Pri46Sat13-107	PboSat20-107	94.92%	99%	5e-15	<i>P. bockmanni</i> ^b
	ApaSat38-107	93.55%	100%	5e-15	<i>P. paranae</i> ^a
Pri46Sat1-51	PboSat03-39	100%	75%	6e-09	<i>P. bockmanni</i> ^b
	As51	97.44%	76%	7e-08	<i>P. scabripinnis</i> ^c
	PboSat01-51	100%	49%	0.093	<i>P. bockmanni</i> ^b
	ApaSat01-51	100%	49%	0.093	<i>P. paranae</i> ^a
	PfaSat01-51	100%	49%	0.093	<i>P. fasciatus</i> ^b
Pri46Sat33-191	CmoSat04-187	81.12%	74%	3e-20	<i>Cyphocharax modestus</i> ^d

Dentre os satDNAs validados, o Pri46Sat2-184 teve um número maior de cópias em todos os exemplares de *P. rivularis* 2n=46 testados, com exceção do córrego Crico do Médio São Francisco (1515±477 cópias), variando de 6540±173 a 10577±695 cópias nos exemplares do leste do Alto rio São Francisco e de 9745±728 até 16836±1016 cópias nos exemplares do oeste do Alto rio São Francisco. Nos exemplares de 2n=50 o número de cópias teve valores nulos ou próximos de 0 nos exemplares de *P. aff. rivularis* M2 no oeste do Alto rio São Francisco e no exemplar de *P. aff. rivularis* M3. Já os exemplares de *P. aff. rivularis* M2 do leste do Alto rio São Francisco (1139±95 a 2002±190 cópias) e *P. aff. rivularis* M4 (2286±387 cópias) apresentaram um número de cópias consideráveis, mas ainda significativamente menor do *P. rivularis* 2n=46 do Alto rio São Francisco (Figura 4A).

Já o Pri50Sat1-236 apresentou o padrão oposto do Pri46Sat2-184, com todos os exemplares de *P. rivularis* 2n=46 apresentaram baixos valores no número de cópias para este satélite, excluindo-se justamente a população do córrego Crico do Médio rio São Francisco que apresentou 1820±1486 cópias. Para as amostras do Alto rio São Francisco de *P. rivularis* 2n=46 observamos um número de 0-5 cópias nas amostras do oeste do Alto rio São Francisco e 57±3 a 134±52 cópias nos exemplares do leste do Alto rio São Francisco. Em contrapartida, todos os exemplares de 2n=50 cromossomos apresentaram mais de 2000 cópias para este satélite, com 2451±97 cópias em *P. aff. rivularis* M3, 9178±854 a 17880±164 cópias em *P. aff. rivularis* M2 do leste do Alto rio São Francisco, 33880±8166 cópias em *P. aff. rivularis* M4 e 50229±10311 a 107314±45306 cópias em *P. aff. rivularis* M2 do oeste do Alto rio São Francisco (Figura 4B).

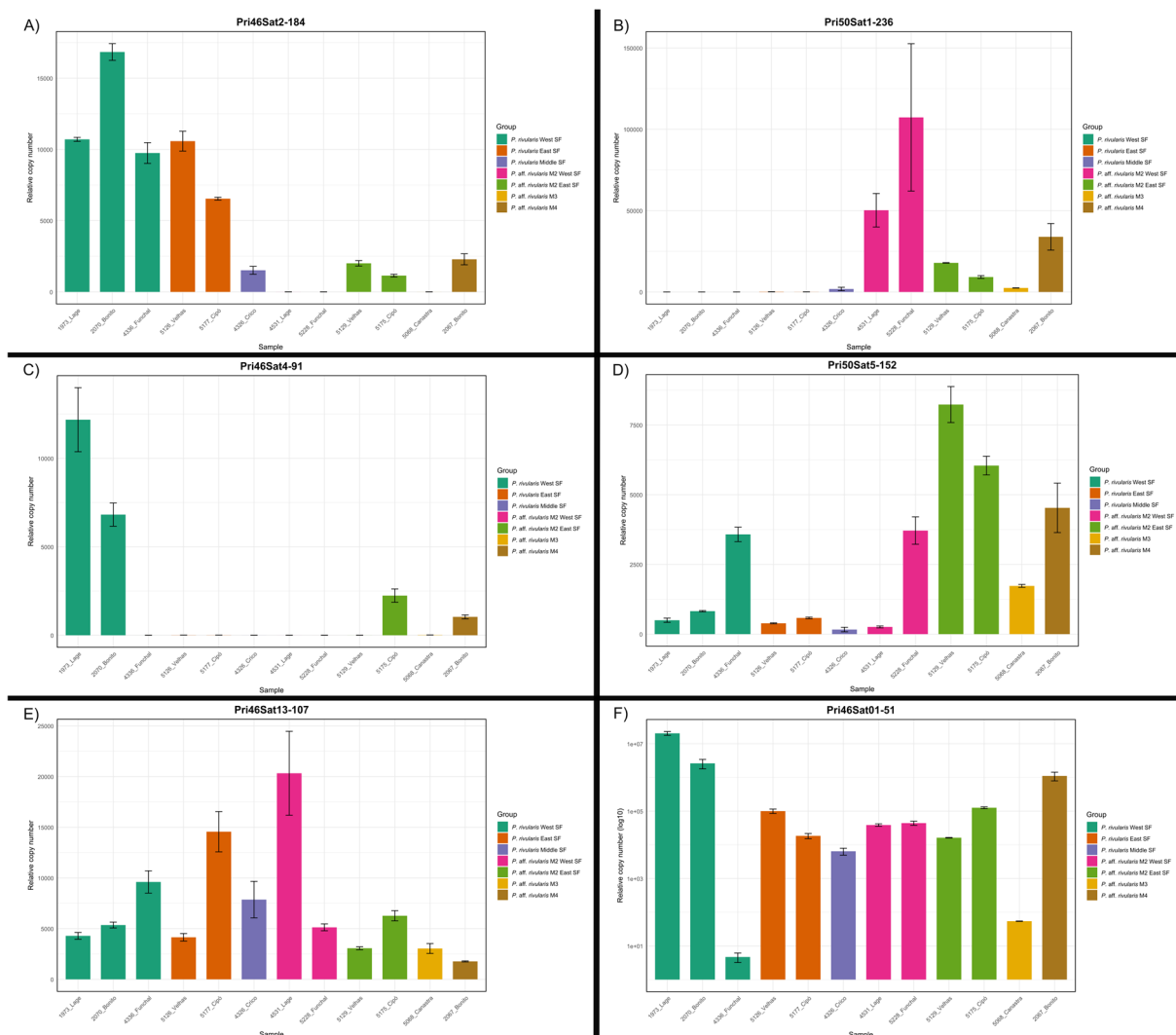


Figura 4: Número de cópias relativas de 6 satDNAs em 12 amostras do grupo *P. rivularis*, barras representam o erro padrão das triplicatas. **A)** Pri46Sat2-184. **B)** Pri50Sat1-236. **C)** Pri46Sat4-91. **D)** Pri50Sat5-152. **E)** Pri46Sat13-107. **F)** Pri46Sat01-51 (em log10).

O satDNA Pri46Sat4-91, por sua vez, demonstrou-se um interessante marcador populacional em exemplares de ambos os citótipos de *P. rivularis*. Este satélite apresentou valores quase nulos (entre 0 e 14 cópias) em quase todas as amostras, com quatro notáveis exceções. Duas destas exceções, dos córregos Lage e Bonito, pertencem ao grupo *P. rivularis* 2n=46 do oeste do Alto rio São Francisco, e apresentaram os valores mais altos no número de cópias para esta satDNA, 12184 ± 1809 e 6820 ± 655 respectivamente. As outras exceções são *P. aff. rivularis* M2 2n=50 do rio Cipó (leste do Alto rio São Francisco) e *P. aff. rivularis* M4 2n=50, com 2240 ± 375 e 1037 ± 111 cópias respectivamente (Figura 4C).

Outro satDNA que apresentou potencial como marcador molecular entre diferentes OTUs de *P. rivularis* foi o Pri50Sat5-152. Os maiores valores de quantificação foram observados em exemplares de *P. aff. rivularis* M2 2n=50 do leste do Alto rio São Francisco,

com 6041 ± 335 a 8231 ± 1118 cópias estimadas nesses exemplares. Em seguida, os maiores valores observados foram em *P. aff. rivularis* M4 $2n=50$, com 4527 ± 887 cópias, seguido pelos exemplares de ambos os citótipos do rio Funchal, *P. rivularis* $2n=46$ e *P. aff. rivularis* M2 $2n=50$, com 3575 ± 258 e 3711 ± 490 cópias, respectivamente. Por fim, a única outra amostra que apresentou um valor de quantificação com mais de mil cópias estimadas foi *P. aff. rivularis* M3 $2n=50$, com 1728 ± 51 cópias (Figura 4D).

Outros dois satDNAs, Pri46Sat13-107 e Pri46Sat01-51, aparentam estar distribuídos nos genomas de todas diferentes OTUs de *P. rivularis*, tornando difícil observar possíveis padrões que diferenciem as OTUs ou mesmo diferentes regiões hidrográficas. O satDNA Pri46Sat13-107 apresentou mais de mil cópias estimadas em todas as amostras, com o maior valor observado em *P. aff. rivularis* M2 $2n=50$ do córrego Lage, oeste do Alto rio São Francisco, com 20325 ± 4138 cópias estimadas. Entretanto, a outra amostra *P. aff. rivularis* M2 $2n=50$ do oeste do Alto rio São Francisco, pertencente ao rio Funchal, apresentou 5127 ± 337 cópias estimadas, sendo, portanto, comparável a alguns indivíduos de outras OTUs. O menor número de cópias estimados para este satDNA foi observado em *P. aff. rivularis* M4 $2n=50$, com 1770 ± 49 cópias (Figura 4E).

Por fim, o satDNA Pri46Sat1-51, homólogo ao muito tempo conhecido, As51 de *P. scabripinnis* (Mestriner et al., 2000) apresentou grande variação ao longo das amostras testadas. Com exceção dos exemplares de *P. rivularis* $2n=46$ do rio Funchal e *P. aff. rivularis* M3 $2n=50$ que apresentaram 4.7 ± 2.5 e 54 ± 1.4 cópias, respectivamente, todos os outros exemplares apresentaram elevado número de cópias, variando de 6437 ± 2591 no *P. rivularis* $2n=46$ do córrego Crico (Médio rio São Francisco) até 20426619 ± 4526913 *P. rivularis* $2n=46$ do córrego Lage (oeste do Alto rio São Francisco) (Figura 4F).

3.3.2.3 SatDNAs em *P. rivularis*, *P. rioparanaibanus*, *P. paranae* e *P. fasciatus*

Quatro conjunto de primers puderam ser validados como satDNAs do grupo *Psalidodon* como um todo: PrpSat1-236, PfaSFSat1-235, PfaSFSat3-434 e o já mencionado, Pri46Sat1-51. Dentre estes, PfaSFSat3-434 foi capaz de discriminar *P. fasciatus* dos demais *Psalidodon*, enquanto os outros se demonstraram promissores como satDNAs de *Psalidodon* com poucas cópias em *Astyanax* (Figura 5A – 5D, Tabela 3).

De acordo com as análises *In Silico*, o satDNA PrpSat1-236 é o mais abundante DNA satélite em *P. rioparanaibanus*. Apesar disso, tanto as análises *In Silico* quanto a qPCR mostraram que este satélite é amplamente disperso nos genomas de várias espécies de *Psalidodon*. Com exceção de um exemplar de *P. aff. rivularis* M2 2n=50, que apresentou 8838 ± 492 cópias estimadas, todos os demais *Psalidodon* testados (*P. rioparanaibanus*, *P. aff. paranae*, *P. rivularis* 2n=46 e *P. aff. rivularis* M4 2n=50) apresentaram mais de 90 mil cópias para esta sequência, variando de 90766 ± 6729 em *P. aff. rivularis* M4 2n=50 até 409504 ± 39664 em *P. paranae*. Contudo, nos *Astyanax* testados, esta sequência apresentou baixo número de cópias (0 em *A. "altiparanae"* e 68 ± 10 em *A. lacustris*), provando ser um bom marcador diferencial entre *Astyanax* e *Psalidodon* (Figura 5A).

Assim como o satDNA anterior, o satélite Pri46Sat1-51 apresentou ser um marcador interessante para todas as espécies testadas do gênero *Psalidodon*, além do grupo *P. rivularis*, porém com poucas cópias no gênero *Astyanax*, variando de 0 em *A. mexicanus* e *A. cf. lacustris* até 15 ± 1 em *A. lacustris* e *A. "altiparanae"*. Além de sua aplicação como marcador do gênero *Psalidodon*, este satDNA se demonstrou útil na diagnose dos espécimes de *P. fasciatus* da bacia do Paranaíba em relação a *P. aff. paranae*, *P. rioparanaibanus* e *P. fasciatus* da bacia do rio São Francisco, apresentando entre 142252 ± 2415 e 675131 ± 404635 cópias nestes espécimes vs. entre 900 ± 151 a 14393 ± 4563 cópias nos demais (Figura 5B).

