

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

REBECA ROSA DE OLIVEIRA

Impacto da escolha de grupos externos em análises de delimitação de espécies de peixes ciclídeos do gênero *Australoheros* Řičan & Kullander, 2006 (Cichliformes) de bacias costeiras do sul da América do Sul.

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2024

REBECA ROSA DE OLIVEIRA

Impacto da escolha de grupos externos em análises de delimitação de espécies de peixes ciclídeos do gênero *Australoheros* Řičan & Kullander, 2006 (Cichliformes) de bacias costeiras do sul da América do Sul.

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa como requisito para obtenção do título de bacharel em Biologia.

Orientador: Elisabeth Henschel de Lima Costa.

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2024

REBECA ROSA DE OLIVEIRA

Impacto da escolha de grupos externos em análises de delimitação de espécies de peixes ciclídeos do gênero *Australoheros* Řičan & Kullander, 2006 (Cichliformes) de bacias costeiras do sul da América do Sul.

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa como requisito para obtenção do título de bacharel em Biologia.

Orientador: Elisabeth Henschel de Lima Costa.

APROVADA:



Documento assinado digitalmente

REBECA ROSA DE OLIVEIRA

Data: 07/09/2024 12:47:32-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Rebeca Rosa
(UFV)



Documento assinado digitalmente

ELISABETH HENSCHTEL DE LIMA COSTA

Data: 07/09/2024 15:36:30-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Elisabeth Henschel
(Orientadora)
(UFV)

DEDICATÓRIA

O sonho das pessoas não tem fim! - Marshall D. Teach.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos familiares, em especial meus pais, Ney e Joelma, que sempre incentivaram as minhas escolhas, se propuseram a fazer o melhor que podiam para me ver feliz. Obrigada por terem me dado todo apoio, fé e amor necessário para chegar até aqui. Pai, no fim, eu também vou ser pescadora. À minha tia, Maria Júlia, que torceu por mim e que, mesmo distante, sempre me ajudou e se manteve presente.

Agradeço ao Daniel, meu grande amor, que é meu refúgio e me ajudou tanto no emocional quanto na parte prática, se dispondo a me ajudar com dados de uma área completamente diferente da dele, mas sempre com muita boa vontade e muito amor. Obrigada por acreditar em mim, por lutar quando eu não tinha forças e me reerguer quando eu não via mais solução. Sou imensamente feliz ao seu lado.

Agradeço à Elisabeth, minha orientadora, minha guia e minha maior inspiração, de professora, de pesquisadora, de mulher. Você apareceu na minha vida quando eu estava completamente perdida e sem rumo e foi capaz de transformar minhas dúvidas e angústias em energia para construir uma vida nova. Obrigada por ter me orientado, ter me ensinado e ter me cobrado, com muito bom humor e paciência.

Agradeço ao Felipe, que atuou como meu coorientador e que ajudou imensamente nesse trabalho. Infelizmente nosso contato foi apenas de forma remota, mas já foi o suficiente para perceber que, além de ser ictiólogo incrível, também é uma pessoa maravilhosa. Tenho certeza que ainda há muito mais a aprender com você.

Agradeço aos meus amigos da UFV, em especial nos meus companheiros de laboratório (peixes.ufv.integrativos) Cidimar, Lara, Luiza, Maria Clara, Rafaela e Victor por terem me acompanhado nessa jornada, sempre com muito carinho e risadas. Agradeço também à Elidia, pela sua amizade, companhia, por me ouvir reclamar e me dar colo quando eu precisei.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa por me acolher, me ensinar e me fazer ter orgulho de fazer parte dessa comunidade. Agradeço ao curso de Ciências Biológicas – Bacharelado pela oportunidade de aprendizado e crescimento.

Por fim, agradeço com muito amor a mim mesma por não ter desistido e ter conseguido chegar até o fim.

RESUMO

Australoheros é um gênero de peixes ciclídeos, sendo o gênero em sua maioria de água doce, normalmente encontrados na América do Sul e é classificado como um dos 24 gêneros da tribo Heroini. *Australoheros* tem sido bastante revisado por estudos de delimitação de espécies que seguem abordagens integrativas, unindo dados morfológicos e moleculares, além de diversos métodos distintos. Em 2022, foi publicado o último estudo a respeito do assunto, onde foram reconhecidas 17 espécies válidas para o *Australoheros*, segundo análises morfológicas e moleculares através do método Bayesian Poisson Tree Processes (bPTP). Porém, uma premissa importante para o método molecular de delimitação escolhido pelos autores não foi seguida: a deleção dos haplótipos idênticos, baixando a confiabilidade dos resultados. Assim, o presente trabalho se propôs a refazer os testes, além de investigar o impacto que a utilização de diferentes grupos externos causa na delimitação de espécies. Foram utilizados oito grupos externos pertencentes às tribos distintas da família Cichlinae e da família Pseudocrenilabrinae, de modo que os primeiros grupos são mais próximos filogeneticamente do gênero analisado. Foram geradas 16 árvores de delimitação de espécies, oito correspondentes ao gene citocromo c oxidase I (COI) com fragmentos de 654 pares de bases e oito do gene citocromo b (CYTB) com fragmentos de 1099 pares de bases. Os resultados indicaram 14 linhagens delimitadas na análise 1, nove linhagens na análise 2, oito linhagens na análise 3, oito linhagens na análise 4, oito linhagens na análise 5, seis linhagens na análise 6, seis linhagens na análise 7 e oito linhagens na análise 8 para o gene COI; 24 linhagens delimitadas na análise 1, 20 linhagens na análise 2, 16 linhagens na análise 3, 14 linhagens nas análises 4, 5, 6, 7 e 8 para o gene CYTB, mostrando que CYTB delimitou mais espécies do que o gene COI, significando que CYTB é um gene mais confiável para delimitação de espécies do gênero *Australoheros*, indo contra ao resultado apresentado por esse último estudo. Também foi observado que a distância filogenética do grupo externo utilizado para as análises, interferiu na quantidade de espécies delimitadas.

Palavras-chave: Bioinformática; Cichlidae; Coalescência; Genes Mitocondriais; Inferência Bayesiana.

ABSTRACT

Australoheros is a genus of cichlid fish, mostly freshwater species, typically found in South America, and it is classified as one of the 24 genera within the tribe Heroini. *Australoheros* has been extensively reviewed by species delimitation studies employing integrative approaches, combining morphological and molecular data, as well as various distinct methods. In 2022, the latest study on this subject was published, recognizing 17 valid species of *Australoheros* based on morphological and molecular analyses using the Bayesian Poisson Tree Processes (bPTP) method. However, an important assumption for the molecular delimitation method chosen by the authors was not followed: the deletion of identical haplotypes, which reduced the reliability of the results. Thus, the present work aimed to redo the tests and investigate the impact of using different external groups on species delimitation. Eight external groups from distinct tribes within the family Cichlidae and the family Pseudocrenilabrinae were used, with the former groups being more phylogenetically related to the analyzed genus. Sixteen species delimitation trees were generated, eight corresponding to the cytochrome c oxidase I (COI) gene with 654 base pair fragments and eight to the cytochrome b (CYTB) gene with 1099 base pair fragments. The results indicated 14 lineages delimited in analysis 1, nine lineages in analysis 2, eight lineages in analysis 3, eight lineages in analysis 4, eight lineages in analysis 5, six lineages in analysis 6, six lineages in analysis 7, and eight lineages in analysis 8 for the COI gene; 24 lineages delimited in analysis 1, 20 lineages in analysis 2, 16 lineages in analysis 3, 14 lineages in analyses 4, 5, 6, 7, and 8 for the CYTB gene, showing that CYTB delineated more species than the COI gene, meaning that CYTB is a more reliable gene for species delimitation in the genus *Australoheros*, contrary to the results presented by the most recent study. It was also observed that the phylogenetic distance of the external group used for the analyses influenced the number of delimited species.

Keywords: Bioinformatics; Bayesian Inference; Cichlidae; Coalescence; Mitochondrial Genes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: <i>Australoheros macacuensis</i> Ottoni & Costa, 2008. Espécime não preservada. Brasil: Rio de Janeiro: Bacia do Rio Macacu. Foto retirada de Ottoni (2008).	11
Figura 2: Resultado de delimitação de espécies da análise 1 para o gene COI, utilizando como grupo externo <i>Australoheros scitulus</i> , de acordo com o método bPTP.....	30
Figura 3: Resultado de delimitação de espécies da análise 2 para o gene COI, utilizando os grupos externos <i>Australoheros scitulus</i> e <i>Caquetaia spectabilis</i> de acordo com o método bPTP.....	32
Figura 4: Resultado de delimitação de espécies da análise 3 para o gene COI, utilizando os grupos externos <i>Australoheros scitulus</i> , <i>Caquetaia spectabilis</i> e <i>Cichlasoma portalegreense</i> , de acordo com o método bPTP.....	34
Figura 5: Resultado de delimitação de espécies da análise 4 para o gene COI, utilizando os grupos externos <i>Australoheros scitulus</i> , <i>Caquetaia spectabilis</i> , <i>Cichlasoma portalegreense</i> e <i>Geophagus diamantinensis</i> , de acordo com o método bPTP.	36
Figura 6: Resultado de delimitação de espécies da análise 5 para o gene COI, utilizando os grupos externos <i>Australoheros scitulus</i> , <i>Caquetaia spectabilis</i> , <i>Cichlasoma portalegreense</i> , <i>Geophagus diamantinensis</i> e <i>Astronotus crassipinnis</i> , de acordo com o método bPTP.	38
Figura 7: Resultado de delimitação de espécies da análise 6 para o gene COI, utilizando os grupos externos <i>Australoheros scitulus</i> , <i>Caquetaia spectabilis</i> , <i>Cichlasoma portalegreense</i> , <i>Geophagus diamantinensis</i> , <i>Astronotus crassipinnis</i> e <i>Cichla piquiti</i> , de acordo com método bPTP.....	40
Figura 8: Resultado de delimitação de espécies da análise 7 para o gene COI, utilizando os grupos externos <i>Australoheros scitulus</i> , <i>Caquetaia spectabilis</i> , <i>Cichlasoma portalegreense</i> , <i>Geophagus diamantinensis</i> , <i>Astronotus crassipinnis</i> , <i>Cichla piquiti</i> e <i>Oreochromis niloticus</i> , de acordo com o método bPTP.....	42
Figura 9: Resultado de delimitação de espécies da análise 8 para o gene COI, utilizando os grupos externos <i>Australoheros scitulus</i> e <i>Oreochromis niloticus</i> , de acordo com o método bPTP.	44
Figura 10: Resultado de delimitação de espécies da análise 1 para o gene CYTB, utilizando <i>Australoheros kaaygua</i> como grupo externo, de acordo com o método bPTP.	46
Figura 11: Resultado de delimitação de espécies da análise 2 para o gene CYTB, utilizando os grupos externos <i>Australoheros kaaygua</i> e <i>Caquetaia spectabilis</i> , de acordo com o método bPTP.	48

Figura 12: Resultado de delimitação de espécies da análise 3 para o gene CYTB, utilizando os grupos externos <i>Australoheros kaaygua</i> , <i>Caquetaia spectabilis</i> e <i>Cichlasoma portalegrense</i> , de acordo com o método bPTP.....	50
Figura 13: Resultado de delimitação de espécies da análise 4 para o gene CYTB, utilizando os grupos externos <i>Australoheros kaaygua</i> , <i>Caquetaia spectabilis</i> , <i>Cichlasoma portalegrense</i> e <i>Geophagus diamantinensis</i> , de acordo com o método bPTP.....	52
Figura 14: Resultado de delimitação de espécies da análise 5 para o gene CYTB, utilizando os grupos externos <i>Australoheros kaaygua</i> , <i>Caquetaia spectabilis</i> , <i>Cichlasoma portalegrense</i> , <i>Geophagus diamantinensis</i> e <i>Astronotus crassipinnis</i> de acordo com o método bPTP.	54
Figura 15: Resultado de delimitação de espécies da análise 6 para o gene CYTB, utilizando os grupos externos <i>Australoheros kaaygua</i> , <i>Caquetaia spectabilis</i> , <i>Cichlasoma portalegrense</i> , <i>Geophagus diamantinensis</i> , <i>Astronotus crassipinnis</i> e <i>Cichla piquiti</i> , de acordo com o método bPTP.	56
Figura 16: Resultado de delimitação de espécies da análise 7 para o gene CYTB, utilizando os grupos externos <i>Australoheros kaaygua</i> , <i>Caquetaia spectabilis</i> , <i>Cichlasoma portalegrense</i> , <i>Geophagus diamantinensis</i> , <i>Astronotus crassipinnis</i> , <i>Cichla piquiti</i> e <i>Oreochromis niloticus</i> , de acordo com o método bPTP.....	58
Figura 17: Resultado de delimitação de espécies da análise 8 para o gene CYTB, utilizando os grupos externos <i>Australoheros kaaygua</i> e <i>Oreochromis niloticus</i> , de acordo com o método bPTP....	60
Figura 18: Filogenia datada (Inferência Bayesiana) do grupo de espécies <i>A. autrani</i> retirada de Ottoni <i>et al.</i> (2019). Os valores próximos acima dos nós representam a idade média dos nós em milhões de anos.....	66
Figura 19: Delimitação de espécies de <i>Australoheros</i> com base na análise bPTP de sequências COI. Modificado de Lucena <i>et al.</i> 2022. Os nomes de espécie estão em destaque apenas para facilitar a visualização.	69
Figura 20: Delimitação de espécies de <i>Australoheros</i> com base na análise bPTP de sequências COI. Modificado de Lucena <i>et al.</i> 2022. Os nomes de espécie estão em destaque apenas para facilitar a visualização.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências do gene COI utilizadas como base de dados para delimitação de espécies de <i>Australoheros</i>	16
Tabela 2: Sequências do gene CYTB utilizadas como base de dados para delimitação de espécies de <i>Australoheros</i>	20
Tabela 3: Grupos externos utilizados neste trabalho para matrizes dos genes COI e CYTB e com os respectivos números de acessos no GenBank.	23
Tabela 4: Linhagens delimitadas de <i>Australoheros</i> com base nas matrizes do gene COI.	26
Tabela 5: Linhagens delimitadas de <i>Australoheros</i> com base nas matrizes do gene CYTB. .	27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.2	Objetivos	14
2	MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.1	Banco de dados e amostragem taxonômica	16
2.2	Edição de sequências e Construção das matrizes	23
2.3	Reconstrução filogenética	24
2.4	Método de delimitação de espécies	25
3	RESULTADOS	26
3.1	Análises de delimitação de espécies baseadas no gene COI	29
3.1.1	Análise 1	29
3.1.2	Análise 2	31
3.1.3	Análise 3	33
3.1.4	Análise 4	35
3.1.5	Análise 5	37
3.1.6	Análise 6	39
3.1.7	Análise 7	41
3.1.8	Análise 8	43
3.2	Análises de delimitação de espécies baseadas no gene CYTB.	45
3.2.1	Análise 1	45
3.2.2	Análise 2	47
3.2.3	Análise 3	49
3.2.4	Análise 4	51
3.2.5	Análise 5	53
3.2.6	Análise 6	55
3.2.7	Análise 7	57
3.2.8	Análise 8	59
4	DISCUSSÃO	61
4.1	Diferenças nas análises de delimitação de espécies baseadas no gene COI	61

4.2	Diferenças nas análises de delimitação de espécies baseadas no gene CYTB.....	62
4.3	Comparação dos resultados da delimitação de espécies entre o gene COI e o gene CYTB.	63
4.4	Comparação dos resultados obtidos em relação ao trabalho de Lucena <i>et al.</i> (2022).	67
5	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

A família Cichlidae, da ordem Cichliformes, é composta por uma grande diversidade de acantomorfos em sua maioria de água doce, mas com algumas espécies de água salobra e salgada (Kullander, 1998). É formada por 4 subfamílias: Etroplinae, Ptychochrominae, Cichlinae e Pseudocrenilabrinae, sendo a subfamília Cichlinae dividida em sete tribos: Astronotini, Chaetobranchini, Cichlasomatini, Cichlini, Geophagini, Heroini e Retroculini (Smith *et al.*, 2008). Aproximadamente 257 gêneros e 1758 espécies, validadas atualmente, são descritas para a família dos ciclídeos (Fricke *et al.*, 2024). *Australoheros* Říčan & Kullander, 2006 são peixes popularmente conhecido como ‘Cará’ ou ‘Acará’, comumente encontrados em rios e lagos ao longo da costa da atlântica sul-americana (Lucena *et al.* 2022) e atualmente esse gênero contém 17 espécies válidas (Fricke *et al.*, 2024). *Australoheros* pertence à tribo Heroni, descrita por Smith *et. al* (2008), que possui cerca de 142 espécies alocadas em 24 gêneros. Essa tribo apresenta uma vasta distribuição geográfica, desde espécies encontradas no sul de Buenos Aires como o *Australoheros facetus* (Jenyns, 1842) até espécies localizadas nas bacias dos rios Bravo-Grande do Texas, como *Herichthys cyanoguttatus* Baird & Girard, 1854 (Graça, 2008).



Figura 1: *Australoheros macacuensis* Ottoni & Costa, 2008. Espécime não preservada. Brasil: Rio de Janeiro: Bacia do Rio Macacu. Foto retirada de Ottoni (2008).

Říčan & Kullander (2006), apesar de não terem utilizado diferente fontes de dados

para descrever o gênero, realizaram uma delimitação de espécies de acordo com métodos baseados em árvores e também baseado em caracteres morfológicos. Inicialmente, as espécies de *Australoheros* foram classificadas como *Chiclasoma* Swainson, 1839, porém a análise feita por Rican & Kullander (2006), delimitou *Australoheros* como um novo gênero monofilético. Diversos trabalhos sobre a revisão taxonômica de *Australoheros* foram publicados desde então e incluíram a descrição de novas espécies para o gênero (Ottoni *et al.*, 2006.; Ottoni *et al.*, 2008.; Ottoni *et al.*, 2009.; Ottoni *et al.*, 2010.; Ottoni *et al.*, 2011.; Ottoni *et al.*, 2012.; Ottoni *et al.*, 2013.; Ottoni *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2022, entre outros). O estudo mais recente publicado sobre a taxonomia de *Australoheros* foi o de Lucena *et al.* (2022), utilizado como base para este trabalho.

Apesar do presente estudo utilizar somente artifícios de bioinformática para a análise de delimitação, compreendemos que o uso da taxonomia integrativa possui uma confiabilidade mais satisfatória como ferramenta de delimitação de espécies. A taxonomia integrativa é um conceito que propõe o uso de diversas evidências (morfológicas, moleculares, filogenéticas, ontogenéticas) para delimitar espécies de forma mais assertiva, através de perspectivas complementares. Apesar dessa ideia ter sido introduzida por diferentes autores (DAYRAT, 2005; WILL *et al.*, 2005; SCHILICK-STEINER *et al.*, 2010; YEATES *et al.*, 2011), acreditamos que o cerne da taxonomia integrativa aconteceu por conta do debate sobre a pluralidade existente para os conceitos de espécies e em como isso impactava diretamente o processo de delimitação de espécies. Segundo De Queiroz (2007), as espécies são unidades fundamentais para a biologia e devido à sua importância e complexidade, sua definição sempre foi controversa. Mayden (1997) listou 24 conceitos diferentes para 'espécie', mas ainda existem outras definições alternativas. A existência para essa diversidade de conceitos pode ser justificada pelo enfoque em diferentes propriedades biológicas. A biologia é uma área complexa, composta por diferentes subáreas e por isso existem diferentes perspectivas de estudo. Contudo, a existência desses conceitos alternativos de espécie, causava incompatibilidade em relação ao limite e ao número de espécies, impedindo que a delimitação de espécies acontecesse em consenso.

Por isso, De Queiroz (2007) sugeriu a reconciliação desse problema criando o 'Conceito Unificado de Espécie'. Esse conceito afirma que espécies são linhagens de metapopulações que evoluem separadamente, ou mais especificamente, como

segmento dessa linhagem; em outras palavras, espécies são um grupo de indivíduos de uma metapopulação que possuem uma história evolutiva diferente dos demais; e essa história existe mesmo se não formos capazes de identificá-la. A criação do conceito unificado de espécie retirou o debate conceitual sobre espécies e criou uma discussão metodológica – quais as melhores ferramentas para delimitação de espécies? Isso permitiu que técnicas mais efetivas fossem desenvolvidas.

Um dos fundamentos amplamente utilizados após a descrição do Conceito Unificado de Espécies foi a Teoria da Coalescência, proposta por Kingman, (1982a,b,c). A coalescência acontece quando, em um momento no passado, dois genes (ou alelos, que são variações do mesmo gene) se juntaram e formaram uma única cópia (Kiihl, 2005). Segundo Cruz (2020), atualmente a Teoria da Coalescência é definida como um evento estocástico que utiliza árvores genealógicas para modelar histórias evolutivas de uma determinada população, utilizando sequências de DNA – os genes. Ao invés de simular um modelo evolutivo no futuro, a Teoria da Coalescência volta seus olhares para o passado evolutivo, com objetivo de tentar identificar em que momento no tempo os genes analisados se unem, ou seja, coalescem. Esse processo é denominado ‘rastreamento de alelos’ e busca encontrar o ancestral comum mais recente (MRCA) do alelo analisado em questão (Marjoram & Tavaré, 2006). A Teoria da Coalescência tem grande relação com o modelo populacional proposto por Wright–Fisher (1930), que também analisa o processo evolutivo de uma população, de acordo com a transmissão de genes de geração a geração. Porém, esse modelo é muito simplificado e não leva em consideração muitas características reais de uma população (sobreposição de gerações, diploidia, recombinação gênica, entre outros). Assim, o modelo coalescente permite uma simulação mais complexa, podendo realizar análises populacionais de distribuição geométrica e exponencial (Hein *et al.*, 2005).

Diversos modelos estatísticos para delimitação de espécies usam a teoria da coalescência como referência. O método escolhido para esse trabalho foi a Análise Bayesiana para a Superposição de Processos de Poisson (Bayesian Poisson Tree Processes, bPTP), proposto por Zhang *et al.* (2013), que consiste na realização de árvores filogenéticas não ultramétricas, onde a taxa de especiação é modelada usando diretamente o número de substituições nucleotídicas. Essa modelagem só é possível devido a premissa de que o número de substituições nucleotídicas entre espécies é maior do que o número de substituições intraespecíficas (Zhang *et al.*,

2013). O conceito de espécie usado para definir o método foi o Conceito Filogenético de Espécie (The Phylogenetic Species Concept, PSC, Cracraft, 1983). Outros métodos coalescentes também são baseados nesse conceito, como o The General Mixed Yule Coalescent (GMYC) model (Fujisawa and Barraclough, 2013; Pons et al., 2006), que foi uma das inspirações para apresentação do bPTP (Zhang *et al.*, 2013). Métodos como o bPTP e o GMYC, precisam ser corretamente enraizados e a escolha de grupos externos para as raízes das árvores, impactam diretamente no resultado da delimitação de espécies (bPTP server, Zhang *et al.*, 2013). Um estudo feito por DeSalle *et al.* (2023), sugere que a utilização de grupos externos evolutivamente distantes aumenta a incerteza filogenética e, por consequência, podem causar alterações na delimitação de espécies. Uma das propostas desse trabalho é justamente verificar qual impacto o uso de grupos externos filogeneticamente distantes pode causar no processo de delimitação de espécies. Devido à similaridade com o método GMYC, outra premissa importante para implementação do método bPTP é a deleção dos haplótipos idênticos. A utilização dessas sequências idênticas é conhecida em GMYC por gerar ramificações terminais de comprimento zero, levando ao cálculo de um λ^1 coalescente infinito (Fujisawa and Barraclough, 2013).

As análises feitas por Lucena *et al.* (2022), estudo mais recente sobre a taxonomia de *Australoheros*, foram realizadas utilizando o método bPTP. No entanto, o trabalho não apresentou a remoção dos haplótipos idênticos no seu conjunto de dados, violando umas das premissas do método e tornando os resultados de delimitação de espécies para *Australoheros* pouco confiáveis. Portanto, a segunda proposta desse trabalho é refazer as análises feitas por Lucena *et al.* (2022), seguindo os mesmos parâmetros, mas removendo os haplótipos idênticos, tal qual o método bPTP sugere.

1.2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é investigar e observar como a escolha de diferentes grupos-externos podem modificar os resultados obtidos em análises de delimitação de espécies, utilizando como modelo espécies do gênero *Australoheros*,

¹ λ se refere uma variável utilizada para indicar o processo de diversificação de espécies.

bem como replicar as análises feitas por Lucena *et al.*, (2022). Como objetivos específicos, pretende-se:

1. Selecionar e organizar toda a lista de terminais utilizados por Lucena *et al.* (2022) para replicar as análises;
2. Baixar as sequências correspondentes aos genes COI e CYTB para os terminais utilizados por Lucena *et al.* (2022);
3. Definir os grupos-externos que serão utilizados na construção de cada matriz e obter as suas sequências correspondentes dos genes COI e CYTB;
4. Alinhar, traduzir e editar as sequências organizadas na etapa anterior, utilizando softwares de bioinformática para a montagem da primeira matriz de dados;
5. Filtrar e remover os haplótipos idênticos das matrizes de dados;
6. Realizar uma análise de Inferência Bayesiana;
7. Realizar uma análise de delimitação de espécies;
8. Interpretar e comparar os resultados obtidos nas árvores de delimitação de espécies entre si (i.e., diferenças nos resultados obtidos com o uso de cada gene e com o uso de diferentes grupos-externos) e também comparar com os resultados apresentados por Lucena *et al.* (2022).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Banco de dados e amostragem taxonômica

O presente estudo se baseou nas mesmas sequências utilizadas por Lucena *et al.* (2022) baixadas através do GenBank “<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>” (Tabelas 1 e 2). Além disso, sequências adicionais de outras espécies de Cichilidae obtidas no GenBank foram utilizadas como grupos-externos em diferentes análises visando compreender seus respectivos impactos nas análises de delimitação de espécies. A Tabela 3 mostra a escolha dos grupos-externos aqui utilizados de acordo com a filogenia proposta por Ottoni (2008), de modo que grupos escolhidos fossem progressivamente se distanciando evolutivamente do gênero. Segundo Lucena *et al.* (2022), as sequências avaliadas incluíram dois fragmentos de genes mitocondriais: o citocromo oxidase b (CYTB) e o citocromo C oxidase (COI). Um total de 254 sequências de DNA foram baixadas e utilizadas neste trabalho.

Tabela 1: Sequências do gene COI utilizadas como base de dados para delimitação de espécies de Australoheros.

Nº	Haplótipo utilizado após exclusão dos haplótipos idênticos	Espécie (de acordo com a proposta de Lucena <i>et al.</i> 2022)	Todos os haplótipos (com código de acesso Genbank)	Terminais utilizados nas análises de Lucena <i>et al.</i> 2022
1	MZ969519.1	<i>Australoheros acaroides</i> (Hensel, 1870)	MZ969519.1 / MZ969521.1 / MZ969529.1 / MZ969535.1 / MZ969536.1 / MZ969577.1 / MZ969578.1 / MZ969579.1 / MZ969581.1 / MZ969594.1 / MZ969595.1 / MZ969596.1 / MZ984108.1	MZ969521.1: MCP53174c10_coi / MZ969529.1: UFRGS 19912 A. acaroides Jordão CIC 160 / MZ969535.1: MCP 48688 A. acaroides Touros CIC 176 / MZ969536.1: MCP 48688 A. acaroides Touros CIC 178 / MZ969594.1: MCP 48688 A. acaroides Touros CIC 34 / MZ969595.1: MCP 48671 A. acaroides Antas CIC 35 / MZ969596.1: A. acaroides Antas CIC 36 / MZ969577.1: MCP 49694 A. sp touros CIC 310 / MZ969578.1: MCP 49695 A. sp ManoelLeão CIC311 / MZ969579.1: MCP 49984 A. sp ManoelLeão CIC 312 / MZ969581: MCP 50385 A. acaroides AmolaFaca CIC 318 / MZ969586.1: MCP 50385_E1 A. acaroides AmolaFaca CIC324 / MZ984108.1: MCP 48666 A. acaroides Touros CIC 177

2	MZ969520.1	<i>A. acaroides</i>	MZ969520.1	MZ969521.1: c10_coi / MZ969529.1: UFRGS 19912 <i>A. acaroides</i> Jordão CIC 160 / MZ969535.1: MCP 48688 <i>A. acaroides</i> Touros CIC176 / MZ969536.1: MCP 48688 <i>A. acaroides</i> Touros CIC 178 / MZ969577.1: MCP 49694 <i>A. sp</i> touros CIC 310 / MZ969578.1: MCP 49695 <i>A. sp</i> ManoelLeão CIC311 / MZ969579.1: MCP 49984 <i>A. sp</i> ManoelLeão CIC 312 / MZ969581: MCP 50385 <i>A. acaroides</i> AmolaFaca CIC 318 / MZ969586.1: MCP 50385_E1 <i>A. acaroides</i> AmolaFaca CIC324 / MZ969594.1: MCP 48688 <i>A. acaroides</i> Touros CIC 34 / MZ969595.1: MCP 48671 <i>A. acaroides</i> Antas CIC35 / MZ969596.1: <i>A. acaroides</i> Antas CIC36 / MZ984108.1: MCP 48666 <i>A. acaroides</i> Touros CIC 177
3	MZ969532.1	<i>A. acaroides</i>	MZ969532.1 / MZ969533.1 / MZ969534.1 / MZ969592.1	MZ969532.1: MCP 48666 <i>A. acaroides</i> ArroioRibeirao CIC 170 / MZ969533.1: MCP 48666 <i>A. acaroides</i> ArroioRibeirao CIC 171 / MZ969534.1: MCP 48666 <i>A. acaroides</i> ArroioRibeirao CIC 174 / MZ969592: MCP 48464 <i>A. acaroides</i> Tainhas CIC33
4	MZ969540.1	<i>A. acaroides</i>	MZ969539.1 / MZ969540.1 / MZ969584.1 / MZ969587.1	MZ969539: LBP 14564 <i>A. acaroides</i> Agudo CIC 185 / MZ969540: LBP 14581 <i>A. acaroides</i> Julio de Castilho CIC186 / MZ969584: MCP 50425 F5 <i>A. acaroides</i> ArroioFelicio CIC322 coi / MZ969587: MCP 5042_5_F6 <i>A. acaroides</i> ArroioFelicio CIC325
5	MZ969576.1	<i>A. acaroides</i>	MZ969576.1	<i>A. acaroides</i> Ibarama CIC31
6	MZ969580.1	<i>A. acaroides</i>	MZ969580.1	<i>Não aparece na árvore</i>
7	MZ969583.1	<i>A. acaroides</i>	MZ969583.1	<i>A. acaroides</i> RioSaturno CIC 321 coi
8	MZ969589.1	<i>A. acaroides</i>	MZ969589.1 / MZ969590.1 / MZ969591.1	MZ969589.1: MCP 51163A <i>A. acaroides</i> Antas CIC327 coi / MZ969590.1: MCP 51163B <i>A. acaroides</i> Antas CIC328 coi / MZ969591.1: MCP 51163A <i>A. acaroides</i> Antas CIC329 coi
9	MZ969602.1	<i>A. acaroides</i>	MZ969602.1	MCP53174 c10_coi
10	MZ984107.1	<i>A. acaroides</i>	MZ969541.1 / MZ969597.1 / MZ984107.1	MZ969541.1: LBP 14463 <i>A. acaroides</i> Caraá CIC 187 / MZ969597.1: MCP 48666 <i>A. acaroides</i> Antas CIC 37 / MZ984107.1: MCP 48666 <i>A. acaroides</i> ArroioRibeirao CIC 169
11	JX111689.1	<i>Australoheros facetus</i> (Jenyns, 1842)	JX111681.1 / JX111683.1 / JX111684.1 / JX111687.1 / JX111688.1 / JX111689.1 / JX111690.1 / JX111691.1	JX111684: <i>A. facetus</i> UNMDPT 0311 / JX111687: <i>A. facetus</i> UNMDPT 0314 / JX111683: <i>A. facetus</i> UNMDPT 0315 / JX111691: <i>A. facetus</i> UNMDPT 0313 / JX111690: <i>A. facetus</i> UNMDPT 0358 / JX111689: <i>A. facetus</i> UNMDPT 0359 / JX111688: <i>A. facetus</i> UNMDPT 0360
12	MZ969506.1	<i>A. facetus</i>	MZ969506.1	3927 <i>A. facetus</i> Cuareim