O satDNA PfaSFSat1-235 foi inicialmente previsto para ser um marcador com um maior número de cópias em *P. fasciatus*, seguido por número alto em outros *Psalidodon* e baixo número em *Astyanax*, e ao menos em parte isto se refletiu na qPCR. Entre os *P. fasciatus* testados, um exemplar da bacia do rio São Francisco (15536 ± 6064) e os dois exemplares da bacia do rio Paraná (22302 ± 11410 e 21622 ± 7440) apresentaram os maiores valores do experimento, sendo aproximados apenas por um exemplar de *P. aff. paranae* (17686 ± 3267). Em contrapartida, um outro exemplar de *P. fasciatus* do rio São Francisco (córrego Retiro de Baixo) apresentou o menor valor entre os *Psalidodon* testados (552 ± 31) junto com *P. aff. rivularis* M2 2n=50 (663 ± 153). Todos os demais *Psalidodon* testados apresentaram valores entre 3035 ± 315 (*P. rivularis* 2n=46) e 7347 ± 317 (*P. aff. paranae*). Já os *Astyanax*, como esperado, apresentaram os menores valores do experimento, 9.9 ± 3 para *A. lacustris* e 4.5 ± 0.9 para *A. "altiparanae"* (Figura 5C).

Já o PfaSFSat3-434, assim como inicialmente previsto, aparenta ser um bom marcador ao distinguir *P. fasciatus* dos demais *Psalidodon* e *Astyanax* testados. Nos *P. fasciatus* a quantificação variou de 509 ± 140 até 1067 ± 451 , não havendo separação entre as amostras das

bacias do São Francisco e Paraná. Já nas demais amostras variou de 0 em *A. lacustris* e *A. "altiparanae"* até 28±10 em *P. rivularis* 2n=46 (Figura 5D).

3.3.2.4 SatDNAs em *A. altiparanae* e *A. lacustris*

Dois conjuntos de primers puderam ser validados como satDNAs de *Astyanax*: AlaSFSat1-152 e AalSat1-178. Ambos aparentam ser bons marcadores para os *Astyanax* sulamericanos, apresentando um número significativamente maior em *A. lacustris*, *A. "altiparanae"* e *A. cf. lacustris* do que em *A. mexicanus* e as diferentes espécies de *Psalidodon* (Figura 5E – 5F).

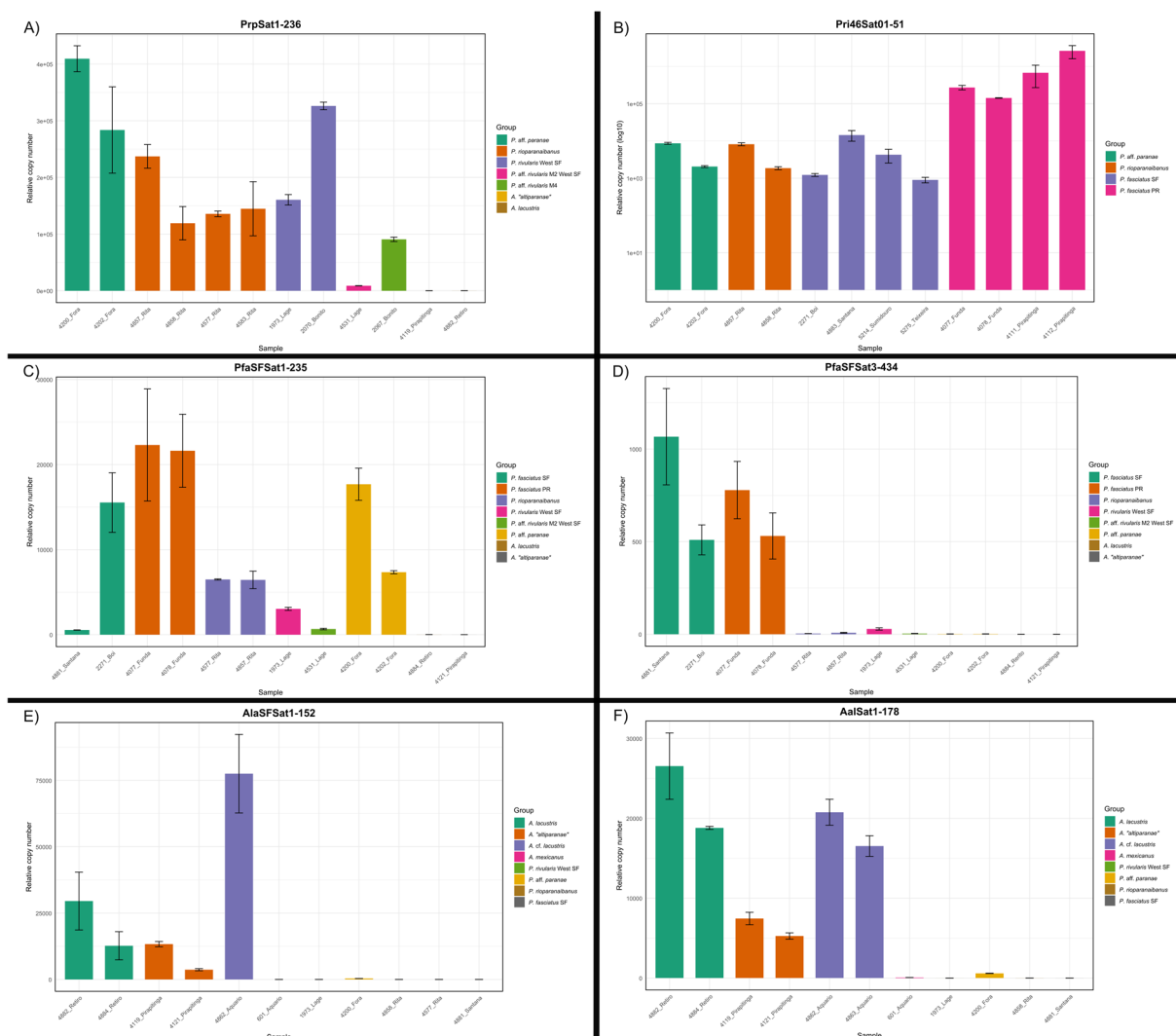


Figura 5: Número de cópias relativas a 6 satDNAs em amostras de *Psalidodon* e *Astyanax*, barras representam o erro padrão das triplicatas. **A)** PrpSat1-236. **B)** Pri46Sat01-51 (em log10). **C)** PfaSF46Sat1-235. **D)** PfaSFSat3-434. **E)** AlaSFSat1-152. **F)** AalSat1-178.

Apesar de inicialmente ter sido prospectado como um marcador diferencial em *A. lacustris* e *A. "altiparanae"*, o satDNA AlaSFSat1-152 falhou em discriminar essas duas espécies, mas se demonstrou um bom marcador molecular para diferenciar os *Astyanax* sulamericanos de *A. mexicanus* e *Psalidodon*. Os valores de quantificação foram praticamente nulos em *A. mexicanus* e em todas os exemplares de *Psalidodon* testados, com exceção de *P. paranae* (350 ± 10). Em contrapartida, apresentou altos valores em *A. "altiparanae"* (3667 ± 680 e 13322 ± 1697) e *A. lacustris* (12688 ± 9192 e 29543 ± 18888), alcançando o maior valor de quantificação em *A. cf. lacustris*, com 77546 ± 25642 (Figura 5E).

Um caso semelhante aconteceu com o satDNA AalSat1-178, que apresentou altos valores em todos os *Astyanax* sulamericanos testados, baixo valor em *A. mexicanus* (60 ± 7) e valores abaixo de 10 cópias em todos os *Psalidodon*, com exceção, novamente, de *P. paranae* (583 ± 41). Observamos também que este satélite conseguiu discriminar *A. "altiparanae"* de *A. lacustris* e *A. cf. lacustris*, apresentando número menor de cópias em *A. altiparanae* (5260 ± 690 a 7449 ± 1351 , vs. 18798 ± 332 a 26537 ± 7194 em *A. lacustris* e 16526 ± 2236 a 20759 ± 2815 em *A. cf. lacustris*) (Figura 5F).

Tabela 3: Dados de Homologia dos satDNAs validados de *Astyanax* e *Psalidodon* com satDNAs de outros trabalhos disponíveis no banco de dados do NCBI nt. Referências: a = Silva et al., 2017; b = Goes et al., 2022.

	Homologia	Similaridade	Cobertura	e-value	Referência
AalSat1-178	AlaSat02-186	100%	100%	3e-54	<i>A. lacustris</i> ^b
	ApaSat10-179	94.70%	93%	1e-48	<i>P. paranae</i> ^a
AlaSFSat1-151	AlaSat04-151	94.85%	100%	1e-32	<i>A. lacustris</i> ^b
	PfaSat27-197	81.25%	53%	2e-06	<i>P. fasciatus</i> ^b
PfaSFSat1-235	ApaSat04-233	99.03%	99%	5e-98	<i>P. paranae</i> ^a
	PfaSat02-237	100%	100%	9e-61	<i>P. fasciatus</i> ^b
	P0boSat04-235	97.64%	100%	2e-52	<i>P. bockmanni</i> ^b
	ApaSat02-236	81.25%	94%	1e-39	<i>P. paranae</i> ^a
	AlaSat08-236	84.50%	91%	4e-24	<i>A. lacustris</i> ^b
	PboSat02-235	84.54%	88%	3e-15	<i>P. bockmanni</i> ^b
	PfaSat23-236	83%	41%	2e-12	<i>P. fasciatus</i> ^b

PrpSat1-236	ApaSat02-236	96.97%	100%	7e-87	<i>P. paranae</i> ^a
	PfaSat23-236	98.15%	100%	7e-72	<i>P. fasciatus</i> ^b
	ApaSat04-233	82.55%	99%	6e-48	<i>P. paranae</i> ^a
	AlaSat08-236	86.32%	49%	1e-24	<i>A. lacustris</i> ^b
	PboSat02-235	83.46%	56%	4e-24	<i>P. bockmanni</i> ^b
	P0boSat04-235	83.17%	42%	6e-13	<i>P. bockmanni</i> ^b
PfaSFSat3-434	-	-	-	-	-

3.4 Discussão

Neste trabalho nós realizamos a montagem de seis novos satelitomas para os gêneros *Astyanax* e *Psalidodon*. Apesar dos satelitomas de duas das espécies que montamos, *A. lacustris* e *P. fasciatus*, não serem necessariamente inéditos, uma vez que já possuem montagens publicadas (Goes et al., 2022), nossas montagens provém de espécimes de mesorregiões hidrográficas diferentes das montagens anteriores, pertencendo a bacia hidrográfica dos tipos dessas amostras e, como tem sido amplamente discutido na literatura nos últimos anos, é extremamente provável que amostras de outras bacias hidrográficas, em especial do Paraná, não pertençam a estes táxons previamente apresentados (Gavazzoni et al., 2023, 2024). Para além das montagens, nós também realizamos análises comparativas entre os satelitomas destas espécies *in silico* e *in vitro* pela técnica de qPCR, o que nos permitiu visualizar as diferenças quantitativas em relação ao número de cópias de diferentes satDNAs compartilhados entre estes grupos, o que está em acordo com a “Hipótese da Biblioteca” (Fry & Salser, 1977; Ruiz-Ruano et al., 2016). Essas diferenças também nos permitiram validar sequências como marcadores moleculares e taxonômicos, constituindo mais um exemplo da aplicabilidade de satDNAs no estudo de relações filogenéticas e taxonômicas em espécies próximas (Dias et al., 2021; Goes et al., 2022; Silva et al., 2023; Rocha-Reis et al., 2024).

De acordo com Rodrigues-Oliveira (em preparação), o complexo de espécies *P. rivularis* sensu lato pode ser distinguido em cinco diferentes OTUs: *P. rivularis* sensu stricto, que apresenta 2n=46 cromossomos, e outras quatro OTUs com 2n=50 cromossomos: *P. aff. rivularis* M2 do leste do Alto São Francisco, *P. aff. rivularis* M2 do oeste do Alto rio São Francisco, *P. aff. rivularis* M3 e *P. aff. rivularis* M4. Quando analisados três satDNAs em

conjunto, conseguimos discriminar todas estas OTUs, com diferenças adicionais entre *P. rivularis* 2n=46 do Médio e Alto São Francisco (Tabela 4). Destes três satDNAs, um deles (Pri50Sat1-236) é homólogo aos satDNAs ApaSat02-236 e ApaSat04-233, conhecidos por marcações positivas nos centrômeros de pelo menos três espécies de *Psalidodon* (Silva et al., 2017; Goes et al., 2022).

Tabela 4: SatDNAs que apresentaram o maior potencial diagnóstico entre as cinco OTUs de *P. rivularis* sensu lato e entre as amostras do Médio e Alto São Francisco de *P. rivularis* 2n=46.