13	MZ969507.1	<i>A. facetus</i>	MZ969507.1	3950 <i>A. facetus</i> El Pinar
14	MZ969522.1	<i>Australoheros ipatinguensis</i> Ottoni & Costa, 2008	MZ969522.1	UFRGS 19072 <i>A. ipatinguensis</i> (CP) Pingo-d'Água CIC125
15	MZ969523.1	<i>A. ipatinguensis</i>	MZ969523.1	UFRGS 19062 <i>A. ipatinguensis</i> (CP) Pingo-d'Água CIC126
16	MZ969524.1	<i>A. ipatinguensis</i>	MZ969524.1	UFRGS 19037 <i>A. ipatinguensis</i> (CP) Pedro Canário CIC127
17	MZ969525.1	<i>A. ipatinguensis</i>	MZ969525.1	UFRGS 18879 <i>A. ipatinguensis</i> (AU) SilvaJardim CIC 128
18	MZ969526.1	<i>A. ipatinguensis</i>	MZ969526.1 / MZ969531.1 / MZ969546.1 / MZ969547.1 / MZ969548.1 / MZ969552.1 / MZ969553.1 / MZ969554.1 / MZ969555.1	MZ969531.1: <i>A. ipatinguensis</i> (CP) Cristaldo Norte / MZ969531.1: CZNC 1099 <i>A. ipatinguensis</i> (CP) Cristaldo Norte CIC 162 / MZ969546.1: LBP 9105 <i>A. ipatinguensis</i> (MA) Brejo CIC 200 / MZ969547.1: LBP 11171 <i>A. ipatinguensis</i> (MA) Brejo CIC 202 / MZ969548.1: NPM 5307 <i>A. ipatinguensis</i> (MA) Rio de Janeiro CIC 274 / MZ969552.1: MNRJ 47291 <i>A. ipatinguensis</i> São Domingos CIC 286 / MZ969553.1: MNRJ 47397 <i>A. ipatinguensis</i> (MU) muriae SãoDomingos CIC 287 / MZ969554.1: MNRJ 47397 <i>A. ipatinguensis</i> (MU) SãoDomingos CIC 288 / MZ969555.1: MNRJ 47307 <i>A. ipatinguensis</i> (MU) SãoDomingos CIC 289 / MZ969526.1: UFRGS 19024 <i>A. sp</i> Espírito Santo CIC130
19	MZ969527.1	<i>A. ipatinguensis</i>	MZ969527.1	UFRGS 18937 <i>A. sp</i> EspíritoSanto CIC 131
20	MZ969530.1	<i>A. ipatinguensis</i>	MZ969530.1	CZNC 1027 <i>A. ipatinguensis</i> (CP) São Mateus CIC 161
21	MZ969549.1	<i>A. ipatinguensis</i>	MZ969549.1	MNRJ 47279 <i>A. ipatinguensis</i> (MA) Quarenta CIC282
22	MZ969550.1	<i>A. ipatinguensis</i>	MZ969550.1	MNRJ 47279 <i>A. ipatinguensis</i> (MA) Quarenta CIC283
23	MZ969598.1	<i>A. ipatinguensis</i>	MZ969598.1	UNV 1261 <i>A. ipatinguensis</i> (CP) Pingo-d'Água CIC85
24	MZ969599.1	<i>A. ipatinguensis</i>	MZ969599.1	UNV 1306 <i>A. ipatinguensis</i> (CP) Pingo-d'Água CIC 86
25	MZ969600.1	<i>A. ipatinguensis</i>	MZ969600.1 / MZ969601.1	MZ969600.1: UNV 1312 <i>A. ipatinguensis</i> (CP) Pingo-d'Água CIC87 / MZ969601.1: DZSJ 1306 <i>A. sp</i> Pingo-d'Água CIC93
26	MZ969505.1	<i>Australoheros minuano</i> Řičan & Kullander, 2008	MZ969505.1 / MZ969508.1 / MZ969510.1 / MZ969517.1 / MZ969518.1 /	MZ969505.1: 3911 <i>A. canterai</i> Ceibal / MZ969508.1: <i>A. canterai</i> Ceibal / MZ969510.1: 4014 <i>A. canterai</i> Chuy / MZ969518.1: 8106 <i>A. canterai</i> Centurión / MZ969517.1: 4958 <i>A. canterai</i> Negro
27	MZ969509.1	<i>A. minuano</i>	MZ969509.1	3973 <i>A. canterai</i> Ceibal
28	MZ969511.1	<i>A. minuano</i>	MZ969511.1	4015 <i>A. canterai</i> Ceibal

29	MZ969513.1	<i>A. minuano</i>	JX111682.1 / JX111685.1 / JX111686.1 / KJ552359.1 / KJ552539.1 / MZ969513.1 / MZ969514.1 / MZ969516.1	JX111682: A. facetus UNMDPT 0499 / JX111685: A. facetus UNMDPT 0500 / JX111686: A. facetus UNMDPT 0501 / KJ552359: A. facetus Ex70H12 / KJ552539.1: A. facetus Ex69H12 / MZ969513.1: 4079 4958 A. facetus Maldonado / MZ969514.1: 4514 A. facetus Maldonado / MZ969516.1: 4957 A. facetus Maldonado
30	MZ969551.1	<i>Australoheros oblongus</i> (Castelnau, 1855)	MZ969551.1	MNRJ 47247 <i>A. oblongus</i> (MC) Macacu CIC 285
31	MZ969561.1	<i>A. oblongus</i>	MZ969537.1 / MZ969538.1 / MZ969561.1 / MZ969562.1 / MZ969563.1 / MZ969564.1 / MZ969565.1 / MZ969569.1 / MZ969570.1 / MZ969572.1 / MZ969573.1 / MZ969575.1	MZ969537.1: MCP 48666 <i>A. acaroides</i> ArroioRibeirao CIC 170 / MZ969538.1: MCP 49007 <i>A. oblongus</i> (MT) Cipo CIC 180 / MZ969561.1: MNRJ 47336 <i>A. robustus</i> Cachoeirinha CIC 295 / MZ969562.1: MNRJ 47336 <i>A. robustus</i> Cachoeirinha CIC 296 / MZ969563.1: MNRJ 47336 <i>A. robustus</i> Cachoeirinha CIC 297 / MZ969564.1: MNRJ 47336 <i>A. robustus</i> Cachoeirinha CIC 298 / MZ969565.1: MNRJ 47336 <i>A. robustus</i> Cachoeirinha CIC 299 / MZ969569.1: MNRJ 47367 <i>A. oblongus</i> (MN) SantaRita CIC 303 / MZ969570.1: MNRJ 47367 <i>A. oblongus</i> (MN) SantaRita CIC 304 / MZ969572.1: MNRJ 47367 <i>A. oblongus</i> (MN) SantaRita CIC 306 / MZ969573.1: MNRJ 47367 <i>A. oblongus</i> (MN) SantaRita CIC 307 / MZ969575.1: MCP 49295 <i>A. oblongus</i> (MT) Cipo CIC 309
32	MZ969567.1	<i>A. oblongus</i>	MZ969567.1 / MZ969568.1 / MZ969542.1 / MZ969545.1 / MZ969556.1 / MZ969557.1 / MZ969558.1 / MZ969559.1 / MZ969560.1 / MZ969566.1 / MZ969571.1 / MZ969582.1	MZ969542.1 LBP 14389 <i>A. oblongus</i> Ubatuba CIC 188 / MZ969545.1 <i>A. oblongus</i> (MT) Cipó / MZ969556.1 MNRJ 47346 <i>A. oblongus</i> (BB) Bananal CIC 290 / MZ969557.1 MNRJ 47346 <i>A. oblongus</i> (BB) Bananal CIC 291 / MZ969558.1 MNRJ 47346 <i>A. oblongus</i> (BB) Bananal CIC 292 / MZ969559.1 MNRJ 47346 <i>A. oblongus</i> (BB) Bananal CIC 293 / MZ969560.1 MNRJ 47346 <i>A. oblongus</i> (BB) Bananal CIC 294 / MZ969571.1 MNRJ 47367 <i>A. oblongus</i> (MN) SantaRita CIC 305 / MZ969567.1 MNRJ 47365 <i>A. oblongus</i> (PA) Peixe CIC 301 / MZ969566.1 MNRJ 47365 <i>A.</i> <i>oblongus</i> (PA) Peixe CIC 300 / MZ969568 MNRJ 47365 <i>A. oblongus</i> (PA) Peixe CIC 302/ MZ969582.1 MCP 42383 <i>A. oblongus</i> (MT) NOP CIC 32
33	MZ969543.1	<i>Australoheros ribeirae</i> Ottoni, Oyakawa & Costa, 2008	MZ969543.1	LBP 2133 <i>A. ribeirae</i> PedroteToledo CIC189

34	MZ969585.1	<i>Australoheros ricani</i> Lucena, Kullander, Norén & Calegari 2023	MZ969585.1 / MZ969588.1	MZ969585.1: MCP 5042 5 _ F6 <i>A. acaroides</i> Arroio Felício CIC 325 COI / MZ969588.1: MCP50427_F10 <i>A. ricani</i> Rio Morcego CIC326
35	MZ969593.1	<i>Australoheros angiru</i> Řičan, Piálek, Almirón & Casciotta, 2011	MZ969593.1	MCP 51293 36 <i>A. angiru</i> Rio Jacutinga CIC 330 coi
36	MZ969603.1	<i>Australoheros sanguineus</i> Ottoni, 2013	MZ969544.1 / MZ969603.1 / MZ969604.1	MZ969544: LBP 1050 <i>A. sanguineus</i> Papanduva CIC 198 / MZ969603.1: MCP <i>A. sanguineus</i> 40635 e6_coi / MZ969604.1: MCP 40635 <i>A. sanguineus</i> e7_coi
37	MZ969503.1	<i>Australoheros scitulus</i> (Řičan & Kullander, 2003)	MZ969502.1 / MZ969503.1 / MZ969512.1 / MZ969515.1	MZ969502: 121 <i>A. scitulus</i> coi / MZ969503: 3321 <i>A. scitulus</i> coi / MZ969512: 4051 <i>A. scitulus</i> coi / MZ969515: 4858 <i>A. scitulus</i> coi
38	MZ969504.1	<i>A. sp. Arapey</i>	MZ969504.1	3322 <i>A. cf. canterai</i> "Arapey"

Tabela 2: Sequências do gene CYTB utilizadas como base de dados para delimitação de espécies de *Australoheros*.

Nº	Haplótipo utilizado após exclusão dos haplótipos idênticos	Espécies (de acordo com a proposta de Lucena et al. 2022)	Todos os haplótipos (com código de acesso Genbank)	Terminais utilizados nas análises de Lucena et al. 2022
1	OK020133.1	<i>A. acaroides</i>	OK020133.1	8179 <i>A. acaroides</i> Cebollati
2	OK020116.1	<i>A. acaroides</i>	OK020116.1	<i>A. acaroides</i> Faxinal CIC 321
3	OK020114.1	<i>A. acaroides</i>	OK020114.1	<i>A. acaroides</i> Manuel Leão CIC 311
4	OK020113.1	<i>A. acaroides</i>	OK020113.1	<i>A. acaroides</i> Touros CIC 34
5	OK020117.1	<i>A. acaroides</i>	OK020112.1 / OK020115.1 / OK020117.1 /	OK020112: <i>A. acaroides</i> Julio de Castilhos CIC 186 / OK020115: <i>A. acaroides</i> Ao Felício C 325 / OK020117: <i>A. acaroides</i> Ao Felício C 322
6	OK020099.1	<i>A. acaroides</i>	OK020099.1	12623 <i>A. acaroides</i> Olimar
7	OK020095.1	<i>A. acaroides</i>	OK020095.1	12786 <i>A. acaroides</i> Olimar
8	OK020094.1	<i>A. acaroides</i>	OK020094.1	8180 <i>A. acaroides</i> Cebollati
9	MK414421.1	<i>A. acaroides</i>	MK414419.1 / MK414420.1 / MK414421.1 /	MK414419: <i>A. sp</i> Timbe do Sul UFRJ 10499 / MK414420.1: <i>A. sp</i> Timbe do Sul UFRJ 104992 / MK414421.1: <i>A. sp</i> Timbe do Sul UFRJ 104993
10	OK020093.1	<i>A. acaroides</i>	AY998659.1 / OK020093.1	AY998659: <i>A. sp</i> Uruguai / OK020093: 8187 <i>A. acaroides</i> Cebollati
11	OK020098.1	<i>A. facetus</i>	OK020096.1 / OK020098.1	OK020096: 3927 <i>A. facetus</i> Cureim / OK020098: 4514 <i>A. facetus</i> Maldonado
12	OK020097.1	<i>A. facetus</i>	OK020097.1	3950 <i>A. facetus</i> El Pinar
13	AY998665.1	<i>A. facetus</i>	AY843387.1 / AY998665.1	AY843387: <i>A. facetus</i> stri 4692 / AY998665: <i>A. facetus</i> 2 Entre Ríos
14	AY998666.1	<i>A. facetus</i>	AY998666.1	AY998666 <i>A. facetus</i> 1163
15	HQ197708.1	<i>Australoheros forquilha</i> Řičan & Kullander, 2008	HQ197708.1	HQ197708 <i>A. forquilha</i> A23
16	HQ197707.1	<i>A. forquilha</i>	HQ197707.1	HQ197707 <i>A. forquilha</i> A22
17	OK020131.1	<i>A. ipatinguensis</i>	OK020131.1	<i>A. capixaba</i> Conceição da Barra CIC 130
18	OK020122.1	<i>A. ipatinguensis</i>	OK020122.1	<i>A. perdi</i> Pingo-d'Água CIC 125

19	OK020121.1	<i>A. ipatinguensis</i>	OK020121.1	<i>A. perdi</i> Pingo-d'Água CIC 126
20	OK020120.1	<i>A. ipatinguensis</i>	OK020120.1	<i>A. cf autrani</i> Silva Jardim CIC 128
21	OK020119.1	<i>A. ipatinguensis</i>	OK020119.1	<i>A. macaensis</i> Rio dos Quarenta CIC 283
22	OK020118.1	<i>A. ipatinguensis</i>	OK020118.1	<i>A. capixaba</i> Cristal do Norte CIC 162
23	MK414414.1	<i>A. ipatinguensis</i>	MK414414.1 / MK414413.1 / MK414412.1 / MK414411.1 / MK414410.1 / MK414409.1	MK414414 <i>A. saquarema</i> UFRJ 106054/ MK414413 <i>A. saquarema</i> UFRJ 10605/ MK414412 <i>A. autrani</i> UFRJ 75643/ MK414411 <i>A. autrani</i> UFRJ 75642/ MK414410 <i>A. autrani</i> UFRJ 7564/ MK414409 <i>A. autrani</i> UFRJ 7770/
24	MK414398.1	<i>A. ipatinguensis</i>	MK414398.1 / MK414397.1	MK414398 <i>A. macaensis</i> UFRJ 75672/ MK414397 <i>A. macaensis</i> UFRJ 7567
25	MK414396.1	<i>A. ipatinguensis</i>	MK414396.1	MK414396 <i>A. ipatinguensis</i> UFRJ 98532
26	MK414395.1	<i>A. ipatinguensis</i>	MK414395.1	MK414395 <i>A. ipatinguensis</i> UFRJ 9853
27	MK414394.1	<i>A. ipatinguensis</i>	MK414394.1 / MK414393.1 / MK414392.1 / MK414391.1	MK414394 <i>A. muriae</i> UFRJ 83934/ MK414393 <i>A. muriae</i> UFRJ 83933/ MK414392 <i>A. muriae</i> UFRJ 83932/ MK414391 <i>A. muriae</i> UFRJ 8393
28	MK414390.1	<i>A. ipatinguensis</i>	MK414390.1 / MK414389.1 / MK414388.1	MK414390 <i>A. perdi</i> UFRJ 8506/ MK414389 <i>A. perdi</i> UFRJ 8507/ MK414388 <i>A. perdi</i> UFRJ 8508
29	MK414377.1	<i>A. ipatinguensis</i>	MK414377.1 / MK414376.1 / MK414375.1 / MK414374.1	MK414377 <i>A. cf capixaba</i> UFRJ 95114/ MK414376 <i>A. cf capixaba</i> UFRJ 95113/ MK414375 <i>A. cf capixaba</i> UFRJ 95112/ MK414374 <i>A. cf capixaba</i> UFRJ 9511/
30	HQ197686.1	<i>Australoheros kaaygua</i> Casciotta, Almirón & Gómez, 2006	HQ197686.1	<i>A. kaaygua</i> H1
31	OK020105.1	<i>A. minuano</i>	OK020105.1	4079 <i>A. canterai</i> Negro
32	OK020102.1	<i>A. minuano</i>	OK020102.1	3911 <i>A. canterai</i> Ceibal
33	OK020107.1	<i>A. minuano</i>	OK020107.1 / OK020106.1 / OK020104.1 / OK020103.1 / OK020101.1 / OK020100.1	OK 20107.1 8106 <i>A. canterai</i> Centurión / OK020106 8123 <i>A. canterai</i> Centurión / OK020104 4015 <i>A. canterai</i> Ceibal / OK020103 4014 <i>A. canterai</i> Chuy / OK020100 3972 <i>A. canterai</i> Ceibal / OK020101 3973 <i>A. canterai</i> Ceibal
34	OK020124.1	<i>A. oblongus</i>	OK020124.1	<i>A. macacuensis</i> Rio Macacu CIC 285
35	OK020127.1	<i>A. oblongus</i>	OK020127.1 / OK020126.1	OK02012.1 CIC 301 Juiz de Fora / OK020126.1 CIC 302 Juiz de Fora
36	OK020132.1	<i>A. oblongus</i>	OK020132.1 / OK020125.1 / OK020123.1	OK020132.1 <i>A. robustus</i> Cachoeirinha CIC 296 / OK020123.1 <i>A. mattsosi</i> Rio Cipó CIC 309
37	MK414399.1	<i>A. oblongus</i>	MK414399.1	MK414399 <i>A. macacuensis</i> UFRJ 106342
38	MK414386.1	<i>A. oblongus</i>	MK414386.1	MK414386 <i>A. cf barbosa</i> UFRJ 82913
39	MK414379.1	<i>A. oblongus</i>	MK414379.1 / MK414378.1 / MK414373.1 / MK414372.1 /	MK414379 <i>a. cf Montanus</i> UFRJ 85652/ MK414378 <i>a. cf Montanus</i> UFRJ 8565/ MK414373 <i>A. mattsosi</i> UFRJ 9484/ MK414372 <i>A. mattsosi</i> UFRJ 98013/ MK414371 <i>A. mattsosi</i>