OTU	Pri46Sat2-184	Pri50Sat1-236	Pri50Sat5-152
<i>P. rivularis</i> Alto SF	> 6 mil	0 – 200	< 4 mil
<i>P. rivularis</i> Médio SF	1 mil – 2 mil	800 – 3 mil	< 300
<i>P. aff. rivularis</i> M2, Leste	1 mil – 3 mil	9 mil – 18 mil	6 mil – 9mil
<i>P. aff. rivularis</i> M2, Oeste	0 – 10	> 50 mil	< 4 mil
<i>P. aff. rivularis</i> M3	0 - 10	2 mil – 3 mil	< 2 mil
<i>P. aff. rivularis</i> M4	1 mil – 3 mil	20 mil – 50 mil	4 mil – 6 mil

Além disso, observamos um cenário interessante com o Pri46Sat1-51, um satDNA que pertence à mesma família do satDNA As51 (Mestriner et al., 2000). Este é o único satDNA hibridizado nos cromossomos de *P. rivularis* até o momento (Abel et al., 2006), sendo que, em uma população de *P. rivularis* com 2n=50, Abel et al. (2006) observaram variação interindividual, com marcações terminais e subterminais nos braços longos de cromossomos acrocêntricos e subtelocêntricos, enquanto que, em exemplares de uma população de 2n=46 cromossomos, não foram observadas quaisquer marcações positivas para este satélite. Aqui, pudemos observar que o Pri46Sat1-51 apresenta grandes variações interindividuais em todas as OTUs testadas, mas especialmente em *P. rivularis* 2n=46, que apresentou tanto o menor (4.7 ± 2.5) quanto o maior (20426619 ± 4526913) valor de quantificação.

Apesar do satDNA Pri46Sat1-51 não ter se demonstrado um bom marcador molecular para o grupo *P. rivularis* sensu lato, o mesmo não pode ser dito para o grupo *P. fasciatus*. Este satDNA foi extremamente eficiente em separar as amostras de *P. fasciatus* da bacia do Alto Paraná das amostras do Alto São Francisco, com mais de 140 mil cópias na primeira vs. menos de 15 mil na segunda. Do ponto de vista cromossômico, populações de *P. fasciatus* do rio

Grande (bacia do Alto Paraná) e populações do rio São Francisco podem ser diferenciados em dois cariomorfos distintos de acordo com diferenças em sítios de heterocromatina constitutiva, rDNAs 5S e 18S, e claro, sítios de As51 (Peres et al., 2009). No que diz respeito a sítios de As51, amostras pertencentes a bacia do rio São Francisco apresentam de 1 a 3 marcações positivas na região terminal de cromossomos acrocêntricos ou subtelocêntricos, enquanto amostras pertencentes a bacia do Alto rio Paraná apresentam de 10 a 14 sítios em regiões terminais e intersticiais de cromossomos submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos (Kantek et al., 2009; Peres et al., 2009; Gavazzoni et al., 2023). Desta forma, notamos que nossos resultados com quantificação *in vitro* do Pri46Sat1-51 são amplamente consistentes com dados de FISH com As51 da literatura, além de corroborar a tese que amostras de “*P. fasciatus*” do Alto Paraná e representam um táxon distinto de *P. fasciatus* do rio São Francisco (de Melo & Buckup, 2006; Kavalco et al., 2013; Gavazzoni et al., 2023).

Outro grupo de espécies irmãs que nossas análises puderam discriminar foram *A. lacustris* e *A. “altiparanae”* através da quantificação do satDNA AalSat1-178, com mais de 18mil cópias na primeira vs. menos de 8mil cópias na segunda. Apesar deste resultado, devemos ter cautela ao considerar este satDNA como um marcador para o grupo, uma vez que a diferenciação observada na qPCR não tinha sido observada nas análises *in silico*, onde ambas os grupos apresentaram valores semelhantes de quantificação, além de que não possuímos, até o momento, dados de FISH para embasar os dados de qPCR. Entretanto, é importante destacar também o conflito taxonômico que cerca estas duas espécies. *A. altiparanae*, junto com *Astyanax assuncionensis* e *Astyanax jacuhiensis*, foram sinonimizadas a *A. lacustris* em 2016 com base em dados morfológicos (Lucena & Soares, 2016), mas essa sinonímia foi contestada em diferentes ocasiões com o suporte de dados citogenéticos, morfométricos e moleculares para a distinção destas OTUs em diferentes espécies (Cunha et al., 2019; Gavazzoni et al., 2024). Desta forma, reforçamos a necessidade de se caracterizar e testar possíveis marcadores para estas espécies.

O único par de espécies irmãs para as quais não pudemos validar nenhum marcador diagnóstico foi entre *P. rioparanaibanus* e *P. aff. paranae*. Entretanto, a razão para isso pode ter ocorrido devido nossas as análises *in silico* terem envolvido uma amostra de *P. paranae* da bacia do rio Tietê, enquanto, as análises de qPCR envolveram amostras de *P. aff. paranae* da bacia do rio Paranaíba. Como demonstrado em outro trabalho nosso com dados do genoma mitocondrial completo e análises multilocus de dados de sequenciamento de nova geração (Rodrigues-Oliveira, em preparação), amostras de “*P. paranae*” pertencentes a estas bacias

provavelmente não pertencem à mesma espécie, e desta forma, o fato dos experimentos de qPCR não terem confirmado os marcadores diferenciais das análises *in silico* pode significar que nosso protocolo pode ser extremamente sensível a localizar diferenças centradas nas bibliotecas comparadas.

Nossas análises também nos permitiram validar um marcador que diferencie *P. fasciatus* de todas as demais amostras testadas (PfaSFSat3-434), diversos marcadores diagnósticos entre *Astyanax* e *Psalidodon* (PrpSat1-236, Pri46Sat1-51 e PfaSFSat1-235) e marcadores que diferenciam os *Astyanax* sulamericanos não só de *Psalidodon*, mas também de *A. mexicanus* (AlaSFSat1-152 e AalSat1-178). Nossos resultados são consistentes com o estudo comparativo de satelitos de *Astyanax* e *Psalidodon* conduzido por Goes et al. (2022), onde os autores descreveram muitas famílias de satDNAs compartilhadas entre os dois gêneros, com diferenças relacionadas a abundância das famílias nos genomas e detecção dos mesmos pela FISH. Os próprios PrpSat1-236 e PfaSFSat1-235 mencionados aqui, junto com o Pri50Sat1-236, são homólogos aos satDNAs ApaSat02-236 e ApaSat04-233 de *P. paranae* e ao Alasat08-236 de *A. lacustris*. Esta superfamília, compartilhada nos genomas de *Astyanax* e *Psalidodon*, é conhecida por apresentar sítios detectáveis via FISH nos centrômeros de todos os cromossomos de diferentes espécies de *Psalidodon*, mas nenhum sinal positivo foi observado em *A. lacustris* (Goes et al., 2022).

Várias razões podem explicar as diferenças quantitativas em bibliotecas de satDNAs e a homogeneização diferencial de variantes compartilhadas entre grupos próximos, ambos casos previstos pelo “Hipótese da biblioteca”, como funções biológicas associadas aos satDNAs (Fry & Salser, 1977), capacidade de amplificação sem ocasionar vantagens ou desvantagens ao genoma hospedeiro (Orgel & Crick, 1980) e mecanismos estocásticos associados a evolução concertada (Ruiz-Ruano et al., 2016). Em contraste com uma visão clássica do satDNA como um “DNA lixo”, “egoísta” ou mesmo “parasita” (Orgel & Crick, 1980), evidências de transcritos derivados de satDNAs têm evidenciado uma ampla gama de funções biológicas importantes para estes elementos, como formação da heterocromatina (Usakin et al., 2007), ações na segregação cromossômica (Rošić et al., 2014) e mecanismos de compensação de dosagem associados a cromossomos sexuais (Menon et al., 2014). Desta forma, três papéis principais podem ser associados aos satDNAs: função do centrômero, formação e silenciamento de heterocromatina e regulação gênica (Kuhn, 2015; Šatović-Vukšić & Plohl, 2023). Embora pouco se saiba sobre as funções biológicas dos satDNAs em *Astyanax* e *Psalidodon*, a presença constante de satDNAs das mesmas famílias/superfamílias nos centrômeros de *Psalidodon*

sugere uma função centromérica estrutural (Goes et al., 2022). Como demonstramos aqui, as diferentes variantes destas famílias possuem grandes diferenças quantitativas entre os genomas de diferentes espécies de *Psalidodon*, o que pode levar a possíveis incompatibilidades entre transcritos de satDNAs e proteínas centroméricas, ocasionando instabilidade genômica em híbridos e contribuindo para o processo de especiação (Kuhn, 2015).

Nosso trabalho foi capaz de mostrar como bibliotecas de satDNAs podem auxiliar de forma significativa como marcadores taxonômicos em espécies de *Psalidodon* e *Astyanax*. Mais do que isso, ressaltamos que as diferenças quantitativas observadas em satDNAs com possíveis funções biológicas podem estar contribuindo para a especiação nestes gêneros. Neste caso, uma vez que pouco se sabe sobre os aspectos funcionais de satDNAs nestes grupos, reforçamos a necessidade de se responder, no futuro, até que ponto as diferenças observadas são um mero testemunho da evolução do grupo, ou uma importante parte causal dela.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Desde a descrição de *Tetragonopterus rivularis* por Lütken, em 1875, em sua obra *Velhas-Flodens Fiske*, até minha dissertação de mestrado, defendida em 2021, uma intrigante pergunta foi o cerne da realização deste trabalho: até que ponto existe uma biodiversidade oculta, e subestimada, sob o nome “*Psolidodon rivularis*”? A imprescindível obra de Lütken é, sem dúvidas, um marco para a ictiologia brasileira, e diversos enigmas podem ser extraídos de suas excelentes ilustrações, descrições taxonômicas e demais informações biológicas, cuidadosamente descritas por ele. Mas aqui, o enigma inicial provém da simples ilustração de dois espécimes de piabas-do-córrego, claramente diferentes, alocados sob um mesmo nome na prancha V de sua obra.

Este enigma ganhou nova forma e destaque à medida que mais estudos foram feitos com os *P. rivularis* nestes últimos 150 anos, em que espécimes com diferentes citótipos e linhagens genéticas foram estudados, e adaptações morfológicas e fisiológicas associadas a diferentes ambientes foram observadas. Aqui, ao integrar diferentes fontes de dados, pudemos chegar à conclusão de que este grupo corresponde a pelo menos cinco espécies diferentes distribuídas ao longo da bacia do Alto rio São Francisco, uma delas correspondente ao *Hemigrammus santae*, agora *Psolidodon santae*, de Eigenmann (1907).

É importante destacar que essa notável biodiversidade parece ter sido o fruto de vários processos evolutivos diferentes atuando em conjunto, como rearranjos cromossômicos ocasionando isolamento reprodutivo, adaptações morfológicas permitindo a exploração de diferentes nichos ecológicos, hibridismos com outras espécies e eventos geológicos de diferentes magnitudes, que podem ter levado tanto a processos de dispersão como de vicariância. É importante também destacar os ainda preliminares, porém interessantes avanços que a genômica tem nos trazido a respeito da evolução destas espécies, exemplificados neste trabalho com o estudo comparativo da quantificação de DNAs satélites, que podem ser tanto testemunhas, como agentes ativos na especiação deste grupo de peixes.

Apenas com essa compreensão multidisciplinar é possível ter um panorama real da evolução e especiação do grupo *P. rivularis* no Alto rio São Francisco, e foi essa compreensão que inspirou a escolha da epígrafe desta tese: um diálogo memorável do personagem Ian Malcolm no filme Jurassic Park que termina com a icônica frase: “a vida encontra um meio”. No caso de *P. rivularis*, esse meio não só explica a diversidade de possíveis táxons do grupo, mas os diversos casos de simpatria observados entre estes táxons.

É importante ressaltar também a importância que a compreensão da diversidade taxonômica e genética de *P. rivularis* tem na conservação, não só das mesmas como do ambiente em que vivem, especialmente quando consideramos o cenário atual das bacias do Alto rio São Francisco e Paranaíba em Minas Gerais. Durante a realização das coletas para este trabalho pudemos testemunhar diversos impactos e ameaças aos córregos e rios dessas bacias, como o derramamento de lama oriundo de um empreendimento imobiliário na cabeceira do córrego Rita, lar da espécie endêmica *P. rioparanaibanus*, o descarte de efluentes em um córrego que conflui junto ao córrego Rita para o córrego Água Grande, afluente do rio Paranaíba, o descarte de carcaças de animais, como bezerros e galinhas, dentro dos rios Borrachudo e Paranaíba nos municípios de Matutina e Carmo do Paranaíba, nas bacias do São Francisco e Paranaíba, respectivamente, além de diversos casos de perda da mata ciliar e poluição com resíduos agrários em afluentes dos rios Indaiá e Abaeté. Felizmente, observamos também que três das cinco espécies de *P. rivularis* se encontram em duas Unidades de Conservação brasileiras, o Parque Nacional Serra da Canastra e o Parque Nacional Serra do Cipó, evidenciando a importância que as UCs têm na conservação da biodiversidade.

Finalizamos, enfatizando aqui a importância na preservação de córregos, cabeceiras de rios, e demais corpos d'água de menor porte. Como observamos em nosso trabalho, esses ambientes, muitas vezes negligenciados, são mais complexos do que aparentam e tem potencial de abrigar uma rica biodiversidade de espécies, genomas e microambientes.