			MK414371.1 / MK414370.1 / MK414369.1	UFRJ 98012/ MK414370 <i>A. mattsosi</i> UFRJ 9801/ K414369 <i>A. sp Ouro Branco</i> UFRJ 9802
40	MK414408.1	<i>A. oblongus</i>	MK414408.1 / MK414407.1 / MK414406.1 / MK414402.1 / MK414401.1 / MK414400.1 / MK414387.1 / MK414385.1 / MK414384.1 / MK414383.1 / MK414382.1 / MK414381.1 / MK414380.1 / MK414368.1	MK414408 <i>A. paraibae</i> UFRJ 78233/ MK414407 <i>A. paraibae</i> UFRJ 78232/ MK414406 <i>A. paraibae</i> UFRJ 7823/ MK414402 <i>A. cf paraibae</i> UFRJ 78872/ MK4144021 <i>A. cf</i> <i>paraibae</i> UFRJ 7887/ MK414400 <i>A. paraibae</i> UFRJ 78234/ MK414387 <i>A. cf barbosae</i> UFRJ 82914/ MK414385 <i>A. cf barbosae</i> UFRJ 82912/ MK414384 <i>A. cf barbosae</i> UFRJ 8291/ MK414383 <i>A. barbosae</i> UFRJ 85594/ MK414382 <i>A. barbosae</i> UFRJ 85593/ MK414381 <i>A. barbosae</i> UFRJ 85592/ MK414380 <i>A. barbosae</i> 8559 UFRJ/ MK414368 <i>A. tavaresi</i> UFRJ 98402
41	MK414367.1	<i>A. oblongus</i>	MK414367.1	MK414367 <i>A. tavaresi</i> UFRJ 9840
42	OK020128.1	<i>A. ribeirae</i>	OK020128.1	<i>A. ribeirae</i> Pedro de Toledo CIC 189
43	MK414425.1	<i>A. ribeirae</i>	MK414425.1 / MK414424.1 / MK414423.1 / MK414422.1	MK414425 <i>A. ribeirae</i> UFRJ 10954 / MK414424 <i>A. ribeirae</i> UFRJ 104953 / MK414423 <i>A. ribeirae</i> UFRJ 104952 / MK414422. <i>A. ribeirae</i> UFRJ 10495
44	MK414405.1	<i>A. ribeirae</i>	MK414405.1	MK414405 <i>A. robustus</i> UFRJ 7825
45	MK414404.1	<i>A. ribeirae</i>	MK414404.1	MK414404 <i>A. robustus</i> UFRJ 78282
46	MK414403.1	<i>A. ribeirae</i>	MK414403.1	MK414403 <i>A. robustus</i> UFRJ 7828
47	OK020130.1	<i>A. ricani</i>	OK020130.1	<i>A. ricani</i> CIC 323 Rio Morcego
48	OK020129.1	<i>A. ricani</i>	OK020129.1	<i>A. ricani</i> Rio Morcego CIC 326
49	OK020109.1	<i>A. sanguineus</i>	OK020109.1 / OK020108.	OK020108 <i>A. sanguineus</i> MCP e6 / OK020109 <i>A. sanguineus</i> Cubatão MCP 40635 e7
50	MK414418.1	<i>A. sanguineus</i>	MK414415.1 / MK414416.1 / MK414417.1 / MK414418.1	MK414415: <i>A. sanguineus</i> UFRJ 10502 / MK414416: <i>A. sanguineus</i> UFRJ 105022 / MK414417: <i>A. sanguineus</i> UFRJ 105023 / MK414418: <i>A. sanguineus</i> UFRJ 105024
51	AY998662.1	<i>A. scitulus</i>	AY998661.1 / AY998662.1	AY998661: <i>A. scitulus</i> 121 / AY998662: <i>A.</i> <i>scitulus</i> 116
52	HQ197705.1	<i>A. scitulus</i>	HQ197705.1	HQ197705 <i>A. scitulus</i> A20
53	HQ197701.1	<i>A. scitulus</i>	HQ197701.1	HQ197701 <i>A. scitulus</i> H16
54	OK020111.1	<i>A. scitulus</i>	OK020110.1 / OK020111.1	OK020110 3321 <i>A. sp</i> / OK020111 4858 <i>A. sp</i>
55	HQ197706.1	<i>A. scitulus</i>	HQ197706.1	HQ197706 <i>A. scitulus</i> A21
56	HQ197702.1	<i>A. scitulus</i>	HQ197702.1	HQ197702 <i>A. scitulus</i> H17
57	AY998663	<i>A. scitulus</i>	AY998663	AY998663 <i>A. scitulus</i> Arg
58	HQ197688.1	<i>Australoheros tembe</i> (Casciotta, Gómez & Toresanni, 1995)	HQ197688.1	HQ197688 <i>A. tembe</i> H3
59	HQ197687.1	<i>A. tembe</i>	HQ197687.1	HQ197687 <i>A. tembe</i> H2

60	AY998660.1	<i>A. tembe</i>	AY998660.1 / AY843373.1	AY843373: <i>A. tembe</i> stri 2519 / AY998660: <i>A. tembe</i>
61	HQ197700.1	<i>Australoheros ykeregua</i> Říčan, Piálek, Almirón & Casciotta, 2011	HQ197700.1	HQ197700 <i>A. ykeregua</i> H15
62	HQ197699.1	<i>A. ykeregua</i>	HQ197699.1	HQ197699 <i>A. ykeregua</i> H14
63	HQ197698.1	<i>A. ykeregua</i>	HQ197698.1	HQ197698 <i>A. ykeregua</i> H13
64	HQ197697.1	<i>A. ykeregua</i>	HQ197697.1	HQ197697 <i>A. ykeregua</i> H12
65	HQ197696.1	<i>A. ykeregua</i>	HQ197696.1	HQ197696 <i>A. ykeregua</i> H11
66	HQ197695.1	<i>A. ykeregua</i>	HQ197695.1	HQ197695 <i>A. ykeregua</i> H10
67	HQ197694.1	<i>A. ykeregua</i>	HQ197691.1 / HQ197692.1 / HQ197693.1 / HQ197694.1	HQ197691: <i>A. ykeregua</i> H6 / HQ197692: <i>A. ykeregua</i> H7 / HQ197693: <i>A. ykeregua</i> H8 / HQ197694: <i>A. ykeregua</i> H9
68	HQ197690.1	<i>A. ykeregua</i>	HQ197690.1	HQ197690 <i>A. ykeregua</i> H5
69	HQ197689.1	<i>A. ykeregua</i>	HQ197689.1	HQ197689 <i>A. ykeregua</i> H4

Tabela 3: Grupos externos utilizados neste trabalho para matrizes dos genes COI e CYTB e com os respectivos números de acessos no GenBank.

Nº	Grupos externos	Nível de classificação	COI	CYTB
1	<i>Australoheros scitulus</i> (COI) e <i>A. kaaygua</i> (CYTB)	Tribo Heroini	MZ969503.1	HQ197686.1
2	<i>Caquetaia spectabilis</i> (Steindachner, 1875)	Tribo Heroini	OR732852.1	AF370671.1
3	<i>Cichlasoma portalegrense</i> (Hensel, 1870)	Tribo Cichlasomatini	MZ969528.1	U88854.1
4	<i>Geophagus diamantinensis</i> Mattos, Costa & Santos, 2015	Tribo Geophagini	MH538087.1	KT373995.1
5	<i>Astronotus crassipinnis</i> (Heckel, 1840)	Tribo Astronotini	GU701862.1	AF370650.1
6	<i>Cichla piquiti</i> Kullander & Ferreira, 2006	Tribo Cichlini	KT382897.1	GU295667.1
7	<i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus, 1758)	Subfamília Pseudocrenilabrinae	KU565863.1	OL989429.1
8	<i>Oreochromis niloticus</i>	Subfamília Pseudocrenilabrinae	KU565863.1	OL989429.1

2.2 Edição de sequências e Construção das matrizes

As sequências foram editadas e as matrizes construídas usando o software MEGA11: Análise Genética Evolutiva Molecular v.11 (Tamura *et al.*, 2021), e o alinhamento de sequências foi feito através do algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). Segundo Lucena *et al.* (2022), as extremidades das sequências foram manualmente

cortadas, gerando alinhamentos finais de 654 pares de bases (*bp*) para as matrizes de COI e de 1099 *bp* para as matrizes de CYTB. Todas as matrizes foram traduzidas, de acordo com a posição do primeiro códon, para verificação da presença de códons de parada. Em seguida, todas as matrizes foram reduzidas a haplótipos únicos, utilizando o DAMBE v. 7.3.32 (Xia, 2018), uma premissa do método de delimitação de espécies aqui utilizado.

A formação das matrizes de dados é feita através dos alinhamentos das sequências de DNA. Segundo Rosenberg (2009), o processo de alinhamento é fundamental em estudos que comparam duas ou mais sequências, pois, é essa etapa que tenta propor quais regiões das sequências são homólogas, ou seja, que compartilham uma história evolutiva em comum. Um total de 8 matrizes foram construídas para cada gene, utilizando grupos externos diferentes. A matriz 1 é formada por 69 táxons para CYTB e 38 táxons para COI, assim para cada nova matriz formada, o grupo-externo anterior é mantido e próximo grupo externo é adicionado; portanto, a partir da matriz 1, o total de táxons de cada matriz será o número de táxons da matriz anterior mais um – *por exemplo*, a matriz 2 terá 70 táxons para CYTB e 39, para COI. Na matriz 8, somente o último grupo-externo adicionado será mantido.

2.3 Reconstrução filogenética

O modelo evolutivo selecionado para a reconstrução das árvores de COI e CYTB foi GTR + I de acordo com Lucena *et al.* (2022). Análises de Inferência Bayesiana (IB) foram realizadas para cada matriz através da interface CIPRES “<https://www.phylo.org/>”, na ferramenta MrBayes v3.2.7 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Cada árvore foi enraizada em um grupo externo distinto de acordo com as oito matrizes construídas para cada gene (Tabela 2, ver acima)

A análise se baseou em 10 milhões de gerações com amostragem a cada 1.000 gerações. É importante considerar que os primeiros 25% de amostras foram descartadas como “burn-in”. Os parâmetros destas análises filogenéticas foram verificados no software Tracer v1.7.2 (Rambaut, 2021). As topologias foram visualizadas e avaliadas no programa FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2018).

2.4 Método de delimitação de espécies

As filogenias obtidas na etapa anterior foram utilizadas como base para as análises de delimitação de espécies aqui realizadas. O método de delimitação de espécies utilizado foi a Análise Bayesiana para a Superposição de Processos de Poisson (Bayesian Poisson Tree Processes, bPTP), executada através da interface bPTP web server "<https://species.h-its.org/>". Esse método unilocus utiliza filogenias para avaliar o número de substituições de pares de bases entre os haplótipos, considerando que a variabilidade interespecífica é maior do que a variabilidade intraespecífica, estabelecendo, portanto, uma linha de corte.

3 RESULTADOS

Os resultados obtidos na análise de delimitação de espécie estão representados nas Figuras 1-15, onde são apresentados como árvores geradas pela interface bPTP web server "<https://species.h-its.org/>".

As Tabelas 4 e 5 resumem as espécies delimitadas para o gene COI e CYTB em todas as análises realizadas por esse trabalho.

Tabela 4: Linhagens delimitadas de *Australoheros* com base nas matrizes do gene COI.

Análises	Nº de linhagens delimitadas (com grupo externo)	Nº de linhagens delimitadas de <i>Australoheros</i>	Linhagens delimitadas
1	14	14	<i>A. acaroides</i> , <i>A. angiru</i> , <i>A. facetus</i> , <i>A. ipatinguensis</i> (4), <i>A. minuano</i> , <i>A. oblongus</i> , <i>A. ricani</i> , <i>A. ribeirae</i> , <i>A. sanguineus</i> , <i>A. scitulus</i> (g.e.), <i>A. sp</i> "Arapey".
2	10	9	<i>A. acaroides</i> , <i>A. facetus</i> , <i>A. ipatinguensis</i> , <i>A. minuano</i> , <i>A. oblongus</i> , <i>A. ricani</i> , <i>A. ribeirae</i> , <i>A. sanguineus</i> , <i>A. scitulus</i> + <i>A. angiru</i> ; <i>Caquetaia spectabilis</i> (g.e.)
3	10	8	<i>A. acaroides</i> , <i>A. facetus</i> , <i>A. ipatinguensis</i> + <i>A. oblongus</i> , <i>A. minuano</i> + <i>A. sp</i> "Arapey"., <i>A. ricani</i> , <i>A. ribeirae</i> , <i>A. sanguineus</i> , <i>A. scitulus</i> ; <i>Caquetaia spectabilis</i> e <i>Cichlasoma portalegrense</i> (g.e.)
4	11	8	<i>A. acaroides</i> , <i>A. facetus</i> , <i>A. ipatinguensis</i> + <i>A. oblongus</i> , <i>A. minuano</i> + <i>A. sp</i> "Arapey"., <i>A. ricani</i> , <i>A. ribeirae</i> , <i>A. sanguineus</i> , <i>A. scitulus</i> ; <i>Caquetaia spectabilis</i> , <i>Cichlasoma portalegrense</i> e <i>Geophagus diamantinensis</i> (g.e.)
5	12	8	<i>A. acaroides</i> , <i>A. facetus</i> , <i>A. ipatinguensis</i> + <i>A. oblongus</i> , <i>A. minuano</i> + <i>A. sp</i> "Arapey"., <i>A. ricani</i> , <i>A. ribeirae</i> , <i>A. sanguineus</i> , <i>A. scitulus</i> ; <i>Caquetaia spectabilis</i> , <i>Cichlasoma portalegrense</i> , <i>Geophagus diamantinensis</i> e <i>Astronotus crassipinnis</i> (g.e.)

6	11	6	<i>A. acaroides</i> , <i>A. facetus</i> , <i>A. ipatinguensis</i> + <i>A. oblongus</i> + <i>A. ribeirae</i> + <i>A. sanguineus</i> , <i>A. minuano</i> , <i>A. ricani</i> , <i>A. scitulus</i> ; <i>Caquetaia spectabilis</i> , <i>Cichlasoma portalegrense</i> , <i>Geophagus diamantiniensis</i> , <i>Astronotus crassipinnis</i> e <i>Cichla piquiti</i> (g.e)
7	12	6	<i>A. acaroides</i> , <i>A. facetus</i> , <i>A. ipatinguensis</i> + <i>A. oblongus</i> + <i>A. ribeirae</i> + <i>A. sanguineus</i> , <i>A. minuano</i> , <i>A. ricani</i> , <i>A. scitulus</i> ; <i>Caquetaia spectabilis</i> , <i>Cichlasoma portalegrense</i> , <i>Geophagus diamantiniensis</i> , <i>Astronotus crassipinnis</i> , <i>Cichla piquiti</i> e <i>Oreochromis niloticus</i> (g.e)
8	9	8	<i>A. acaroides</i> , <i>A. facetus</i> , <i>A. ipatinguensis</i> + <i>A. oblongus</i> , <i>A. minuano</i> + <i>A. sp "Arapey"</i> ., <i>A. ricani</i> , <i>A. ribeirae</i> , <i>A. sanguineus</i> , <i>A. scitulus</i> ; <i>Oreochromis niloticus</i> (g.e)

*O número entre parênteses indica a quantidade de linhagens daquela espécie que a análise delimitou – por exemplo, a análise feita com base na primeira matriz delimitou quatro espécies de *A. ipatinguensis*. O símbolo de “+” utilizado se refere a haplótipos de espécies distintas que foram considerados como linhagens únicas pela análise de delimitação de espécies. A conotação “(g.e.)” após o nome de algumas espécies indica que aquele é o grupo externo onde a análise de Inferência Bayesiana foi enraizada.