REFERÊNCIAS

- Abel, L. D. dos S., Mantovani, M., & Moreira-Filho, O. (2006). Chromosomal distribution of the As51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 29, 448–452.
- Aguilar-Medrano, R. (2013). Body shape evolution of *Chromis* and *Azurina* species (Perciformes, Pomacentridae) of the eastern Pacific. *Animal Biology*, 63(2), 217–232.
- Baird, S. F., & Girard, C. F. (1854). *Descriptions of new species of fishes collected in Texas, New Mexico and Sonora, by Mr. John H. Clark, on the US and Mexican boundry survy and in Texas by Capt. Stewart Van Vliet, USA*.
- Bel, Y., Ferré, J., & Escriche, B. (2011). Quantitative real-time PCR with SYBR Green detection to assess gene duplication in insects: Study of gene dosage in *Drosophila melanogaster* (Diptera) and in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera). *BMC Research Notes*, 4(1), 84. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-84>
- Benson, G. (1999). Tandem repeats finder: A program to analyze DNA sequences. *Nucleic acids research*, 27(2), 573–580.
- Benton, M. J., Donovan, S. K., & Paul, C. R. C. (1998). The quality of the fossil record of the vertebrates. *The adequacy of the fossil record*, 269–303.
- Bertaco, V. A., Carvalho, F. R., & Jerep, F. C. (2010). *Astyanax goyanensis* (Miranda-Ribeiro, 1944), new combination and *Astyanax courensis*, new species (Ostariophysi: Characiformes): two Characidae from the upper rio Tocantins basin, Central Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 8, 265–275. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252010000200004>

- Bertaco, V. A., & de Lucena, C. A. (2006). Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. *Neotropical Ichthyology*, 4, 53–60.
- Bertaco, V. A., & Malabarba, L. R. (2001). Description of two new species of *Astyanax* (Teleostei: Characidae) from headwater streams of Southern Brazil, with comments on the " *A. scabripinnis* species complex". *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 12(3), 221–234.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., & Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3), 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>
- Biscotti, M. A., Olmo, E., & Heslop-Harrison, J. S. (2015). Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Research*, 23(3), 415–420.
<https://doi.org/10.1007/s10577-015-9499-z>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120.
- Britski, H. A., Sato, Y., & Rosa, A. B. S. (1988). Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). 3ª edição. *Brasília: CODEVASF, Divisão de Psicultura e Pesca*.
- Campos, J. E. G., & Dardenne, M. A. (1997). Origem e evolução tectônica da Bacia Sanfranciscana. *Revista Brasileira de Geociências*, 27(3), 283–294.
- Casatti, L., & Castro, R. M. C. (1998). A fish community of the São Francisco River headwaters riffles, southeastern Brazil. *Ichthyological exploration of freshwaters*, 9, 229–242.

- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884–i890.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- Cock, P. J., Chilton, J. M., Grüning, B., Johnson, J. E., & Soranzo, N. (2015). NCBI BLAST+ integrated into Galaxy. *Gigascience*, 4(1), s13742-015.
- Cunha, M. S., Fregonezi, A. R., Fava, L., Hilsdorf, A. W. S., Campos, L. A. O., & Dergam, J. A. (2019). Phylogeography and Historical Biogeography of the *Astyanax bimaculatus* Species Complex (Teleostei: Characidae) in Coastal Southeastern South America. *Zebrafish*, 16(1), 115–127. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1668>
- Cursino, M., Salviano, M., Abril, V., Zanetti, E. D., & Duarte, J. M. (2014). The role of chromosome variation in the speciation of the red brocket deer complex: The study of reproductive isolation in females. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 40.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-40>
- Dagosta, F. C., & Pinna, M. de. (2017). Biogeography of Amazonian fishes: Deconstructing river basins as biogeographic units. *Neotropical Ichthyology*, 15(3), e170034.
- D'Arcy, W. T. (1942). On growth and form. *Cambridge Univ. Press*, 1(6), 7.
- de Andrade e Santos, H., dos Santos Pompeu, P., & Kenji, D. O. L. (2012). Changes in the flood regime of São Francisco River (Brazil) from 1940 to 2006. *Regional Environmental Change*, 12(1), 123–132. <https://doi.org/10.1007/s10113-011-0240-y>
- de Melo, F. A., & Buckup, P. A. (2006). *Astyanax henseli*, a new name for *Tetragonopterus aeneus* Hensel, 1870 from southern Brazil (Teleostei: Characiformes). *Neotropical Ichthyology*, 4, 45–52.

- de Mesquita Alves, R., Oliveira, I. H. R., Pasa, R., & Kavalco, K. F. (2020). A new species of genus *Psalidodon* Eigenmann, 1911 related to the *P. paranae* complex (Characiformes Characidae) from Upper Paranaíba river basin, Brazil, supported by genetic and morphometric data. *Biodiversity Journal*, 11(4), 807–814.
- De Ré, F. C., Robe, L. J., Wallau, G. L., & Loreto, E. L. S. (2017). Inferring the phylogenetic position of the *Drosophila flavopilosa* group: Incongruence within and between mitochondrial and nuclear multilocus datasets. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 55(3), 208–221.
<https://doi.org/10.1111/jzs.12170>
- Delariva, R. L., & Neves, M. P. (2020). Morphological traits correlated with resource partitioning among small characin fish species coexisting in a Neotropical river. *Ecology of Freshwater Fish*, 29(4), 640–653. <https://doi.org/10.1111/eff.12540>
- Després, L. (2019). One, two or more species? Mitonuclear discordance and species delimitation. *Molecular Ecology*, 28(17), 3845–3847.
<https://doi.org/10.1111/mec.15211>
- Dias, C. A. R., Kuhn, G. C., Svartman, M., Santos, J. E. dos, Santos, F. R., Pinto, C. M., & Perini, F. A. (2021). Identification and characterization of repetitive DNA in the genus *Didelphis* Linnaeus, 1758 (Didelphimorphia, Didelphidae) and the use of satellite DNAs as phylogenetic markers. *Genetics and molecular biology*, 44(2), e20200384.
- Dierckxsens, N., Mardulyn, P., & Smits, G. (2017). NOVOPlasty: De novo assembly of organelle genomes from whole genome data. *Nucleic Acids Research*, 45(4), e18.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw955>

- Donath, A., Jühling, F., Al-Arab, M., Bernhart, S. H., Reinhardt, F., Stadler, P. F., Middendorf, M., & Bernt, M. (2019). Improved annotation of protein-coding genes boundaries in metazoan mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 47(20), 10543–10552. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz833>
- Eigenmann, C. H. (1907). Em *Eigenmann, C. H. & Ogle, F. (1907). An annotated list of characin fishes in the United States National Museum and the Museum of Indiana University, with descriptions of new species* (Vol. 33). US Government Printing Office.
- Eigenmann, C. H. (1910). *Catalogue of the fresh-water fishes of tropical and south temperate America*.
<https://agris.fao.org/search/en/providers/122376/records/647473182d5d435c424f10dc>
- Eigenmann, C. H. (1911). New characins in the collection of the Carnegie Museum. *Annals of Carnegie Museum*, 8, 164–181. <https://doi.org/10.5962/p.14707>
- Engelman, R. K. (2023). A Devonian fish tale: A new method of body length estimation suggests much smaller sizes for *Dunkleosteus terrelli* (Placodermi: Arthrodira). *Diversity*, 15(3), 318.
- Enriquez, G. F., Bua, J., Orozco, M. M., Wirth, S., Schijman, A. G., Gürtler, R. E., & Cardinal, M. V. (2014). High levels of *Trypanosoma cruzi* DNA determined by qPCR and infectiousness to *Triatoma infestans* support dogs and cats are major sources of parasites for domestic transmission. *Infection, Genetics and Evolution*, 25, 36–43.

- Feliciello, I., Akrap, I., & Ugarković, \DJur\djica. (2015). Satellite DNA modulates gene expression in the beetle *Tribolium castaneum* after heat stress. *PLoS Genetics*, 11(8), e1005466.
- Fink, W. L., & Weitzman, S. H. (1974). *The so-called cheirodontin fishes of Central America with descriptions of two new species (Pisces: Characidae)*.
https://repository.si.edu/bitstream/handle/10088/5121/SCtZ-0172-Hi_res.pdf?isAllowed=y&sequence=1
- François, C., Castagnone, C., Boonham, N., Tomlinson, J., Lawson, R., Hockland, S., Quill, J., Vieira, P., Mota, M., & Castagnone-Sereno, P. (2007). Satellite DNA as a target for TaqMan real-time PCR detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular Plant Pathology*, 8(6), 803–809.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00434.x>
- Fricke, R., Eschmeyer, W. N., & Fong, J. D. (2025a). *Species by family/subfamily*. Eschmeyer's Catalog of Fishes - California Academy of Sciences:
<https://www.calacademy.org/scientists/projects/eschmeyers-catalog-of-fishes>
- Fricke, R., Eschmeyer, W. N., & R., van der L. (2025b). *Genera, Species, References*. Eschmeyer's Catalog of Fishes - California Academy of Sciences:
<https://www.calacademy.org/scientists/projects/eschmeyers-catalog-of-fishes>
- Fry, K., & Salser, W. (1977). Nucleotide sequences of HS- α satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. *Cell*, 12(4), 1069–1084.
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., & Li, W. (2012). CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28(23), 3150–3152.

- Gall, J. G., & Pardue, M. L. (1969). FORMATION AND DETECTION OF RNA-DNA HYBRID MOLECULES IN CYTOLOGICAL PREPARATIONS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 63(2), 378–383. <https://doi.org/10.1073/pnas.63.2.378>
- Garrido-Ramos, M. A. (2017). Satellite DNA: An evolving topic. *Genes*, 8(9), 230.
- Garutti, V., & Langeani, F. (2009). Redescription of *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 7, 371–376.
- Gavazzoni, M., Brezinski, F. C., Pedroso, T. H., Pavanelli, C. S., Graça, W. J. da, Blanco, D. R., Lui, R. L., & Margarido, V. P. (2024). Integrative Taxonomy Suggests Resurrection of Species of the *Astyanax bimaculatus* Group (Characiformes, Characidae). *Zebrafish*, 21(5), 349–359. <https://doi.org/10.1089/zeb.2024.0132>
- Gavazzoni, M., Pavanelli, C. S., Graça, W. J., De Oliveira, E. A., Moreira-Filho, O., & Margarido, V. P. (2023). Species delimitation in *Psalidodon fasciatus* (Cuvier, 1819) complex (Teleostei: Characidae) from three hydrographic basins. *Biological Journal of the Linnean Society*, 138(1), 51–67. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blac139>
- GBIF Secretariat. (2023). *Astyanax rivularis* (Lütken, 1875). GBIF Backbone Taxonomy. <https://www.gbif.org/species/5204380>
- Godinho, H. P. (2003). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Editora PUC Minas.
- Goes, C. A. G., Dos Santos, R. Z., Aguiar, W. R. C., Alves, D. C. V., Silva, D. M. Z. de A., Foresti, F., Oliveira, C., Utsunomia, R., & Porto-Foresti, F. (2022). Revealing the satellite DNA history in *Psalidodon* and *Astyanax* characid fish by comparative satellitomics. *Frontiers in Genetics*, 13, 884072.

- Grube, M., & Kroken, S. (2001). Molecular approaches and the concept of species and species complexes in lichenized fungi. *Mycological Research*, 104(11), 1284–1294. <https://doi.org/10.1017/S0953756200003476>
- Hallström, B. M., & Janke, A. (2010). Mammalian evolution may not be strictly bifurcating. *Molecular biology and evolution*, 27(12), 2804–2816.
- Haq, I. U., Muhammad, M., Yuan, H., Ali, S., Abbasi, A., Asad, M., Ashraf, H. J., Khurshid, A., Zhang, K., & Zhang, Q. (2022). Satellitome analysis and transposable elements comparison in geographically distant populations of *Spodoptera frugiperda*. *Life*, 12(4), 521.
- Huson, D. H., & Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular biology and evolution*, 23(2), 254–267.
- Huson, D. H., & Bryant, D. (2024). The SplitsTree App: Interactive analysis and visualization using phylogenetic trees and networks. *Nature methods*, 21(10), 1773–1774.
- Ingenito, L. F., & Duboc, L. F. (2014). A new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the upper rio Iguaçu basin, southern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 12(2), 281–290.
- Iwasaki, W., Fukunaga, T., Isagozawa, R., Yamada, K., Maeda, Y., Satoh, T. P., Sado, T., Mabuchi, K., Takeshima, H., Miya, M., & Nishida, M. (2013). MitoFish and MitoAnnotator: A Mitochondrial Genome Database of Fish with an Accurate and Automatic Annotation Pipeline. *Molecular Biology and Evolution*, 30(11), 2531–2540. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst141>
- Jin, J.-J., Yu, W.-B., Yang, J.-B., Song, Y., dePamphilis, C. W., Yi, T.-S., & Li, D.-Z. (2020). GetOrganelle: A fast and versatile toolkit for accurate de novo assembly of

organelle genomes. *Genome Biology*, 21(1), 241. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02154-5>

John, H. A., Birnstiel, M. L., & Jones, K. W. (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223(5206).

<https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=sit e&authtype=crawler&jrnl=00280836&AN=61715028&h=AfWAFMoxgNQwcLdVTw QajEFA3L2IPYOJMAZmeFqd5S%2B8plvf8NoY9vBNKuZtTdr4eyheBL3%2B8SGnnx thkcg3iA%3D%3D&crl=c>

Junk, W. J., Bayley, P. B., & Sparks, R. E. (1989). The flood pulse concept in river-floodplain systems. *Canadian special publication of fisheries and aquatic sciences*, 106(1), 110–127.