Tabela 5: Linhagens delimitadas de *Australoheros* com base nas matrizes do gene CYTB.

Análises	Nº de linhagens delimitadas (com grupo externo)	Nº de linhagens delimitadas de <i>Australoheros</i>	Linhagens delimitadas
1	24	24	<i>A. acaroides</i> (5), <i>A. facetus</i> , <i>A. forquilha</i> , <i>A. ipatinguensis</i> (2), <i>A. kaaygua</i> (g.e.), <i>A. minuano</i> , <i>A. oblongus</i> (3), <i>A. oblongus</i> + <i>A. ribeirae</i> , <i>A. ricani</i> , <i>A. ribeirae</i> , <i>A. sanguineus</i> , <i>A. scitulus</i> , <i>A. tembe</i> (2), <i>A. ykeregua</i> (3)
2	21	20	<i>A. acaroides</i> (5), <i>A. facetus</i> , <i>A. forquilha</i> , <i>A. ipatinguensis</i> , <i>A. kaaygua</i> , <i>A. oblongus</i> + <i>A. ribeirae</i> , <i>A. minuano</i> , <i>A. ricani</i> , <i>A. ribeirae</i> , <i>A. sanguineus</i> , <i>A. scitulus</i> , <i>A. tembe</i> (2), <i>A. ykeregua</i> (3); <i>Caquetaia spectabilis</i> (g.e.)
3	17	16	<i>A. acaroides</i> , <i>A. facetus</i> , <i>A. forquilha</i> , <i>A. ipatinguensis</i> , <i>A. kaaygua</i> , <i>A. oblongus</i> + <i>A. ribeirae</i> , <i>A. minuano</i> , <i>A. ricani</i> , <i>A. ribeirae</i> , <i>A. sanguineus</i> , <i>A. scitulus</i> , <i>A. tembe</i> (2), <i>A.</i>

			<i>ykeregua</i> (3); <i>Caquetaia spectabilis</i> , <i>Cichlasoma portalegrense</i> (g.e.)
4	16	14	<i>A. acaroides</i> , <i>A. facetus</i> , <i>A. forquilha</i> , <i>A. ipatinguensis</i> , <i>A. kaaygua</i> , <i>A. oblongus</i> + <i>A. ribeirae</i> , <i>A. minuano</i> , <i>A. ricani</i> , <i>A. ribeirae</i> , <i>A. sanguineus</i> , <i>A. scitulus</i> , <i>A. tembe</i> (2), <i>A. ykeregua</i> ; <i>Caquetaia spectabilis</i> , <i>Cichlasoma portalegrense</i> e <i>Geophagus diamantinensis</i> (g.e.)
5	17	14	<i>A. acaroides</i> , <i>A. facetus</i> , <i>A. forquilha</i> , <i>A. ipatinguensis</i> , <i>A. kaaygua</i> , <i>A. oblongus</i> + <i>A. ribeirae</i> , <i>A. minuano</i> , <i>A. ricani</i> , <i>A. ribeirae</i> , <i>A. sanguineus</i> , <i>A. scitulus</i> , <i>A. tembe</i> (2), <i>A. ykeregua</i> ; <i>Caquetaia spectabilis</i> , <i>Cichlasoma portalegrense</i> , <i>Geophagus diamantinensis</i> e <i>Astronotus crassipinnis</i> (g.e.)
6	18	14	<i>A. acaroides</i> , <i>A. facetus</i> , <i>A. forquilha</i> , <i>A. ipatinguensis</i> , <i>A. kaaygua</i> , <i>A. oblongus</i> + <i>A. ribeirae</i> , <i>A. minuano</i> , <i>A. ricani</i> , <i>A. ribeirae</i> , <i>A. sanguineus</i> , <i>A. scitulus</i> , <i>A. tembe</i> (2), <i>A. ykeregua</i> ; <i>Caquetaia spectabilis</i> , <i>Cichlasoma portalegrense</i> , <i>Geophagus diamantinensis</i> , <i>Astronotus crassipinnis</i> e <i>Cichla piquiti</i> (g.e)
7	19	14	<i>A. acaroides</i> , <i>A. facetus</i> , <i>A. forquilha</i> , <i>A. ipatinguensis</i> , <i>A. kaaygua</i> , <i>A. oblongus</i> + <i>A. ribeirae</i> , <i>A. minuano</i> , <i>A. ricani</i> , <i>A. ribeirae</i> , <i>A. sanguineus</i> , <i>A. scitulus</i> , <i>A. tembe</i> (2), <i>A. ykeregua</i> ; <i>Caquetaia spectabilis</i> , <i>Cichlasoma portalegrense</i> , <i>Geophagus diamantinensis</i> , <i>Astronotus crassipinnis</i> , <i>Cichla piquiti</i> e <i>Oreochromis niloticus</i> (g.e)
8	14	14	<i>A. acaroides</i> , <i>A. facetus</i> , <i>A. forquilha</i> , <i>A. ipatinguensis</i> , <i>A. kaaygua</i> , <i>A. oblongus</i> + <i>A. ribeirae</i> , <i>A. minuano</i> , <i>A. ricani</i> , <i>A. ribeirae</i> , <i>A. sanguineus</i> , <i>A. scitulus</i> , <i>A. tembe</i> (2), <i>A. ykeregua</i> ; <i>Oreochromis niloticus</i> (g.e)

* O número entre parênteses indica a quantidade de linhagens daquela espécie que a análise delimitou – por exemplo, a análise feita com base na primeira matriz delimitou cinco linhagens de *A. acaroides*. O símbolo de “+” utilizado se refere a haplótipos de espécies distintas que foram considerados como linhagens únicas pela análise de delimitação de espécies. A conotação “(g.e.)” após o nome de algumas espécies indica que aquele é o grupo externo onde a análise de Inferência Bayesiana foi enraizada.

3.1 Análises de delimitação de espécies baseadas no gene COI

3.1.1 Análise 1

A primeira análise, considerando *A. scitulus* como grupo externo, delimitou 14 linhagens de *Australoheros*. Dentre elas, quatro linhagens distintas de *A. ipatinguensis* e outras nove linhagens representadas por haplótipos únicos (ver tabela 4).

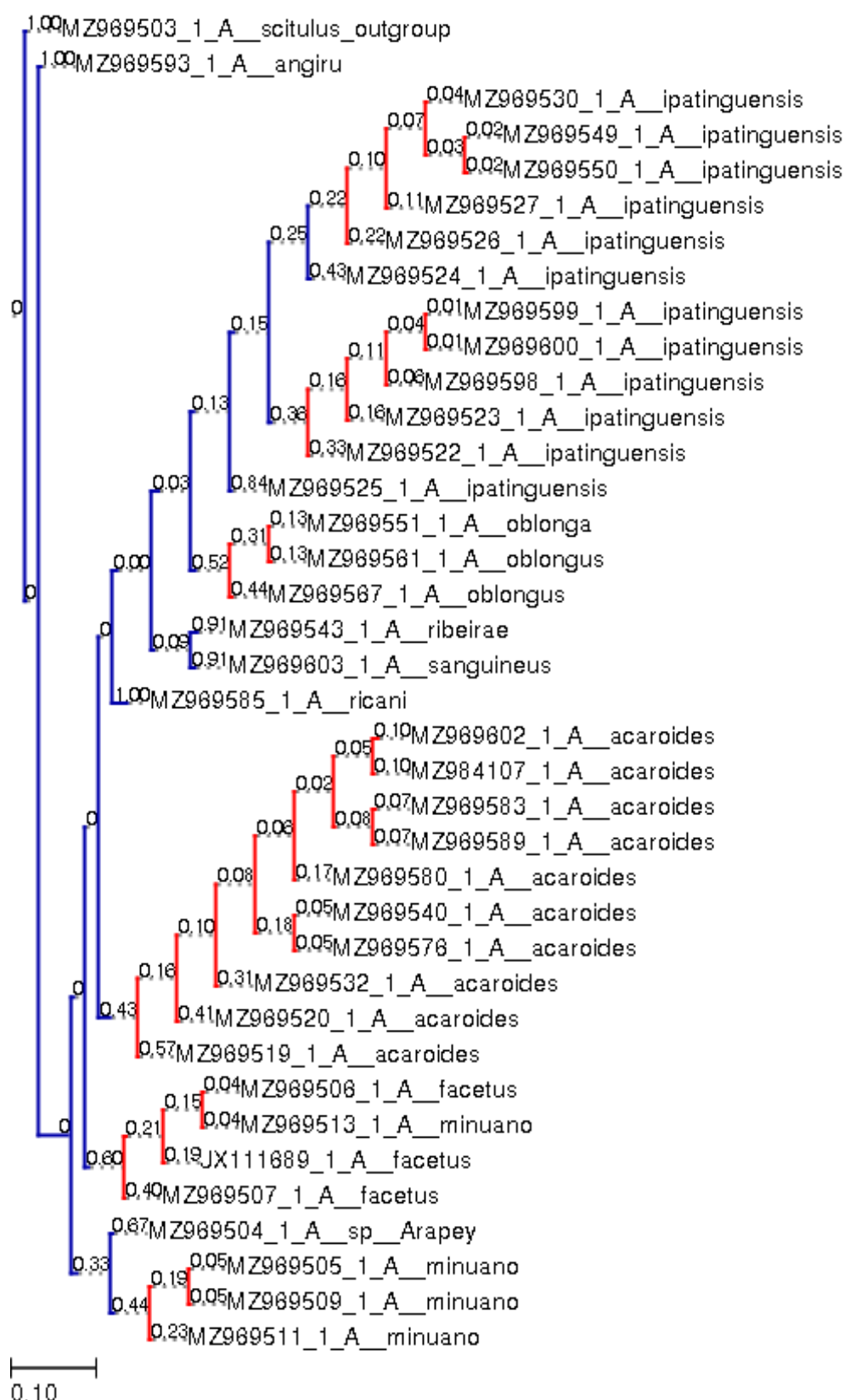


Figura 2: Resultado de delimitação de espécies da análise 1 para o gene COI, utilizando como grupo externo *Australoheros scitulus*, de acordo com o método bPTP.

*As linhas azuis representam as espécies delimitadas e as linhas vermelhas representam eventos de coalescência intraespecíficos.

3.1.2 Análise 2

A partir da segunda análise, os grupos externos anteriores foram mantidos e novos grupos externos foram adicionados. Assim, para essa análise, *Caquetaia spectabilis* foi adicionada como o grupo externo onde a árvore foi enraizada. Esse resultado indicou nove linhagens para o gênero *Australoheros* (ver tabela 4).

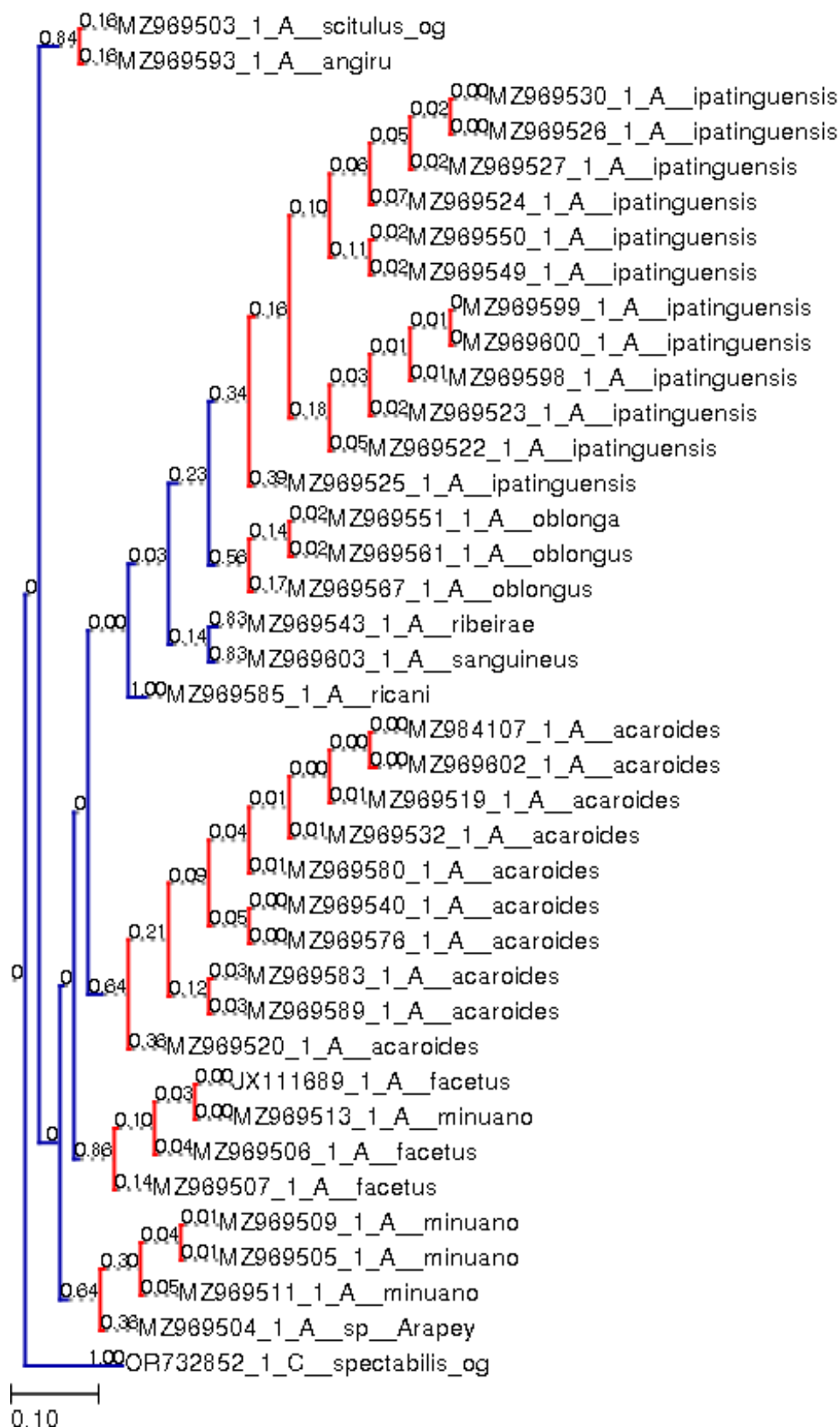


Figura 3: Resultado de delimitação de espécies da análise 2 para o gene COI, utilizando os grupos externos *Australoheros scitulus* e *Caquetaia spectabilis*, de acordo com o método bPTP.

*As linhas azuis representam as espécies delimitadas e as linhas vermelhas representam eventos de coalescência intraespecíficos.

3.1.3 Análise 3

Para a terceira análise, *Cichlasoma portalegrense* foi adicionada como grupo externo e raiz, resultando na delimitação de dez linhagens (ver tabela 4), das quais três correspondem aos grupos externos utilizados nesta matriz e oito são de *Australoheros*.