Justi, A. J. (1993). Caracterizacao cariotipica de populacoes de *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819), Pisces-Characidae, em tres bacias hidrograficas. *Master Thesis. Universidade Federal de Sao Carlos*.

<https://cir.nii.ac.jp/crid/1571698599588791296>

Kantek, D. L. Z., Vicari, M. R., Peres, W. A. M., Cestari, M. M., Artoni, R. F., Bertollo, L. A. C., & Moreira-Filho, O. (2009). Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, *Incertae sedis*). *Journal of Fish Biology*, 75(2), 408–421.

<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02333.x>

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

- Kavalco, K. F., & Pasa, R. (2023). Chromosomal radiation: A model to explain karyotypic diversity in cryptic species. *Genetics and molecular biology*, 46, e20230116.
- Kavalco, K. F., Pazza, R., Brandão, K. D. O., Garcia, C., & Almeida-Toledo, L. F. de. (2011). Comparative cytogenetics and molecular phylogeography in the group *Astyanax altiparanae*–*Astyanax* aff. *Bimaculatus* (Teleostei, Characidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 134(2), 108–119.
- Kavalco, K. F., Pazza, R., De Oliveira Brandão, K., & De Almeida-Toledo, L. F. (2013). Biogeographic patterns in the chromosomal distribution of a satellite DNA in the banded tetra *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes). *Organisms Diversity & Evolution*, 13(1), 67–76. <https://doi.org/10.1007/s13127-012-0100-8>
- Keller, O., Kollmar, M., Stanke, M., & Waack, S. (2011). A novel hybrid gene prediction method employing protein multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, 27(6), 757–763.
- Kit, S. (1961). Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues. *Journal of Molecular Biology*, 3(6), 711-IN2. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80075-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80075-2)
- Klemm, P., Stadler, P. F., & Lechner, M. (2023). Proteinortho6: Pseudo-reciprocal best alignment heuristic for graph-based detection of (co-)orthologs. *Frontiers in Bioinformatics*, 3. <https://doi.org/10.3389/fbinf.2023.1322477>
- Kuhn, G. C. S. (2015). ‘Satellite DNA transcripts have diverse biological roles in *Drosophila*’. *Heredity*, 115(1), 1.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 9(4), 357–359.

- Lima, F. C. T., Malabarba, L. R., Buckup, P. A., Silva, J. F. P., Vari, R. P., Harold, A., Benine, R., Oyakawa, O. T., Pavanelli, C. S., & Menezes, N. A. (2003). Genera Incertae Sedis in Characidae. Em *Reis, R. E., Kullander, S. O. & Ferraris, Jr., C. J. (orgs), Check list of the freshwater fishes of South America. Porto Alegre, Brazil. 742p* (p. 134–141).
- López-Flores, I., & Garrido-Ramos, M. A. (2012). The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. *Genome Dynamics*, 7, 1–28.
<https://doi.org/10.1159/000337118>
- Lucena, C. A. S. D., & Soares, H. G. (2016). Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. *Zootaxa*, 4072(1), 101–125. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4072.1.5>
- Lucena, C. A., & Soares, H. G. (2016). Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. *Zootaxa*, 4072(1), 101–125.
- Lütken, C. F. (1875). Velhas-Flodens Fiske: Et Bidrag til Brasiliens Ichthyologie [Peixes do rio das Velhas: Uma contribuição para a Ictiologia do Brasil]. Em *Alves, C. B. M. & Pompeu, P. S. (Eds.), Peixes do rio das Velhas: Passado e presente. Belo Horizonte, 2001, 194p* (p. 23–164). SEGRAC.
- Macas, J., Mészáros, T., & Nouzová, M. (2002). PlantSat: A specialized database for plant satellite repeats. *Bioinformatics*, 18(1), 28–35.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.1.28>

- Mantovani, M., Dos, L. D., Abel, S., & Moreira-Filho, O. (2005). Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica*, 123(3), 211–216.
<https://doi.org/10.1007/s10709-004-2281-3>
- Marinho, M. M. F., Ohara, W. M., & Dagosta, F. C. P. (2021). A new species of *Moenkhausia* (Characiformes: Characidae) from the rio Madeira basin, Brazil, with comments on the evolution and development of the trunk lateral line system in characids. *Neotropical Ichthyology*, 19, e200118.
- McCormack, J. E., Hird, S. M., Zellmer, A. J., Carstens, B. C., & Brumfield, R. T. (2013). Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66(2), 526–538.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.12.007>
- Melo, B. F., Ota, R. P., Benine, R. C., Carvalho, F. R., Lima, F. C. T., Mattox, G. M. T., Souza, C. S., Faria, T. C., Reia, L., Roxo, F. F., Valdez-Moreno, M., Near, T. J., & Oliveira, C. (2024). Phylogenomics of Characidae, a hyper-diverse Neotropical freshwater fish lineage, with a phylogenetic classification including four families (Teleostei: Characiformes). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 202(1), zlae101.
<https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlae101>
- Menezes, N. A., & Weitzman, S. H. (1990). Two new species of *Mimagoniates* (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae), their phylogeny and biogeography and a key to the glandulocaudin fishes of Brazil and Paraguay. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 103(2), 380–426.
- Menon, D. U., Coarfa, C., Xiao, W., Gunaratne, P. H., & Meller, V. H. (2014). siRNAs from an X-linked satellite repeat promote X-chromosome recognition in *Drosophila*

- melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(46), 16460–16465. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410534111>
- Mestriner, C. A., Galetti, P. M., Valentini, S. R., Ruiz, I. R., Abel, L. D., Moreira-Filho, O., & Camacho, J. P. (2000). Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity*, 85(1), 1–9.
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular biology and evolution*, 37(5), 1530–1534.
- Mirande, J. M. (2010). Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology*, 8, 385–568.
- Mirande, J. M. (2019). Morphology, molecules and the phylogeny of Characidae (Teleostei, Characiformes). *Cladistics*, 35(3), 282–300.
- <https://doi.org/10.1111/cla.12345>
- Miya, M., Kawaguchi, A., & Nishida, M. (2001). Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: A case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 18(11), 1993–2009.
- Moreira-Filho, O., & Bertollo, L. A. C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces; Characidae): A "species complex". *Brazil J. Genet.*, 14, 331–357.
- Muñoz-Calderón, A., Silva-Gomes, N. L., Apodaca, S., de Noya, B. A., Díaz-Bello, Z., Souza, L. R. Q., Costa, A. D. T., Britto, C., Moreira, O. C., & Schijman, A. G. (2021). Toward the establishment of a single standard curve for quantification of

- Trypanosoma cruzi* natural populations using a synthetic satellite unit DNA sequence. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 23(5), 521–531.
- Nelson, J. S., Grande, T. C., & Wilson, M. V. (2016). *Fishes of the World*. John Wiley & Sons. <https://books.google.com/books?hl=pt-BR&lr=&id=E-MLDAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT43&dq=NELSON,+Joseph+S.%3B+GRANDE,+Terry+C.%3B+WILSON,+Mark+VH.+Fishes+of+the+World.+John+Wiley+%26+Sons,+2016.&ots=uWi9KLo0qQ&sig=w6auv6pzRoc8VyDI21gRTTJDOVs>
- Novák, P., Ávila Robledillo, L., Koblížková, A., Vrbová, I., Neumann, P., & Macas, J. (2017). TAREAN: A computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. *Nucleic acids research*, 45(12), e111–e111.
- Novák, P., Neumann, P., Pech, J., Steinhaisl, J., & Macas, J. (2013). RepeatExplorer: A Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics*, 29(6), 792–793.
- Okonechnikov, K., Conesa, A., & García-Alcalde, F. (2016). Qualimap 2: Advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 32(2), 292–294.
- Oliveira, C. A. M. (2017). *Revisão taxonômica do complexo de espécies Astyanax scabripinnis sensu Bertaco & Lucena (2006)(Ostariophysi: Characiformes: Characidae)*. [PhD Thesis]. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia. Programa de Pós
- Oliveira, C. A. M., Abilhoa, V., & Pavanelli, C. S. (2013). *Astyanax guaricana* (Ostariophysi: Characidae), a new species from the rio Cubatão drainage, Paraná

State, Southern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 11, 291–296.

<https://doi.org/10.1590/S1679-62252013000200007>

Oliveira, I. H. R. (2021). *Psalidodon rivularis* (Characiformes: Characidae): um complexo de espécies baseado em dados citogenéticos, morfométricos e genômicos.

<https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/28057/1/texto%20completo.pdf>

Orgel, L. E., & Crick, F. H. (1980). Selfish DNA: The ultimate parasite. *Nature*, 284(5757), 604–607.

Özgür, E., Mayer, Z., Keskin, M., Yörüker, E. E., Holdenrieder, S., & Gezer, U. (2021).

Satellite 2 repeat DNA in blood plasma as a candidate biomarker for the detection of cancer. *Clinica Chimica Acta*, 514, 74–79.

Pasa, R., Fernandes, C. H. M., Rocha, R. R., & Kavalco, K. F. (2019). Distribution and morphological diversity of *Astyanax rivularis* Lütken, 1874 (Teleostei Characiformes) in the upper São Francisco River basin, Brazil. *Biodiversity Journal*, 10(4), 307–314.

Pasa, R., Menegídio, F. B., Rodrigues-Oliveira, I. H., da Silva, I. B., de Campos, M. L. C. B., Rocha-Reis, D. A., Heslop-Harrison, J. S., Schwarzacher, T., & Kavalco, K. F. (2021). Ten complete mitochondrial genomes of Gymnocharacini (Stethaprioninae, Characiformes). Insights into evolutionary relationships and a repetitive element in the control region (D-loop). *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9, 650783.

Pavanelli, C. S., & Oliveira, C. A. M. (2009). A redescription of *Astyanax gymnodontus* (Eigenmann, 1911), new combination, a polymorphic characid fish from the rio Iguaçu basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 7, 569–578.

<https://doi.org/10.1590/S1679-62252009000400003>

- Pavanelli, C. S., Vieira, F., Cardoso, P. C. A., & Reis, R. E. (2024). *Psalidodon rivularis* (Lütken, 1875). Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade—SALVE. SALVE | ICMBio. <https://salve.icmbio.gov.br>
- Pazza, R., Cruvinel, L. A., & Kavalco, K. F. (2017). Parallel evolution evidenced by molecular data in the banded-tetra (*Astyanax fasciatus*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 70, 141–146.
- Pazza, R., Dergam, J. A., & Kavalco, K. F. (2018). Trends in karyotype evolution in *Astyanax* (Teleostei, Characiformes, Characidae): Insights from molecular data. *Frontiers in Genetics*, 9, 131.
- Pazza, R., Kavalco, K. F., & Bertollo, L. A. C. (2006). Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 1. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenetic and Genome Research*, 112(3–4), 313–319. <https://doi.org/10.1159/000089886>
- Pereira, L. F., Cruz, G. de B., & Guimarães, R. M. F. (2019). Impactos do rompimento da barragem de rejeitos de Brumadinho, Brasil: Uma análise baseada nas mudanças de cobertura da terra. *Journal of Environmental Analysis and Progress*, 122–129. <https://doi.org/10.24221/jeap.4.2.2019.2373.122-129>
- Peres, W. A. M., Bertollo, L. A. C., & Moreira Filho, O. (2008). Physical mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in nine Characidae species (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 31, 222–226.
- Peres, W. A. M., Buckup, P. A., Kantek, D. L. Z., Bertollo, L. A. C., & Moreira-Filho, O. (2009). Chromosomal evidence of downstream dispersal of *Astyanax fasciatus*

(Characiformes, Characidae) associated with river shed interconnection.

Genetica, 137(3), 305–311. <https://doi.org/10.1007/s10709-009-9389-4>

Posit team. (2025). *RStudio: Integrated Development Environment for R*. Posit Software, PBC, Boston, MA. <http://www.posit.co/>

Quirino, P. P., De Siqueira-Silva, D. H., Da Silva Rodrigues, M., Dos Santos-Silva, A. P., Delgado, M. L. R., Senhorini, J. A., Ninhaus-Silveira, A., & Veríssimo-Silveira, R. (2021). Gonadal morphology and difference in reproductive development of two isolated populations of *Astyanax rivularis* (Teleostei, Characidae). *Journal of Fish Biology*, 99(5), 1719–1728. <https://doi.org/10.1111/jfb.14879>

R Core Team. (2024). *R: A Language and Environment for Statistical Computing, version 4.4.2*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

Ramírez, J. C., Torres, C., Curto, M. de los A., & Schijman, A. G. (2017). New insights into *Trypanosoma cruzi* evolution, genotyping and molecular diagnostics from satellite DNA sequence analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(12), e0006139.

Ribeiro, A. C. (2006). Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: An example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical ichthyology*, 4, 225–246.

Rocha-Reis, D. A., Rodrigues-Oliveira, I. H., Pasa, R., Menegídio, F. B., Heslop-Harrison, J. S. P., Schwarzacher, T., & Kavalco, K. F. (2024). In silico Characterization of Satellitomes and Cross-Amplification of Putative satDNAs in Two Species of the

- Hypostomus ancistroides* Complex (Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 164(2), 121–132.
- Rodrigues Rocha, R., De Mesquita Alves, R., Pasa, R., & Frehner Kavalco, K. (2019). Morphological and Genetic Structure of Two Equivalent *Astyanax* Species (Characiformes: Characidae) in the Region of Paranaíba Arc. *The Scientific World Journal*, 2019, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2019/6507954>
- Rodrigues-Oliveira, I. H., Kavalco, K. F., & Pasa, R. (2023). Body shape variation in the Characid *Psalidodon rivularis* from São Francisco river, Southeast Brazil (Characiformes: Stethaprioninae). *Acta Zoologica*, 104(3), 345–354. <https://doi.org/10.1111/azo.12415>
- Roncoroni, M., & Gallone, B. (2022). *Preparing genomic data for phylogeny reconstruction* [Text]. Galaxy Training Network; Galaxy Training Network. <https://training.galaxyproject.org/training-material/topics/ecology/tutorials/phylogeny-data-prep/tutorial.html>
- Rošić, S., Köhler, F., & Erhardt, S. (2014). Repetitive centromeric satellite RNA is essential for kinetochore formation and cell division. *Journal of Cell Biology*, 207(3), 335–349.
- Ruiz-Ruano, F. J., López León, M. D., Cabrero Hurtado, J., & Martínez Camacho, J. P. (2016). *High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution*. <https://digibug.ugr.es/handle/10481/96017>
- Santos, A. B. I., & Araújo, F. G. (2015). Evidence of morphological differences between *Astyanax bimaculatus* (Actinopterygii: Characidae) from reaches above and below dams on a tropical river. *Environmental Biology of Fishes*, 98(1), 183–191. <https://doi.org/10.1007/s10641-014-0248-5>

- Santos, N. dos. (2024). *Divergência molecular e composição genômica de cromossomos B em Cyphocharax modestus (Characiformes, Curimatidae)*.
<https://repositorio.unesp.br/items/3c0289aa-6d0d-4b19-a45f-20d90c32d271>
- Šatović-Vukšić, E., & Plohl, M. (2023). Satellite DNAs—From localized to highly dispersed genome components. *Genes*, 14(3), 742.
- Sena, R. S., Heringer, P., Valeri, M. P., Pereira, V. S., Kuhn, G. C., & Svartman, M. (2020). Identification and characterization of satellite DNAs in two-toed sloths of the genus *Choloepus* (Megalonychidae, Xenarthra). *Scientific Reports*, 10(1), 19202.
- Silva, B. S., Heringer, P., Dias, G. B., Svartman, M., & Kuhn, G. C. (2019). De novo identification of satellite DNAs in the sequenced genomes of *Drosophila virilis* and *D. americana* using the RepeatExplorer and TAREAN pipelines. *PLoS One*, 14(12), e0223466.
- Silva, B. S., Picorelli, A. C., & Kuhn, G. C. (2023). In Silico Identification and Characterization of Satellite DNAs in 23 *Drosophila* Species from the Montium Group. *Genes*, 14(2), 300.
- Silva, D. M. de A., Utsunomia, R., Ruiz-Ruano, F. J., Daniel, S. N., Porto-Foresti, F., Hashimoto, D. T., Oliveira, C., Camacho, J. P. M., & Foresti, F. (2017). High-throughput analysis unveils a highly shared satellite DNA library among three species of fish genus *Astyanax*. *Scientific Reports*, 7(1), 12726.
- Silva, D. M. Z. de A., Utsunomia, R., Ruiz-Ruano, F. J., Oliveira, C., & Foresti, F. (2016). The complete mitochondrial genome sequence of *Astyanax paranae* (Teleostei: Characiformes). *Mitochondrial DNA Part B*, 1(1), 586–587.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2016.1222251>

- Silva, P. C., Bonato, K. O., Bertaco, V. A., & Malabarba, L. R. (2025). Integrative diagnosis and review of the conservation status of a Near Threatened species of the “*Psalidodon scabripinnis* complex”. *Neotropical Ichthyology*, 22, e240069.
<https://doi.org/10.1590/1982-0224-2024-0069>
- Souza, M. A., Fagundes, D. C., Leal, C. G., & Pompeu, P. S. (2014). Ecomorphology of *Astyanax* species in streams with different substrates. *Zoologia (Curitiba)*, 31, 42–50.
- Steenwyk, J. L., Ili, T. J. B., Li, Y., Shen, X.-X., & Rokas, A. (2020). ClipKIT: A multiple sequence alignment trimming software for accurate phylogenomic inference. *PLOS Biology*, 18(12), e3001007. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001007>
- Teixeira, T. F., Salvador, G. N., Mirande, J. M., & Lima, F. C. T. (2025). A New Species of *Psalidodon* (Characiformes: Acestrorhamphidae) from the Upper Rio São Francisco Basin, Brazil, with Comments on *Hasemania*. *Ichthyology & Herpetology*, 113(1), 131–142.
- Terán, G. E., Benitez, M. F., & Mirande, J. M. (2020). Opening the Trojan horse: Phylogeny of *Astyanax*, two new genera and resurrection of *Psalidodon* (Teleostei: Characidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 190(4), 1217–1234.
- The Galaxy Community. (2022). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W345–W351. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac247>
- Triques, M. L. (2006). Adições à Ictiofauna do Parque Nacional da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil (Teleostei, Characidae). *Lundiana: International Journal of Biodiversity*, 7(1), 73–75.

- Triques, M. L., & Queiroz, F. M. de. (2010). Fish, Characiformes, Characidae, *Astyanax turmalinensis* Triques, Vono and Caiafa, 2003: Distribution extension. *Check List*, 6(3), Artigo 3. <https://doi.org/10.15560/6.3.400>
- Triques, M. L., Vono, V., & Caiafa, E. V. (2003). *Astyanax turmalinensis*, a new species from the rio Jequitinhonha basin, Minas Gerais, Brazil (Characiformes: Characidae: Tetragonopterinae). *Aqua, Journal of Ichthyology and Aquatic Biology*, 7(4), 145–150.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W71–W74.
- Usakin, L., Abad, J., Vagin, V. V., de Pablos, B., Villasante, A., & Gvozdev, V. A. (2007). Transcription of the 1.688 satellite DNA family is under the control of RNA interference machinery in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Genetics*, 176(2), 1343–1349.
- Vences, M., Patmanidis, S., Kharchev, V., & Renner, S. S. (2022). Concatenator, a user-friendly program to concatenate DNA sequences, implementing graphical user interfaces for MAFFT and FastTree. *Bioinformatics Advances*, 2(1), vbac050.
- Vieira, F., Gomes, J. P. G., Maia, B. P., & Silva, L. G. M. (2015). Peixes do Quadrilátero Ferrífero: Guia de identificação. *Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas*.
- Webb, P. W. (1984). Form and function in fish swimming. *Scientific American*, 251(1), 72–83.
- Zadra, N., Rizzoli, A., & Rota-Stabelli, O. (2021). Chronological Incongruences between Mitochondrial and Nuclear Phylogenies of Aedes Mosquitoes. *Life*, 11(3), Artigo 3. <https://doi.org/10.3390/life11030181>

Zelditch, M. L., & Fink, W. L. (1996). Heterochrony and heterotopy: Stability and innovation in the evolution of form. *Paleobiology*, 22(2), 241–254.

Zhong, S., & Feng, J. (2022). CircPrimer 2.0: A software for annotating circRNAs and predicting translation potential of circRNAs. *BMC Bioinformatics*, 23(1), 215.
<https://doi.org/10.1186/s12859-022-04705-y>

MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 1

MATERIAL SUPLEMENTAR S1 - Material analisado no capítulo 1, espécies analisadas: *Psalidodon rivularis*, *Psalidodon santae* comb nov., *Psalidodon aff. rivularis* M3, *Psalidodon aff. rivularis* M4, “*Astyanax turmalinensis*”, *Psalidodon aff. paranae*, *Psalidodon rioparanaibanus*, *Psalidodon fasciatus* e *Astyanax lacustris*.

Nº de Lote	Espécie	Nº amostral	Tamanho (min – máx)	Local	Data	Coletores
Material Coletado durante o trabalho						
LaGEEvo-30	<i>P. rivularis</i>	12	45mm – 63.5mm	Córrego Lage, Arapuá/MG, 19°1'25.18"S 46°6'18.74"O	05/11/2022	I.H.R. Oliveira, P.M. de Assis e T. da S. Santos
LaGEEvo-31	<i>P. aff. santae</i> M2	23	38mm – 54mm	Córrego Lage, Arapuá/MG, 19°1'25.18"S 46°6'18.74"O	05/11/2022	I.H.R. Oliveira, P.M. de Assis e T. da S. Santos
LaGEEvo-32	<i>P. santae</i>	22	31mm – 49mm	Rio das Velhas, Ouro Preto/MG 20°20'38.4"S 43°29'58.4"O	15/09/2023	I.H.R. Oliveira, I.B. da Silva, P.M. de Assis, L.G.P. Pimentel, R. Pasa
LaGEEvo-33	<i>P. rivularis</i>	3	55.5mm – 69.5mm	Rio das Velhas, Ouro Preto/MG 20°20'38.4"S 43°29'58.4"O	15/09/2023	I.H.R. Oliveira, I.B. da Silva, P.M. de Assis, L.G.P. Pimentel, R. Pasa
LaGEEvo-34	<i>P. rivularis</i>	3	53mm – 64mm	Rio Borrachudo, Matutina/MG 19°13'02.6"S 45°55'58.2"O	08/03/2023	I.H.R. Oliveira, P.M. de Assis, R.A.S. Soares R. Pasa
LaGEEvo-35	<i>P. aff. santae</i> M2	6	35mm – 54mm	Rio Funchal, São Gotardo/MG	02/12/2023	I.H.R. Oliveira, I.B. da Silva, P.M. de Assis,

LaGEEvo-36	<i>P. rivularis</i>	4	41mm – 46mm	19°24'9.54"S 46°0'4.61"O Rio Funchal, São Gotardo/MG 19°24'9.54"S 46°0'4.61"O	02/12/2023	L.G.P. Pimentel, R. Pasa I.H.R. Oliveira, I.B. da Silva, P.M. de Assis, L.G.P. Pimentel, R. Pasa
LaGEEvo-48	<i>P. rivularis</i>	23	47mm – 84mm	Encontro dos rios Mascate e Bocaína, PN Serra do Cipó, 19°20'49.68"S 43°36'20.42"O	09/10/2023	I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, P.M. de Assis, L.G.P. Pimentel, R.A.S. Soares, G.F. da Fonseca, G.F.Matos, V.G. de Miranda, B. Alonso
LaGEEvo-49	<i>P. santae</i>	8	41mm – 59.5mm	Encontro dos rios Mascate e Bocaína, PN Serra do Cipó, 19°20'49.68"S 43°36'20.42"O	09/10/2023	I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, P.M. de Assis, L.G.P. Pimentel, R.A.S. Soares, G.F. da Fonseca, G.F.Matos, V.G. de Miranda, B. Alonso
LaGEEvo-50	<i>P. aff. rivularis</i> M3	16	49mm – 89mm	Baixo da cachoeira Rasga Canga, PN Serra da Canastra, 20°10'39.13"S 46°33'33.68"O	29/07/2023	I.H.R. Oliveira, I.B. da Silva, P.M. de Assis, L.G.P. Pimentel, R.A.S. Soares, T. da S. Ramos, J. Godoy,

LaGEEvo-51	<i>P. aff. rivularis</i> M3	34	43mm – 83mm	Cachoeira Casca d'Anta, PN Serra da Canastra, 20°18'2.24"S 46°31'18.99"O	28/07/2023	S.S.N. Pereira I.H.R. Oliveira, I.B. da Silva, P.M. de Assis, L.G.P. Pimentel, R.A.S. Soares, T. da S. Ramos, J. Godoy, S.S.N. Pereira
LaGEEvo-52	<i>P. aff. rivularis</i> M3	34	40mm – 81mm	Nascente histórica do rio São Francisco, PN Serra da Canastra, 20°14'4.79"S 46°26'29.38"O	28/07/2023	I.H.R. Oliveira, I.B. da Silva, P.M. de Assis, L.G.P. Pimentel, R.A.S. Soares, T. da S. Ramos, J. Godoy, S.S.N. Pereira
LaGEEvo-53	<i>P. aff. rivularis</i> M3	23	50mm – 93mm	Alto da cachoeira Rasga Canga, PN Serra da Canastra, 20°10'39.13"S 46°33'33.68"O	29/07/2023	I.H.R. Oliveira, I.B. da Silva, P.M. de Assis, L.G.P. Pimentel, R.A.S. Soares, T. da S. Ramos, J. Godoy, S.S.N. Pereira
LaGEEvo-58	<i>P. santae</i>	4	56mm – 72mm	Cânion das Bandeirinhas, PN Serra do Cipó, 19°25'8.33"S 43°34'12.37"O	11/10/2023	I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, P.M. de Assis, L.G.P. Pimentel, R.A.S. Soares, G.F. da Fonseca, G.F.Matos,