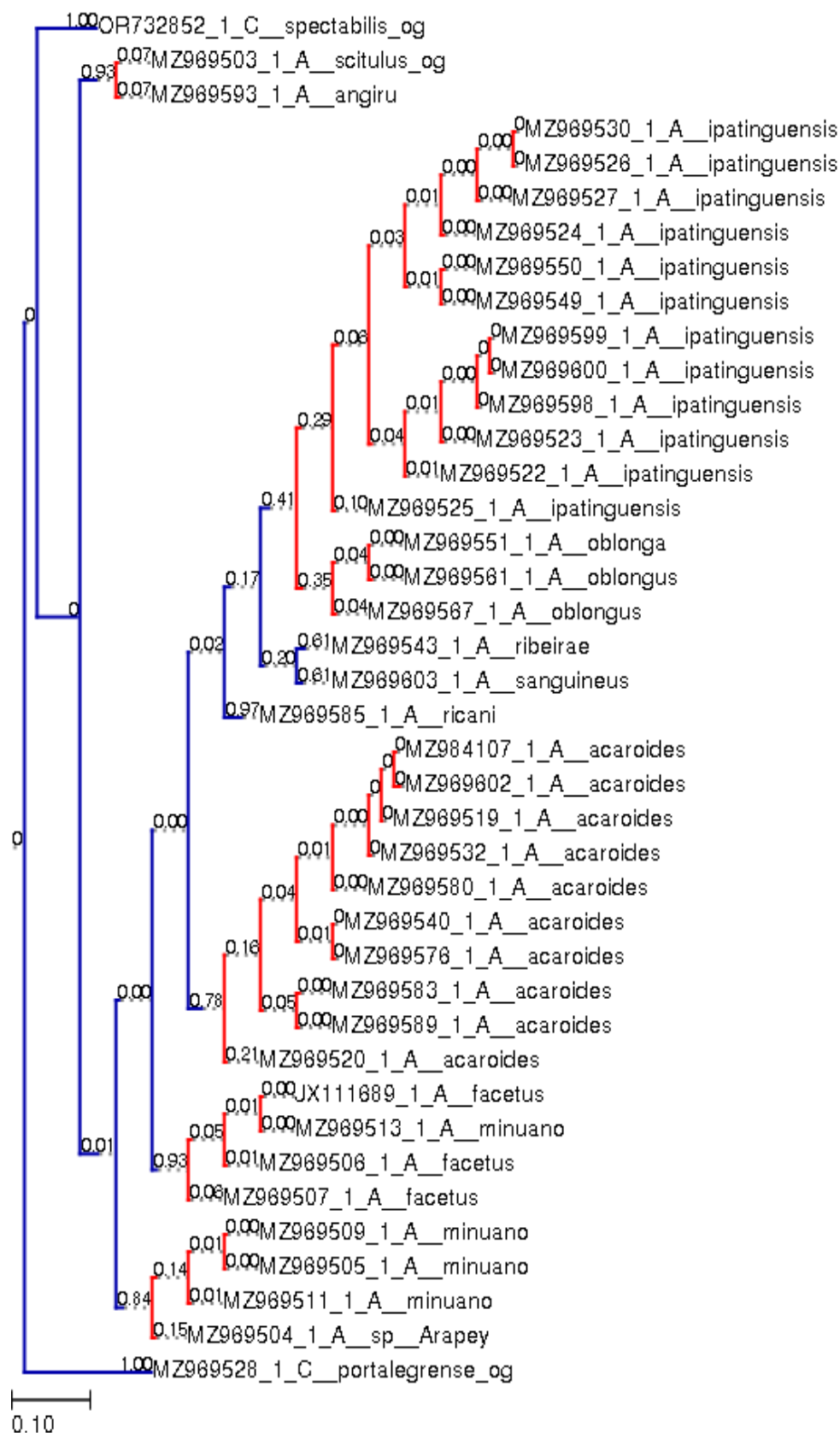


Figura 4: Resultado de delimitação de espécies da análise 3 para o gene COI, utilizando os grupos externos *Australoheros scitulus*, *Caquetaia spectabilis* e *Cichlasoma portalegrense*, de acordo com o método bPTP. *As linhas azuis representam as espécies delimitadas e as linhas vermelhas representam eventos de coalescência intraespecíficos.

3.1.4 Análise 4

A análise quatro obteve os mesmos resultados da análise anterior, resultando no total de onze linhagens delimitadas, devido a adição de *Geophagus diamantinensis* como grupo mais externo e raiz da análise, além de oito linhagens no total para *Australoheros* (ver tabela 4).

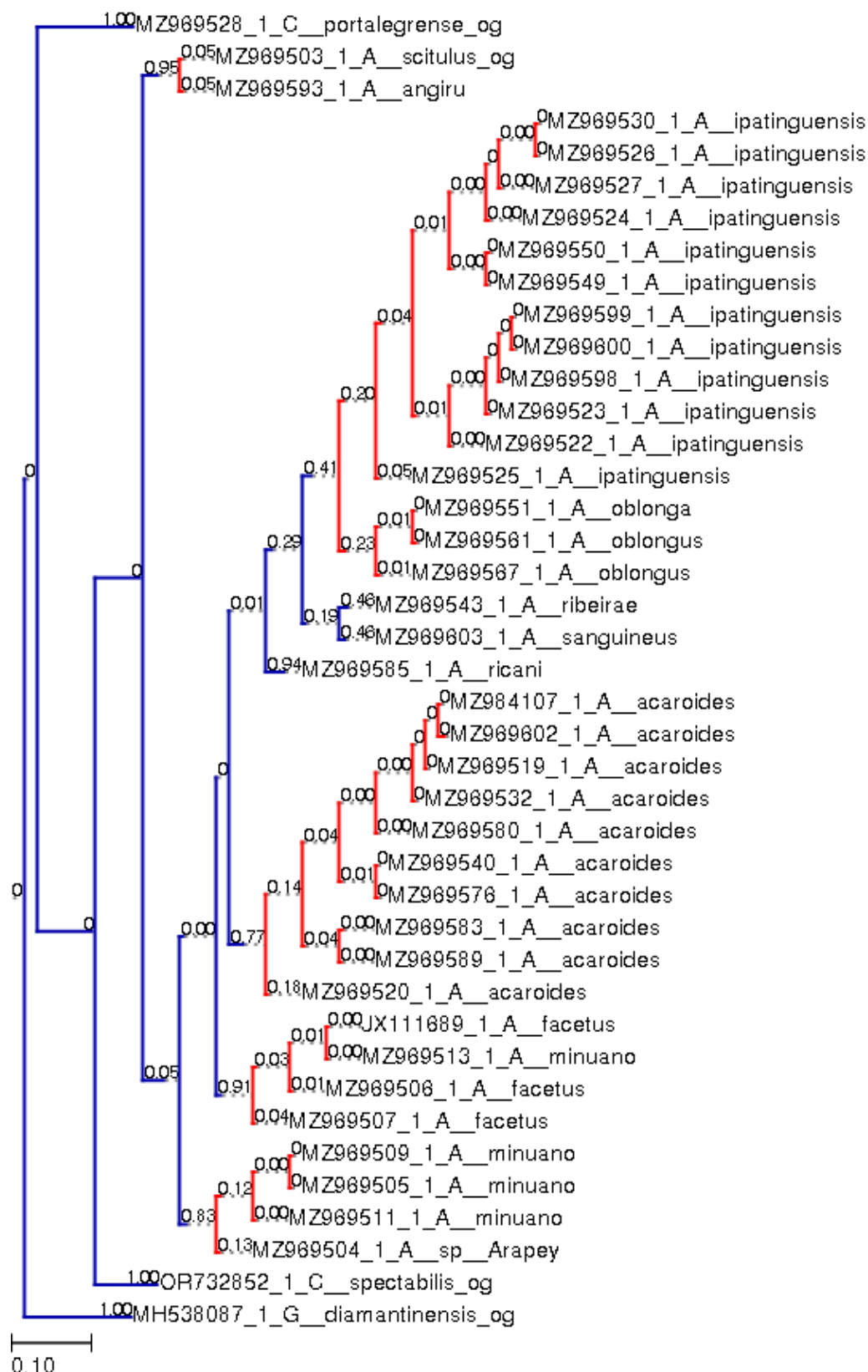


Figura 5: Resultado de delimitação de espécies da análise 4 para o gene COI, utilizando os grupos externos *Australoheros scitulus*, *Caquetaia spectabilis*, *Cichlasoma portalegrense* e *Geophagus diamantiniensis*, de acordo com o método bPTP.

*As linhas azuis representam as espécies delimitadas e as linhas vermelhas representam eventos de coalescência intraespecíficos.

3.1.5 Análise 5

A análise cinco indicou 12 espécies no total (oito de *Australoheros*), por conta da adição do grupo externo *Astronotus crassipinnis* (ver tabela 4).

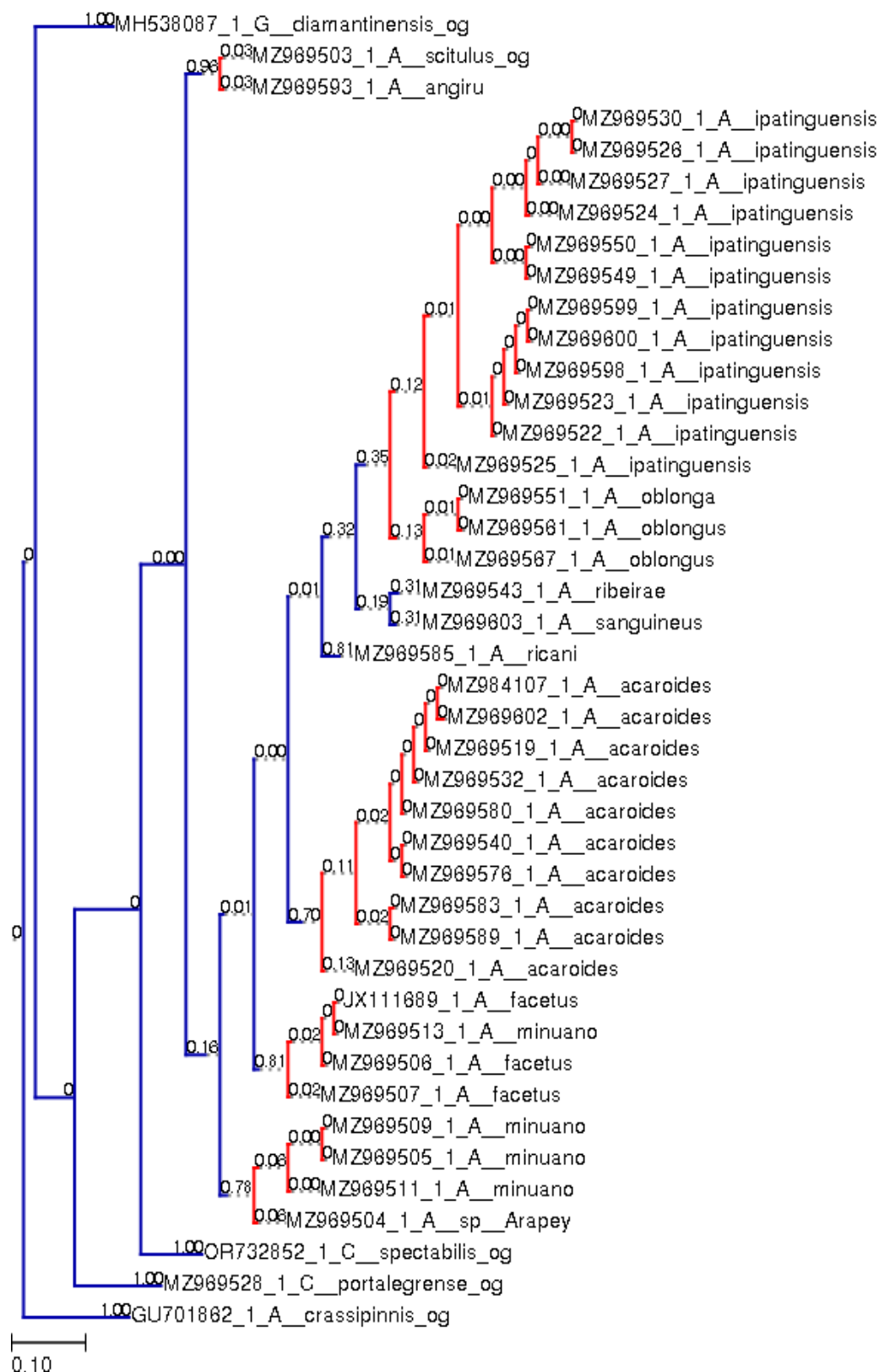


Figura 6: Resultado de delimitação de espécies da análise 5 para o gene COI, utilizando os grupos externos *Australoheros scitulus*, *Caquetaia spectabilis*, *Cichlasoma portalegrense*, *Geophagus diamantiniensis* e *Astronotus crassipinnis*, de acordo com o método bPTP.

*As linhas azuis representam as espécies delimitadas e as linhas vermelhas representam eventos de coalescência intraespecíficos.

3.1.6 Análise 6

O resultado obtido com a adição de *Cichla piquiti* como grupo externo foi a delimitação de seis linhagens de *Australoheros* (ver tabela 4).

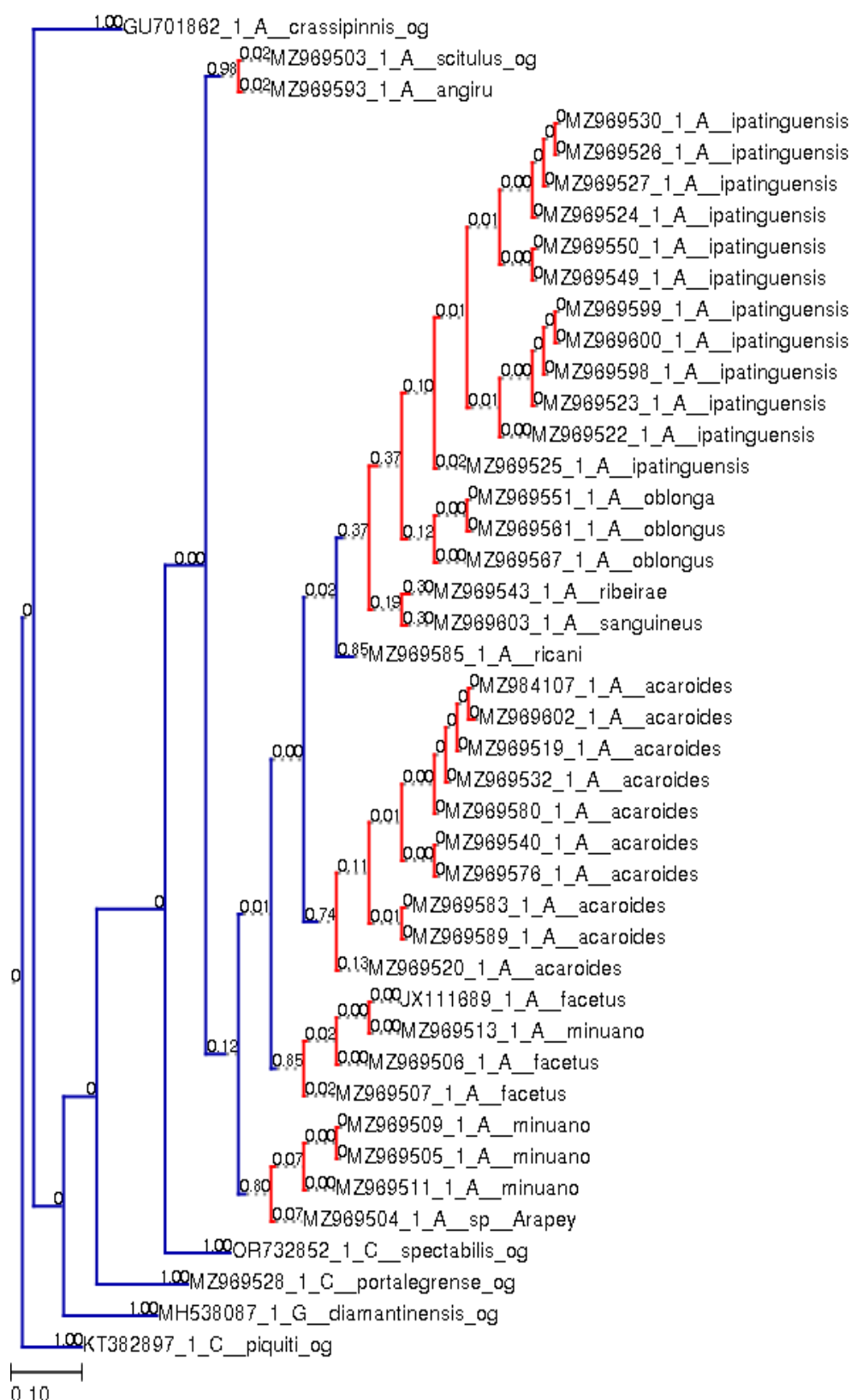


Figura 7: Resultado de delimitação de espécies da análise 6 para o gene COI, utilizando os grupos externos, *Australoheros scitulus*, *Caquetaia spectabilis*, *Cichlasoma portalegrense*, *Geophagus diamantiniensis*, *Astronotus crassipinnis* e *Cichla piquiti*, de acordo com o método bPTP.

*As linhas azuis representam as espécies delimitadas e as linhas vermelhas representam eventos de coalescência intraespecíficos.