LaGEEvo-60	<i>P. rivularis</i>	11	64mm – 99mm	Trilha da Cachoeira da Farofa, PN Serra do Cipó, 19°23'6.52"S 43°35'12.28"O	10/10/2023	V.G. de Miranda, B. Alonso, R. Pasa I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, P.M. de Assis, L.G.P. Pimentel, R.A.S. Soares, G.F. da Fonseca, G.F.Matos, V.G. de Miranda, B. Alonso, R. Pasa
LaGEEvo-62	<i>P. santae</i>	1	63mm	Trilha da Cachoeira da Farofa, PN Serra do Cipó, 19°23'6.52"S 43°35'12.28"O	10/10/2023	I.H.R. Oliveira, I. B. da Silva, P.M. de Assis, L.G.P. Pimentel, R.A.S. Soares, G.F. da Fonseca, G.F.Matos, V.G. de Miranda, B. Alonso, R. Pasa
LaGEEvo-65	<i>A. lacustris</i>	2	69mm – 78.5mm	Afluente da Lagoa Verde, Lagoa da Prata / MG, 20° 0'15.75"S 45°30'42.13"O	06/05/2023	I.H.R. Oliveira, I.B. da Silva, R.A.S. Soares, L. da C. de Santos
LaGEEvo-67	<i>P. fasciatus</i>	1	98mm	Afluente da Lagoa Verde, Lagoa da Prata / MG,	06/05/2023	I.H.R. Oliveira, I.B. da Silva, R.A.S. Soares, L. da C. de Santos

LaGEEvo-69	<i>P. fasciatus</i>	7	38.6mm – 89mm	20° 0'15.75"S 45°30'42.13"O Rio Santana, Lagoa da Prata/MG, 20° 4'32.68"S 45°32'52.10"O	06/05/2023	I.H.R. Oliveira, I.B. da Silva, R.A.S. Soares, L. da C. de Santos
LaGEEvo-71	<i>A. lacustris</i>	12	49mm – 59mm	Lagoa da Usina do Abaeté, Rio Paranaíba/MG, 19°12'35.69"S 46° 6'33.79"O	01/10/2022	I.H.R. Oliveira, P.M. de Assis, L.G.P. Pimentel, R. A. S. Soares
LaGEEvo-74	<i>P. rivularis</i>	11	56mm – 87.5mm	Córrego Confusão, São Gotardo/MG, 19°20'21.89"S 46° 6'21.38"O	11/11/2024	I.H.R. Oliveira, P.M. de Assis, W. Cléber
Material depositado na Coleção de Vertebrados da UFV-CRP						
LaGEEvo-12	<i>P. rioparanaibanus</i>	1	84mm	Córrego Rita, Rio Paranaíba/MG, 19°11'15.77"S 46°14'10.24"O	21/08/2017	M.A. da Silva, I.B. da Silva
LaGEEvo-13	<i>P. rioparanaibanus</i>	8	43mm – 84mm	Córrego Rita, Rio Paranaíba/MG, 19°11'15.77"S 46°14'10.24"O	23/09/2018	I.H.R. Oliveira, I.B. da Silva, R.L.Oliveira, G. Leles, T. Castaño
LaGEEvo-14	<i>P. rioparanaibanus</i>	4	40mm – 84mm	Córrego Rita, Rio Paranaíba/MG, 19°11'15.77"S 46°14'10.24"O	21/08/2017	M.A. da Silva, I.B. da Silva
LaGEEvo-37	<i>P. rivularis</i>	2	47mm – 56mm	Rio Funchal, São Gotardo/MG,	04/05/2019	I.H.R. Oliveira, I.B. da Silva, L. Fainé,

				19°24'9.54"S 46°0'4.61"O		J. Godoy
LaGEEvo-38	<i>P. aff. santae</i> M2	1	59mm	Rio Funchal, São Gotardo/MG, 19°24'9.54"S 46°0'4.61"O	04/05/2019	I.H.R. Oliveira, I.B. da Silva, L. Fainé, J. Godoy
LaGEEvo-39	<i>P. aff. santae</i> M4	6	52mm – 77mm	Córrego Bonito, Tiros/MG, 18°48'44.7"S 45°45'52.2"O	20/07/2010	P. Penteado, Denis, Gabriel, Rafael
LaGEEvo-40	<i>P. rivularis</i>	12	64mm – 86mm	Córrego Bonito, Tiros/MG, 18°48'44.7"S 45°45'52.2"O	20/07/2010	P. Penteado, Denis, Gabriel, Rafael
LaGEEvo-41	<i>P. rivularis</i>	17	48mm – 79.5mm	Córrego Lage, Arapuá/MG, 19°1'25.18"S 46°6'18.74"O	23/07/2010	P. Penteado, D. Reis, Denis, Paloma, Wanessa
LaGEEvo-42	<i>P. aff. santae</i> M2	3	42mm – 49mm	Córrego Lage, Arapuá/MG, 19°1'25.18"S 46°6'18.74"O	23/07/2010	P. Penteado, D. Reis, Denis, Paloma, Wanessa
LaGEEvo-43	<i>P. rivularis</i>	9	43mm – 52mm	Córrego Crico, Presidente Olegário/MG, 18°18'44.36"S 46°5'44.46"O	06/04/2019	I.B. da Silva, M.L.C.B. de Campos, V. Augusto, S.V. Resende
LaGEEvo-44	<i>P. rivularis</i>	4	43mm – 52mm	Cânion das Bandeirinhas, PN Serra do Cipó,	Out/2017	M.L.C.B. de Campos, R.R. Rocha,

LaGEEvo-45	<i>P. santae</i>	9	43mm – 53mm	19°25'8.33"S 43°34'12.37"O Cânion das Bandeirinhas, PN Serra do Cipó, 19°25'8.33"S 43°34'12.37"O	Out/2017	S.V. Resende, F. Sassi M.L.C.B. de Campos, R.R. Rocha, S.V. Resende, F. Sassi
LaGEEvo-46	<i>P. rivularis</i>	9	42mm – 59mm	Ribeirão Bandeirinhas, PN Serra do Cipó, 19°24'32.65"S 43°34'35.31"O	Out/2017	M.L.C.B. de Campos, R.R. Rocha, S.V. Resende, F. Sassi
LaGEEvo-47	<i>P. santae</i>	6	42mm – 49mm	Ribeirão Bandeirinhas, PN Serra do Cipó, 19°24'32.65"S 43°34'35.31"O	Out/2017	M.L.C.B. de Campos, R.R. Rocha, S.V. Resende, F. Sassi
LaGEEvo-54	<i>P. aff. santae</i> M4	5	42mm – 72mm	Lagoa da Usina do Abaeté, Rio Paranaíba/MG, 19°12'35.69"S 46° 6'33.79"O	17/07/2012	W. Lopes-Silva, C.H.M. Fernandes, M.A. da Silva, A.C.M. Fernandes
LaGEEvo-55	<i>P. aff. santae</i> M4	8	31.5mm – 44mm	Lagoa da Usina do Abaeté, Rio Paranaíba/MG, 19°12'35.69"S 46° 6'33.79"O	07/07/2017	I.H.R. Oliveira, I.B. da Silva, M.A. da Silva
LaGEEvo-56	<i>P. rivularis</i>	14	48mm – 69mm	Córrego Tiros, Tiros/MG, 18°56'34.08"S 45°56'18.20"O	20/07/2010	P. Penteado, Denis, Gabriel, Rafael

LaGEEvo-57	<i>P. aff. santae</i> M4	2	67mm – 67.5mm	Córrego Tiros, Tiros/MG, 18°56'34.08"S 45°56'18.20"O	2010-2012	-
LaGEEvo-59	<i>P. rivularis</i>	3	50mm – 65mm	Rio Funchal, São Gotardo/MG, 19°24'9.54"S 46°0'4.61"O	12/05/2018	I.H.R. Oliveira, I.B. da Silva, G. Bork, L. Fernandes, V. Augusto
LaGEEvo-63	<i>P. rivularis</i>	4	50mm – 81mm	Rio Vereda Grande, Três Marias/MG, 18°19'18.62"S 45° 6'32.80"O	18/04/2017	R. de M. Alves; R.R. Rocha; M.A. da Silva; S.V. Resende
LaGEEvo-64	<i>P. rivularis</i>	5	55mm – 62mm	Rio Vereda Grande, Três Marias/MG, 18°19'18.62"S 45° 6'32.80"O	2010-2012	-
LaGEEvo-66	<i>A. lacustris</i>	3	69mm – 79mm	Córrego Teixeira, Augusto de Lima/MG, 17°58'58.53"S 44°4'26.566"O	Jul/2024	V.G. de Miranda
LaGEEvo-68	<i>P. fasciatus</i>	3	68mm – 83mm	Córrego Teixeira, Augusto de Lima/MG, 17°58'58.53"S 44°4'26.566"O	Jul/2024	V.G. de Miranda
LaGEEvo-70	<i>P. fasciatus</i>	1	64mm	Rio Vereda Grande, Três Marias/MG, 18°19'18.62"S 45° 6'32.80"O	18/04/2017	R. de M. Alves; R.R. Rocha; M.A. da Silva; S.V. Resende
LaGEEvo-72	<i>P. paranae</i>	7	53.5mm – 77.5mm	Córrego Lava-Pés, Rio Paranaíba/MG,	Nov/2015	M.L.C.B. de Campos, F. Sassi,

LaGEEvo-73	<i>P. paranae</i>	3	77mm – 83mm	19°11'41.22"S 46°15'7.32"O Córrego Lava-Pés, Rio Paranaíba/MG, 19°11'41.22"S 46°15'7.32"O	Nov/2015	T. Lunardi, R. Pereira, M. Trevisanuto M.L.C.B. de Campos, F. Sassi, T. Lunardi, R. Pereira, M. Trevisanuto
LaGEEvo-75	<i>P. rivularis</i>	4	56mm – 87.5mm	Córrego da Espinha, Tiros/MG 19° 2'47.18"S 46° 1'12.93"O	24/07/2016	M.L.C.B. de Campos, M.A. da Silva, S.V. Resende, R. Pasa
LaGEEvo-76	<i>P. aff. santae</i> M4	9	37mm – 45mm	Córrego Crico, Presidente Olegário/MG, 18°18'44.36"S 46° 5'44.46"O	06/04/2019	I.B. da Silva, M.L.C.B. de Campos, V. Augusto, S.V. Resende
Material depositado no Departamento de Zoologia da UFMG						
DZUFMG 005	<i>"A. turmalinensis"</i>	1	48.2mm	Córrego Divisão, Turmalina/MG, 17°07'00.00"S 42°57'00.00"O	Mai/1989	V. Vono
DZUFMG 009	<i>"A. turmalinensis"</i>	19	33.5mm – 54.9mm	Córrego Divisão, Turmalina/MG, 17°07'00.00"S 42°57'00.00"O	Ago/1989	V. Vono
Material (fotos e anotações) por C.A.M. Oliveira (2017)						
ZMUC	<i>P. santae</i>	2	37.5mm – 60.1mm	Rio das Velhas, Lagoa Santa/MG	1847-1854	J.T. Reinhardt
USNM 44960	<i>P. rivularis</i>	2	37.6mm – 67.8mm	Rio das Velhas,	1847-1854	J.T. Reinhardt

USNM 55652	<i>P. santae</i>	2	32.5mm – 54.1mm	Lagoa Santa/MG Rio das Velhas,	1847-1854	J.T. Reinhardt
MCZ 20874	<i>P. rivularis</i>	1	67.61mm	Lagoa Santa/MG Rio das Velhas, Lagoa Santa/MG, 19°27'26''S 44°14'30''O	Jul/1865	G. Sceva & Thayer Expedition
Material (fotografias) site das coleções biológicas do Museu de História Natural da Dinamarca						
ZMUC P241289	<i>P. rivularis</i>	1	80.7mm	Rio das Velhas, Lagoa Santa/MG	1847-1854	J.T. Reinhardt
ZMUC P241329	<i>A. lacustris</i>	1	51.12mm	Rio das Velhas, Lagoa Santa/MG	1847-1854	J.T. Reinhardt
ZMUC P241291	<i>P. fasciatus</i>	1	86.5mm	Rio das Velhas, Lagoa Santa/MG	1847-1854	J.T. Reinhardt

MATERIAL SUPLEMENTAR S2 - Protocolo adaptado de Bertollo (1978) para obtenção de cromossomos mitóticos em Lambaris.

1. Pré-preparação

1.1 Recomenda-se aclimatar o peixe no laboratório antes da preparação, mantendo os espécimes dentro do aquário em temperatura e condições controladas. O tempo de aclimação pode variar entre espécies, sendo que obtivemos os melhores resultados após 96h com *Astyanax lacustris* e 120h com *Psalidodon rivularis*.

1.2 Recomenda-se também uma técnica de indução imunológica cerca de 24 a 48 horas antes da eutanásia, como por exemplo, a indução intraperitoneal de 1ml de Broncho-Vaxom® por 50g de massa corporal (Molina et al., 2010).

1.3 Antes da preparação, eutanasiar os espécimes via imersão em Eugenol 1% diluído em 1L de água, seguindo a Resolução Normativa Nº 37 do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal, do Ministério de Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (CONCEA - MCTI).

1.4 Enquanto os peixes são eutanasiados, separar e preparar os reagentes necessários: colocar solução hipotônica (KCl 0,2M) e meio de cultura (Leibowitz, RPMI ou etc.) em estufa a 37°C. Preparar o fixador (Metanol 3: 1 Ác. Acético) e levar ao freezer (60ml é o suficiente para quatro espécimes com sobras).