3.1.7 Análise 7

A sétima análise delimitou seis linhagens de *Australoheros*, totalizando 12 espécies com a adição de *Oreochromis niloticus* como grupo externo e raiz da análise. (ver tabela 4).

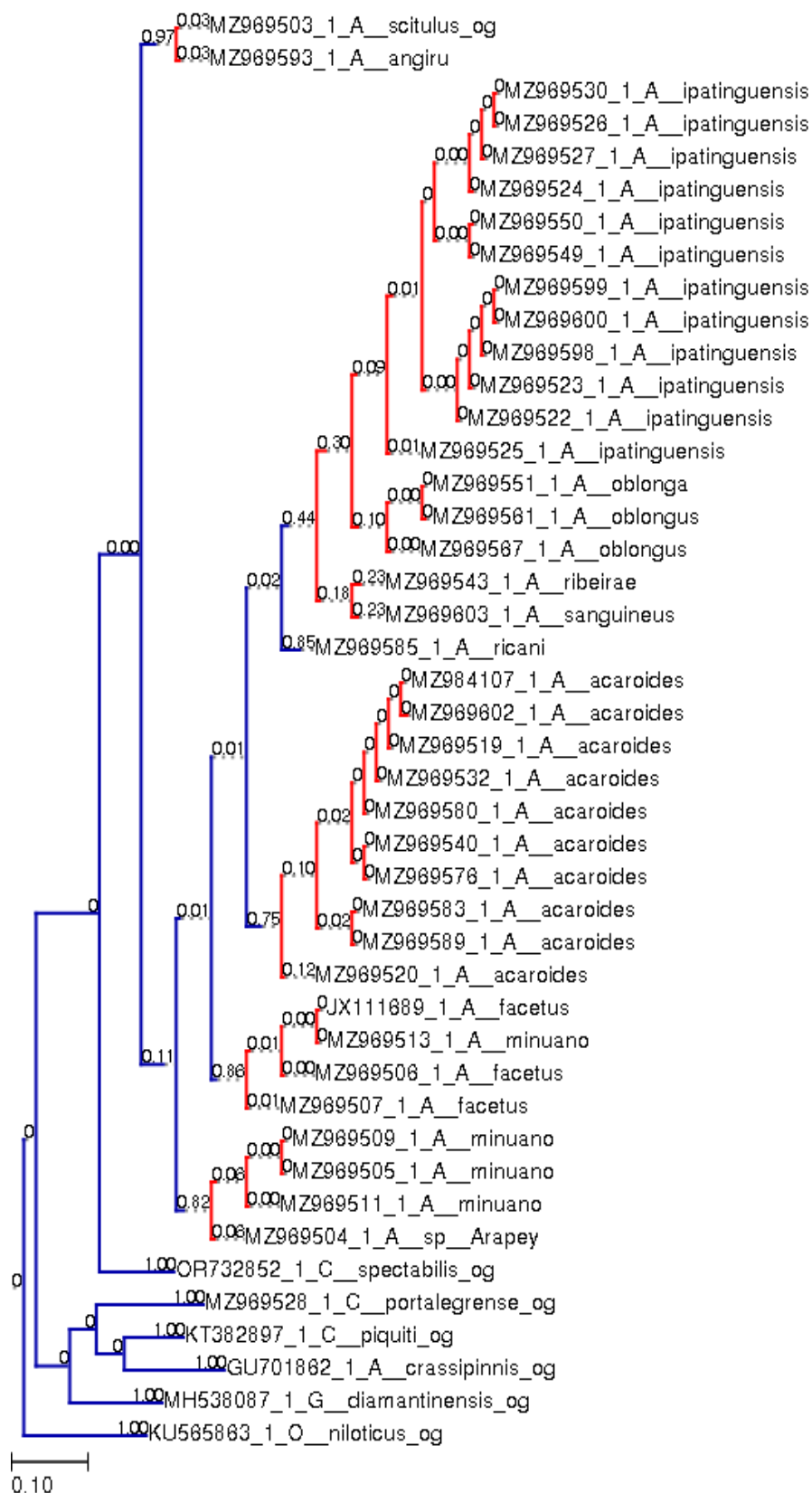


Figura 8: Resultado de delimitação de espécies da análise 7 para o gene COI, utilizando os grupos externos *Australoheros scitulus*, *Caquetaia spectabilis*, *Cichlasoma portalegrense*, *Geophagus diamantiniensis*, *Astronotus crassipinnis*, *Cichla piquiti* e *Oreochromis niloticus*, de acordo com o método bPTP.

*As linhas azuis representam as espécies delimitadas e as linhas vermelhas representam eventos de coalescência intraespecíficos.

3.1.8 Análise 8

Para a última análise de delimitação de espécies, os grupos externos adicionados fora da matriz de dados foram excluídos, com exceção de *Oreochromis niloticus*. O resultado indicou oito linhagens de *Australoheros* (ver tabela 4).

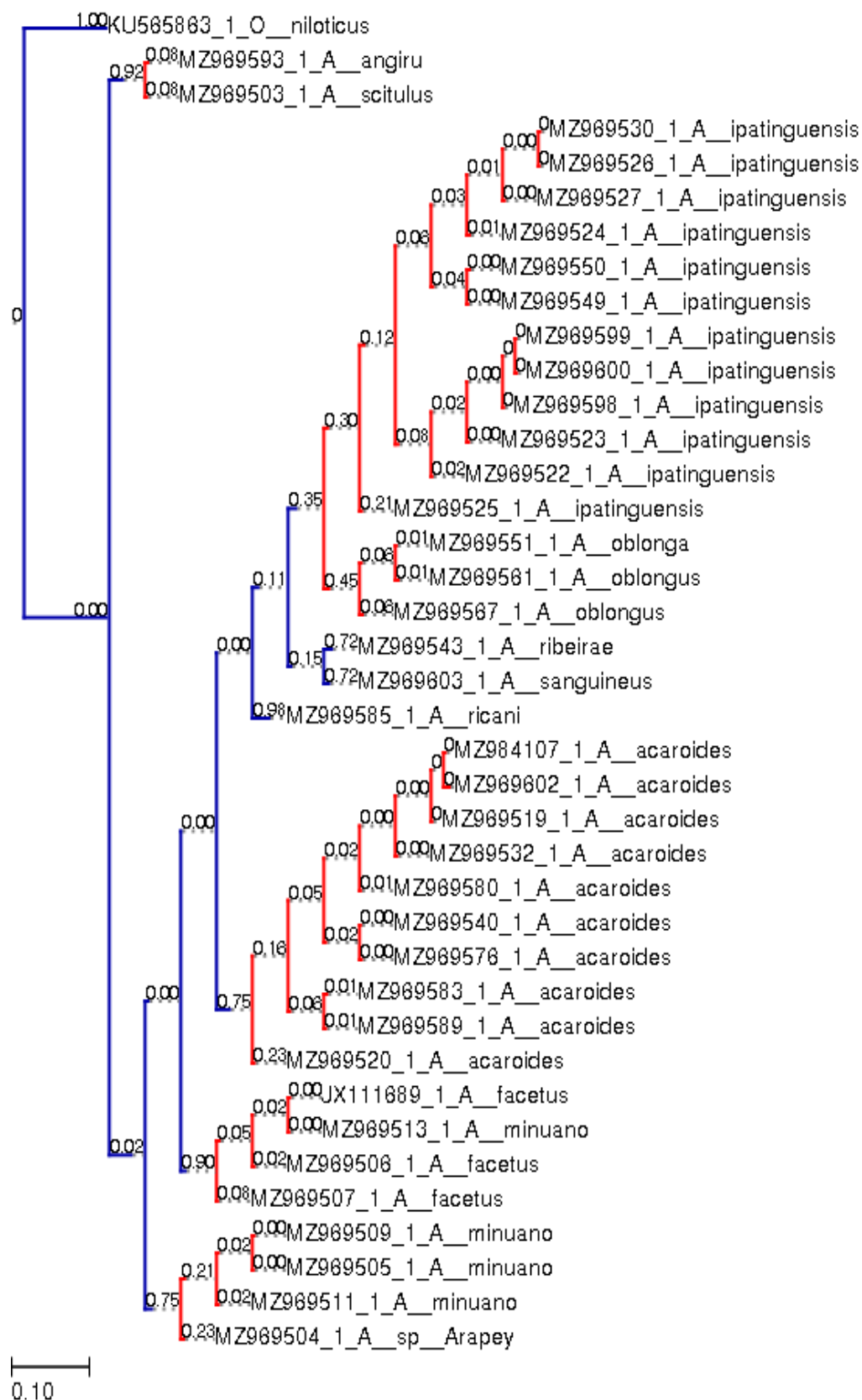


Figura 9: Resultado de delimitação de espécies da análise 8 para o gene COI, utilizando os grupos externos *Australoheros scitulus* e *Oreochromis niloticus*, de acordo com o método bPTP.

*As linhas azuis representam as espécies delimitadas e as linhas vermelhas representam eventos de coalescência intraespecíficos.

3.2 Análises de delimitação de espécies baseadas no gene CYTB.

3.2.1 Análise 1

A primeira análise de delimitação para CYTB considerou *A. kaaygua* como grupo externo, pois a edição dos haplótipos idênticos revelou a existência de sete haplótipos distintos de *A. scitulus* (vs. um haplótipo único de *A. scitulus* para o gene COI). O resultado indicou 24 linhagens de *Australoheros* (ver tabela 5).

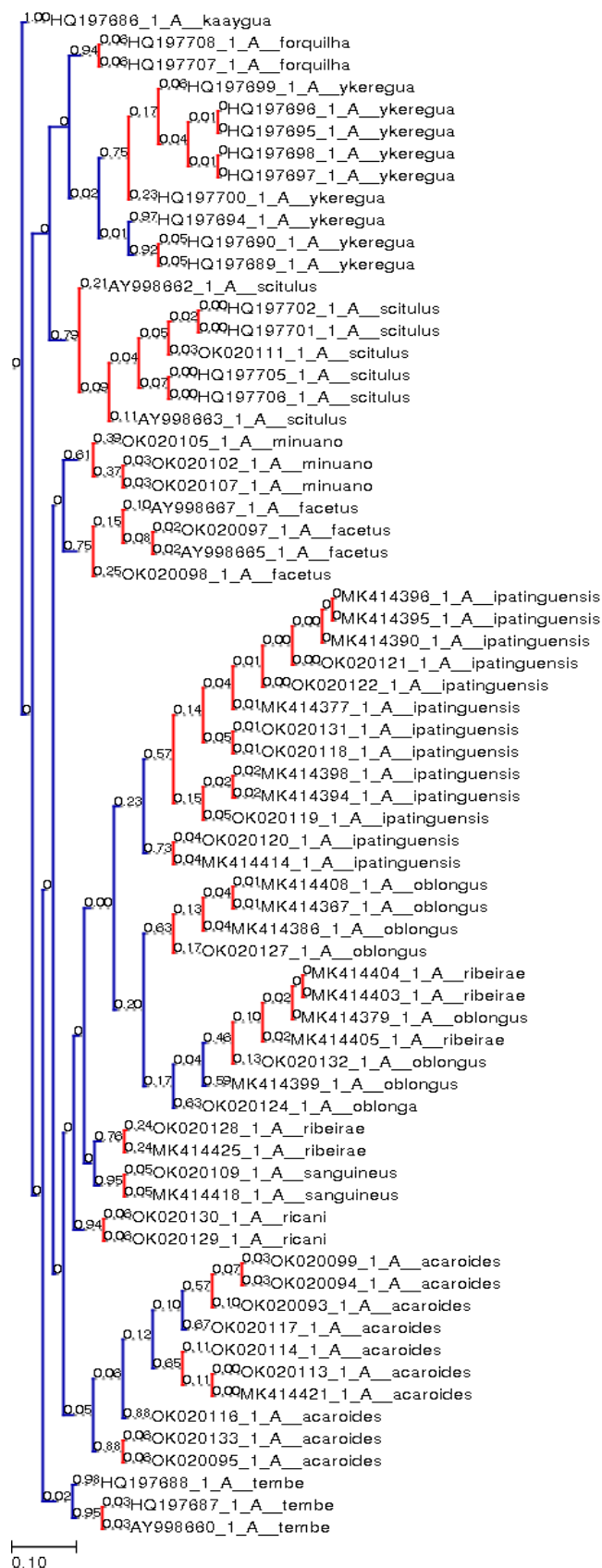


Figura 10: Resultado de delimitação de espécies da análise 1 para o gene CYTB, utilizando *Australoheros kaaygua* como grupo externo, de acordo com o método bPTP.

*As linhas azuis representam as espécies delimitadas e as linhas vermelhas representam eventos de coalescência intraespecíficos.

3.2.2 Análise 2

A análise dois contou com *Caquetaia spectabilis* como grupo mais externo. O resultado delimitou 20 linhagens de *Australoheros* (ver tabela 5).

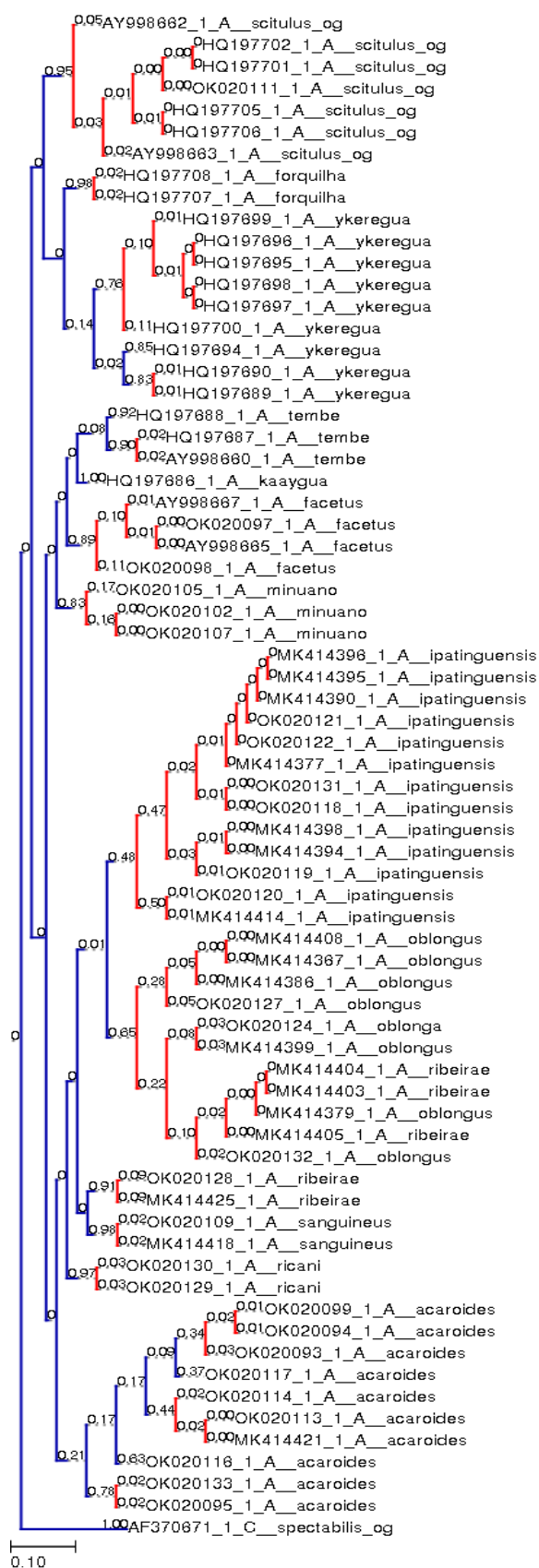


Figura 11: Resultado de delimitação de espécies da análise 2 para o gene CYTB, utilizando os grupos externos *Australoheros kaaygua* e *Caquetaia spectabilis*, de acordo com o método bPTP.

*As linhas azuis representam as espécies delimitadas e as linhas vermelhas representam eventos de coalescência intraespecíficos.

3.2.3 Análise 3

O resultado da inserção do terceiro grupo externo *Cichlasoma portalegrense* foi a delimitação de 15 linhagens de *Australoheros* (ver tabela 5).