1.4 Organizar os utensílios necessários: pinças e tesouras cirúrgicas, recipientes para o meio de cultura, seringas, tubos de suspensão, pipetas e eppendorfs (2 por espécime caso irá ser retirado tecido para extração de DNA, armazenar o tecido em álcool PA). Importante: identificar recipientes, tubos de suspensão, pipetas e eppendorfs para cada peixe.

2. Pré-fixação

2.1 Adicionar 6ml de meio de cultura nos recipientes.

2.2 Abrir o espécime realizando uma incisão da cloaca até a região opercular. Retirar rim anterior, rim posterior e baço e colocar no meio de cultura. Anotar o sexo sempre que possível através da observação direta das gônadas.

2.3 Realizar a dissociação do tecido utilizando as seringas, normalmente entre 5 e 15 minutos, até que o tecido esteja completamente dissociado. Retirar possíveis pedaços de fibrosos de pele com o auxílio de pinças.

2.4 Transferir o material dissociado para os tubos de centrífuga, adicionar 200uL de Colchicina a 0,0125%. Ressuspender e levar a estufa (37°C) por 15 - 20 minutos.

2.5 Ressuspender novamente o material e centrifugar a 1000xg por 10 minutos.

2.6 Remover cuidadosamente o sobrenadante, vertendo o mesmo, do lado oposto ao que o material esteja grudado na parede do tubo, em um béquer para descarte, usar um papel toalha para absorver o restante do líquido por capilaridade.

2.7 Acrescentar 6ml de KCl e ressuspender, levar a estufa (37°C) por 25 minutos.

2.8 Após a hipotonização, retirar com o auxílio de pipetas possíveis tecidos em suspensão.

2.9 Adicionar 10 gotas de fixador e ressuspender (a partir desta etapa, evitar ao máximo a produção de bolhas). Centrifugar a 1000xg por 10 minutos. Lembrar de voltar o fixador para o freezer.

3. Fixação

3.1 Remover cuidadosamente o sobrenadante, vertendo o mesmo, do lado oposto ao que o material esteja grudado na parede do tubo, em um béquer para descarte, usar um papel toalha para absorver o restante do líquido por capilaridade.

3.2 Acrescentar 6ml de fixador escorrendo pelo lado do tubo onde a maior parte do material esteja grudada, ressuspender evitando ao máximo a produção de bolhas. Centrifugar a 1000xg por 10 minutos. Lembrar de voltar o fixador para o freezer.

3.3 Repetir os passos acima pelo menos mais uma vez. Caso note que duas fixações não estejam sendo o suficiente para garantir uma boa qualidade dos cromossomos, uma terceira fixação pode ser aplicada ajustando a quantidade máxima de fixador.

3.4 Após a última fixação, remover cuidadosamente o sobrenadante, vertendo o mesmo, do lado oposto ao que o material esteja grudado na parede do tubo, em um béquer para descarte, usar um papel toalha para absorver o restante do líquido por capilaridade.

3.5 Adicionar 1ml de fixador escorrendo lentamente pela parede do tubo onde esteja grudada a maior parte do material. Ressuspender evitando ao máximo bolhas e transferir o material para um eppendorf.

4. Referências

Bertollo, L. A. C. (1978). Cytotaxonomy considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces:

Erythrinidae). *Brazil. J. Genet.*, 2, 17–37.

Molina, W. F., Alves, D. E. O., Araújo, W. C., Martinez, P. A., Silva, M. F. M., & Costa, G.

(2010). Performance of human immunostimulating agents in the improvement of fish cytogenetic preparations. *Genet Mol Res*, 9(3), 1807–1814.

MATERIAL SUPLEMENTAR S3 - Protocolo de extração de DNA a partir de tecidos de peixes utilizando o kit Quick-DNA/RNA Viral Magbead da Zymo.

1. Retirar, com o auxílio de pinças e tesouras cirúrgicas, pequenos pedaços de tecido (cerca de 20mg) e deixar em um eppendorf, com tampa aberta, para que o álcool no tecido possa secar.
2. Macerar o tecido a seco com o auxílio de um pistilo.
3. Adicionar 200uL de DNA/RNA Shield (1X) escorrendo o líquido na ponta do pistilo para desgrudar possíveis pequenos de pedaços de tecido.
4. Adicionar 15uL de proteinase K.
5. Incubar o material em termobloco a 56°C por um período de 3-4h, recomendamos vortexar o material antes da incubação e a cada uma hora.
6. Caso o tecido tenha sido totalmente digerido, preparar a placa (até 16 amostras por placa) para extração automática em um equipamento Locus extracta 32 da seguinte forma:

Colunas:	1 e 7	2 e 8	3 e 9	4, 5, 10 e 11	6 e 12
	400uL de	250uL de	250uL de	250uL de	50uL de
	Buffer	Wash 1	Wash2	Etanol PA	DNA/RNA-
	205uL de				free Water
	amostra				
	10uL de				
	Beads				

7. Programar um protocolo no extrator da seguinte maneira:

Passo	Poço	Nome	Agitação (Min)	Magnet. (Seg)	Espera (Min)	Volume (uL)	Velocidade (1-10)	Temp. (°C)
1	1	Lise	10	120	0	615	5	OFF
2	2	Wash 1	5	60	0	250	5	OFF
3	3	Wash 2	2	60	0	250	5	OFF
4	4	Etanol 1	2	60	0	250	5	OFF
5	5	Etanol 2	2	60	0	250	5	OFF
6	6	Secar	0	0	10	200	5	OFF
7	6	Eluição	3	240	0	50	3	OFF
8	1	Descarte	1	0	0	835	5	OFF

MATERIAL SUPPLEMENTAR S4 - Protocol for using short-read genomic data in phylogenomic analyses with orthologous protein coding genes, adapted from Roncoroni & Gallone (2022):

- 1. Import the raw reads into Galaxy Europe platform (The Galaxy Community, 2022).**
- 2. Filter the raw reads with Trimmomatic tool (Bolger et al., 2014):**

Single-end or paired-end reads?

Paired-end

Input FASTQ file (R1/first of pair) *

Select your data (R1 or forward reads)

Input FASTQ file (R2/second of pair) *

Select your data (R2 or reverse reads)

Perform initial ILLUMINACLIP step?

yes

Adapter sequences to use *

TruSeq3 (paired-end, for MiSeq and HiSeq)

*leave other options in default mode

- 3. Quality evaluation with FastQC (Andrews, 2010):**

Raw read data from your current history *

Select your data (R1 paired and R2 paired)

*leave other options in default mode

- 4. Assembly the short reads into genome scaffolds with MEGAHIT tool (Li et al., 2015):**

Select your input option

Paired-end

Mate 1 input reads *

Select your data (R1 paired)

Mate 2 input reads *

Select your data (R2 paired)

*leave other options in default mode

5. Removing isoforms with cd-hit tool (Fu et al., 2012):

Sequences to cluster/compare *

Select your data (output of MEGAHIT)

Sequence type?

Nucleotide

Sequence identity threshold *

0,95

Compare both strands?

Yes

*leave other options in default mode

6. Assembly quality evaluation with Fasta Statistics tool (Kyran, 2021):

FASTA or Multi-FASTA file *

Select your data (Representative Sequences output of ch-hit)

*leave other options in default mode

7. Assembly quality evaluation with Busco tool (Simão et al., 2015):

Sequences to analyze *

Select your data (Representative Sequences output of ch-hit)

Lineage data source

Download Lineage Data

Mode

Genomic assemblies (DNA)

Auto-detect or select lineage?

Select lineage

Lineage *

Actinopterygii (Adjust according to the study group)

Which outputs should be generated

short summary text

summary image

*leave other options in default mode

8. Rename fasta headers with Replace Text (Necessary to RepeatMasker tool) (Gu et al., 2018):

File to process *

Select your data (Representative Sequences output of ch-hit)

1: Replacement

(>[^]+).+

Replace with:

\1

9. Masking repeated regions with RepeatMasker tool (Smit et al., 2013):

Genomic DNA *

Select your data (Renamed fasta output)

Repeat library source

DFam (curated only, bundle with RepeatMasker)

Select species name from a list?

Yes

Species *

Danio (zebra fish) (Adjust according to the study group)

Output annotation of repeats in GFF format

yes

Perform softmasking instead of hardmasking

yes

*leave other options in default mode

10. Filtering bad contigs with Filter FASTA on the headers and/or the sequences:

FASTA sequences *

Select your data (Masked sequences output of RepeatMasker)

Criteria for filtering on the sequences

Regular expression on the sequences

Regular expression pattern the sequence should match *

^(?=.*A)(?=.*T)(?=.*C)(?=.*G)

*leave other options in default mode

11. Genome annotation with Augustus (Keller et al., 2011):

Genome Sequence *

Select your data (Filtered sequences output of Filter FASTA tool)

Trainingset

Run Augustus with a predefined trainingset

Model Organism *

Danio rerio (Adjust according to the study group)

Softmasking

yes

GFF formatted output

Yes

12. Create a dataset with all protein coding genes multifastas:

Use coding sequences generate by Augustus tool

13. Rename each multifasta within your dataset according to the sample/species name:

14. Rename fasta headers with Regex Find And Replace:

Select lines from *

Select your data (dataset)

Check

Find Regex

>([^]+.+)

Replacement

>#{input_name}_\1

*leave other options in default mode

15. Keep only sequences from a certain size with Filter FASTA on the headers and/or the sequences:

FASTA sequences *

Select your data (coding sequences dataset)

Criteria for filtering on the headers

No filtering

Criteria for filtering on the sequences

Sequence length

Minimum length *

300 (Adjust according to your preference)

*leave other options in default mode

16. Find orthologs with Proteinortho tool (Klemm et al., 2023):

Select the input fasta files (>2) *

Select your data (renamed dataset)

Similarity comparison algorithm *

NCBI-BLASTN+ (nucleotide sequences)

*leave other options in default mode

17. Filter information of single copy orthologs presents in all samples with Filter tool:

Filter

Select your data (orthology-groups file generated by Proteinortho)

With following condition

c1==25* and c2==25*

*This number is related to the number of species in your analysis, in the example above the number of species is 25

18. Extract single copy orthologs presents in all samples with Proteinortho grab proteins (Klemm et al., 2023):

Select the input fasta files

Select your data (renamed dataset)

A orthology-groups file *

Select your data (filtered information of orthology-groups file)

*leave other options in default mode.

19. Rename single copy orthologs with species name with Replace text tool (Gu et al., 2018):

File to process

Select your data (extracted single copy orthologs dataset)

Find pattern

>([^_]+_[^_]+).*

Replace with:

>\1

20. Align genes with MAFFT (Katoh & Standley, 2013):

1: Input batch

Sequences to align *

Select your data (renamed single copy orthologs dataset)

Type of sequences

Nucleic acids

MAFFT flavour

L-INS-i

*leave other options in default mode

21. Proceed to concatenation, partitioning, and phylogenetic inference with your preferred tools.

22. References

- Andrews, S. (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. (*No Title*). <https://cir.nii.ac.jp/crid/1370584340724053142>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120.
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., & Li, W. (2012). CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28(23), 3150–3152.
- Gu, Q., Batut, B., Soranzo, N., Gamaleldin, H., & Von Kuster, G. (2018). bgruening/galaxytools: September release 2019. *Zenodo: Geneva, Switzerland*.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Keller, O., Kollmar, M., Stanke, M., & Waack, S. (2011). A novel hybrid gene prediction method employing protein multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, 27(6), 757–763.
- Klemm, P., Stadler, P. F., & Lechner, M. (2023). Proteinortho6: Pseudo-reciprocal best alignment heuristic for graph-based detection of (co-)orthologs. *Frontiers in Bioinformatics*, 3. <https://doi.org/10.3389/fbinf.2023.1322477>

Kyran, A. (2021). *Fasta Statistics: Display summary statistics for a fasta file*.

Li, D., Liu, C.-M., Luo, R., Sadakane, K., & Lam, T.-W. (2015). MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics*, 31(10), 1674–1676.

Roncoroni, M., & Gallone, B. (2022). *Preparing genomic data for phylogeny reconstruction* [Text]. Galaxy Training Network; Galaxy Training Network. <https://training.galaxyproject.org/training-material/topics/ecology/tutorials/phylogeny-data-prep/tutorial.html>

Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19), 3210–3212.

Smit, A. F. A., Hubley, R., & Green, P. (2013). 2015. *RepeatMasker Open-4.0*.

The Galaxy Community. (2022). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W345–W351. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac247>

MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 2

MATERIAL SUPLEMENTAR S1 - Link para planilha contendo informações detalhadas dos seis satelitomas montados. Superfamílias incluem famílias de satDNAs com 50% ou mais de similaridade, famílias incluem variantes de satDNAs com 80% ou mais de similaridade, variantes incluem sequências de satDNAs com 95% ou mais de similaridade. RUL (tamanho da unidade de repetição) em pares de base (pb). Conteúdo GC em decimais (1=100%). Abundância e divergência intragenômica em %.

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1csrmKey13Vo3SDwnPFfRtDO7Oj9Wj0ME/edit?usp=sharing&ouid=112421924373625102928&rtpof=true&sd=true>