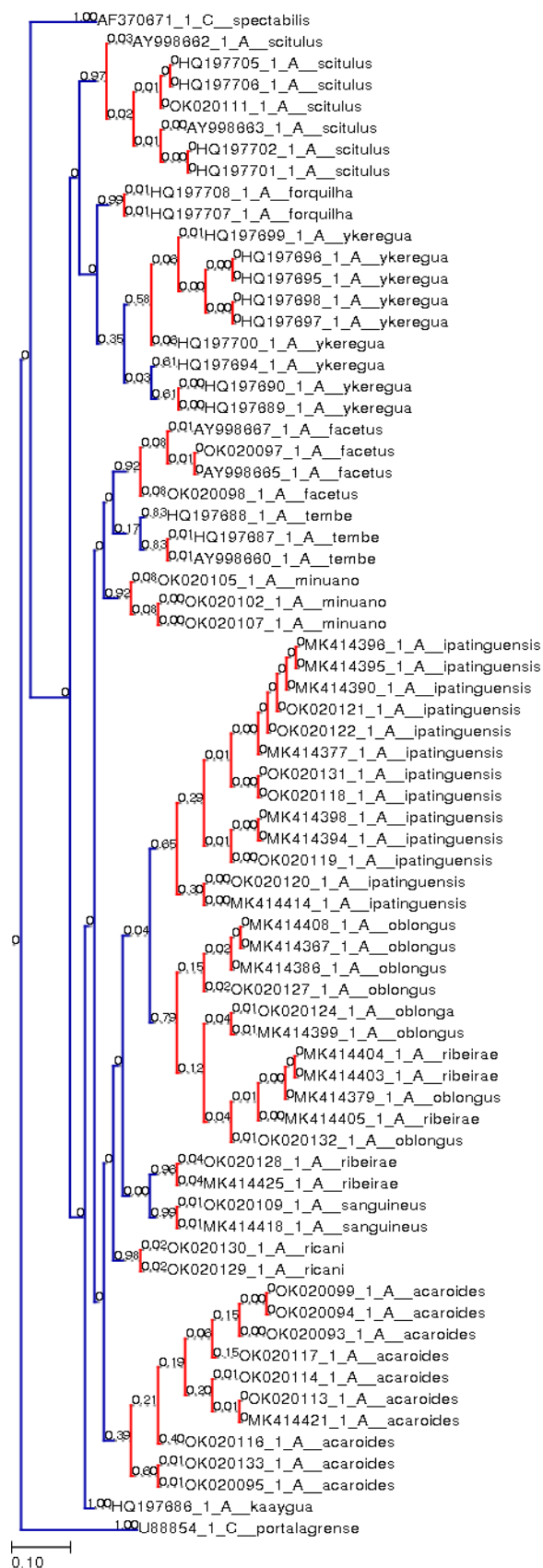


Figura 12: Resultado de delimitação de espécies da análise 3 para o gene CYTB, utilizando os grupos externos *Australoheros kaaygua*, *Caquetaia spectabilis* e *Cichlasoma portalegreense*, de acordo com o método bPTP.

*As linhas azuis representam as espécies delimitadas e as linhas vermelhas representam eventos de coalescência intraespecíficos.

3.2.4 Análise 4

O resultado para a quarta análise de delimitação de espécies baseado na adição de *Geophagus diamantinensis* como outro grupo externo indicou 16 linhagens, das quais 13 são de *Australoheros* e as outras três correspondem aos grupos externos utilizados nessa análise (ver tabela 5).

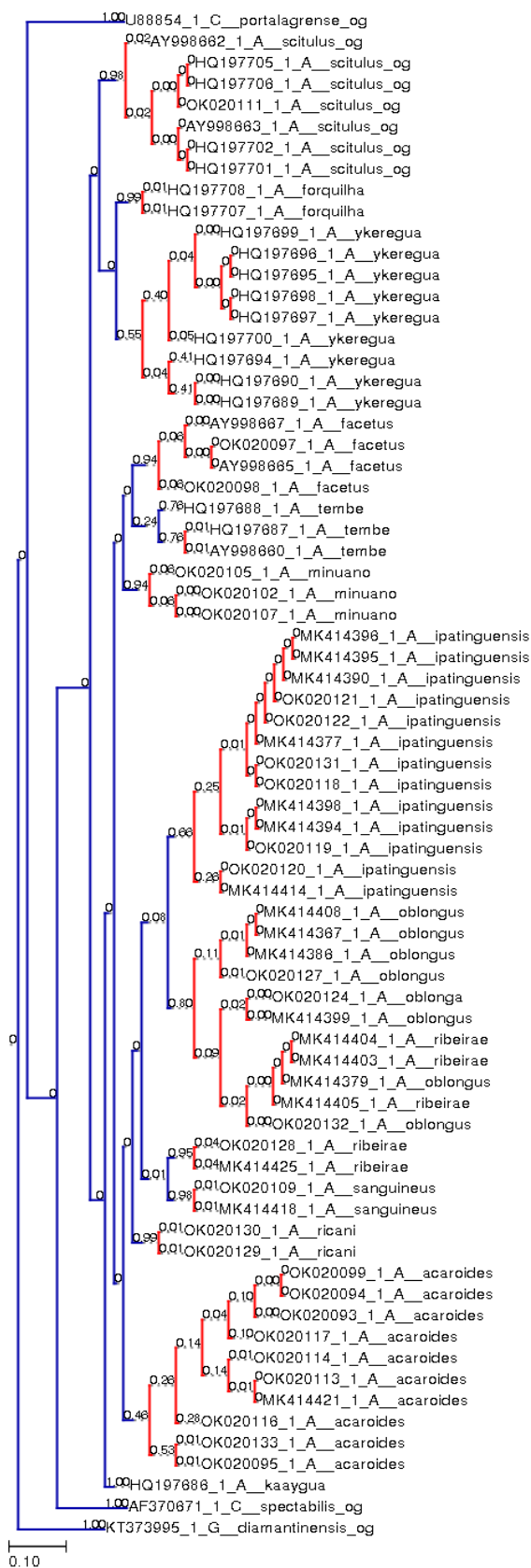


Figura 13: Resultado de delimitação de espécies da análise 4 para o gene CYTB, utilizando os grupos externos *Australoheros kaaygua*, *Caquetaia spectabilis*, *Cichlasoma portalegreense* e *Geophagus diamantiniensis*, de acordo com o método bPTP.

As linhas azuis representam as espécies delimitadas e as linhas vermelhas representam eventos de coalescência intraespecíficos.

3.2.5 Análise 5

A análise cinco adicionou *Astronotus crassipinnis* como grupo mais externo e delimitou 14 linhagens de *Australoheros* (ver tabela 5).

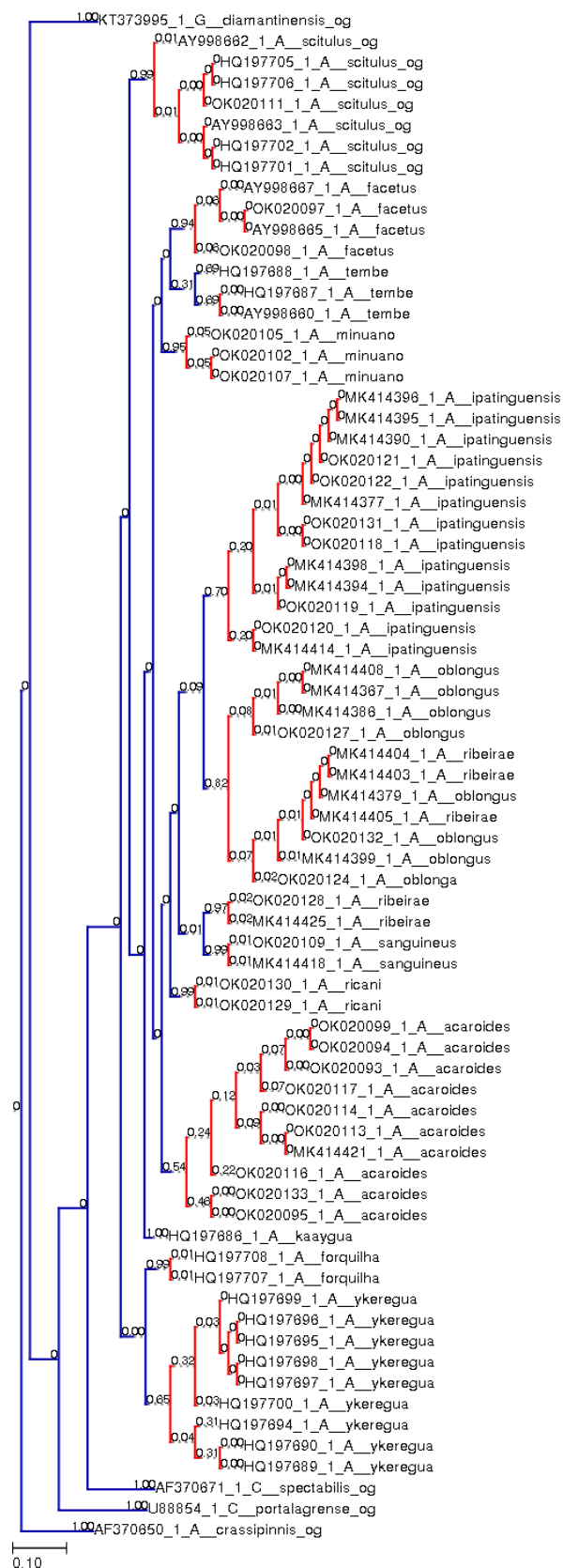


Figura 14: Resultado de delimitação de espécies da análise 5 para o gene CYTB, utilizando os grupos externos *Australoheros kaaygua*, *Caquetaia spectabilis*, *Cichlasoma portalegreense*, *Geophagus diamantiniensis* e *Astronotus crassipinnis*, de acordo com o método bPTP.

*As linhas azuis representam as espécies delimitadas e as linhas vermelhas representam eventos de coalescência intraespecíficos.

3.2.6 Análise 6

A adição de *Cichla piquiti* como grupo externo não alterou a delimitação de espécies na análise seis, ou seja, 14 linhagens de *Australoheros* foram recuperadas (ver tabela 5).

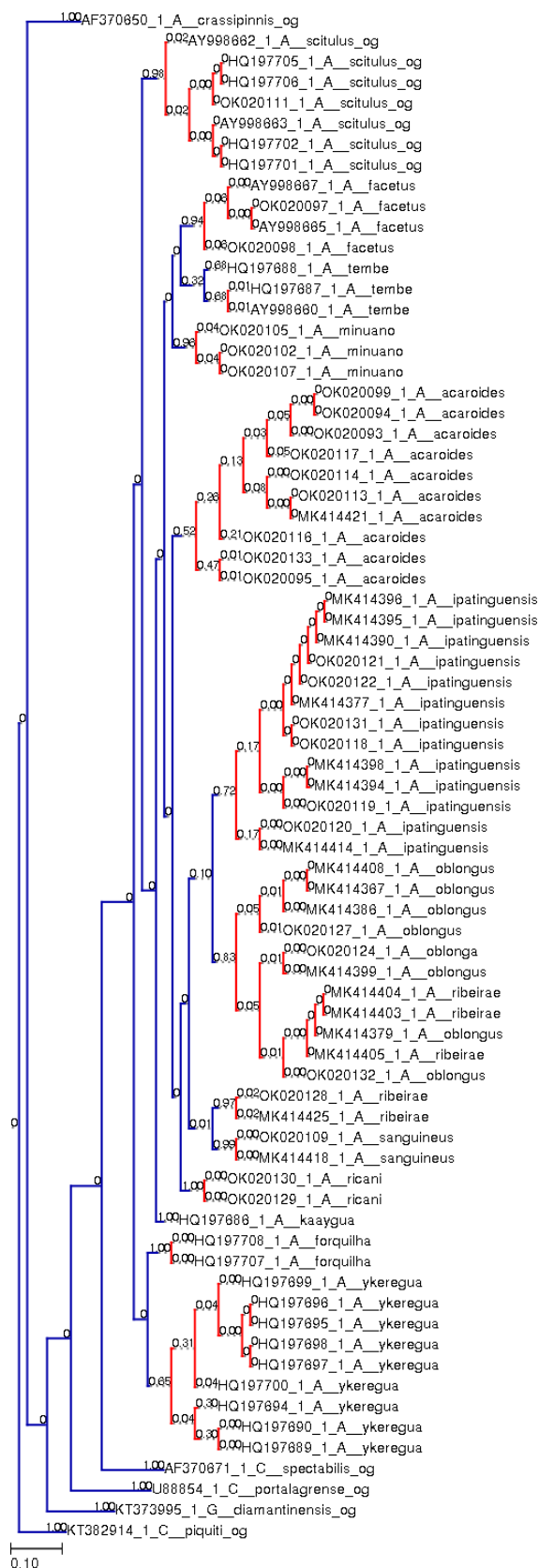


Figura 15: Resultado de delimitação de espécies da análise 6 para o gene *CYTB*, utilizando os grupos externos *Australoheros kaaygua*, *Caquetaia spectabilis*, *Cichlasoma portalegrense*, *Geophagus diamantinensis*, *Astronotus crassipinis* e *Cichla piquiti*, de acordo com o método bPTP.

*As linhas azuis representam as espécies delimitadas e as linhas vermelhas representam eventos de coalescência intraespecíficos.

3.2.7 Análise 7

Esse resultado indicou 14 linhagens de *Australoheros* obtidas nas análises, sendo *Oreochromis niloticus* o grupo mais externo adicionado (ver tabela 5).

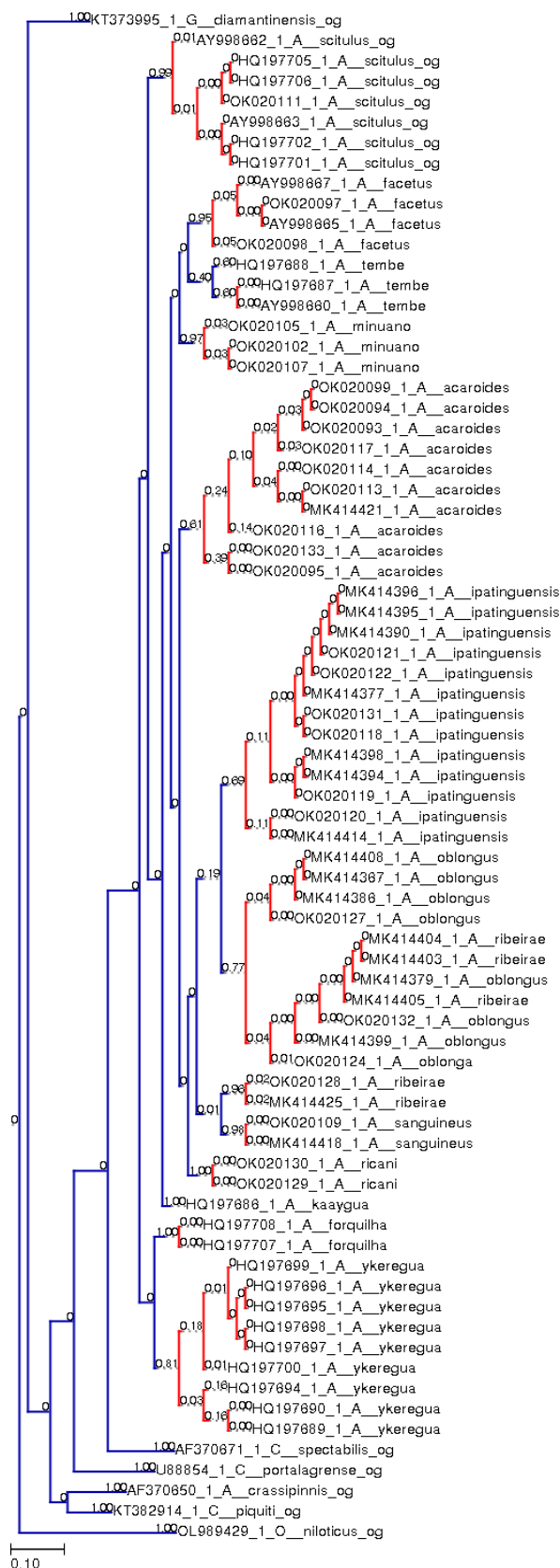


Figura 16: Resultado de delimitação de espécies da análise 7 para o gene CYTB, utilizando os grupos externos *Australoheros kaaygua*, *Caquetaia spectabilis*, *Cichlasoma portalegrense*, *Geophagus diamantiniensis*, *Astronotus crassipinnis*, *Cichla piquiti* e *Oreochromis niloticus*, de acordo com o método bPTP.

*As linhas azuis representam as espécies delimitadas e as linhas vermelhas representam eventos de coalescência intraespecíficos.

3.2.8 Análise 8

Na última análise do gene CYTB para delimitação de espécies do gênero *Australoheros*, apenas *A. kaaygua* e *Oreochromis niloticus* foram mantidos como grupos externos. 14 espécies de *Australoheros* foram delimitadas (ver tabela 5).

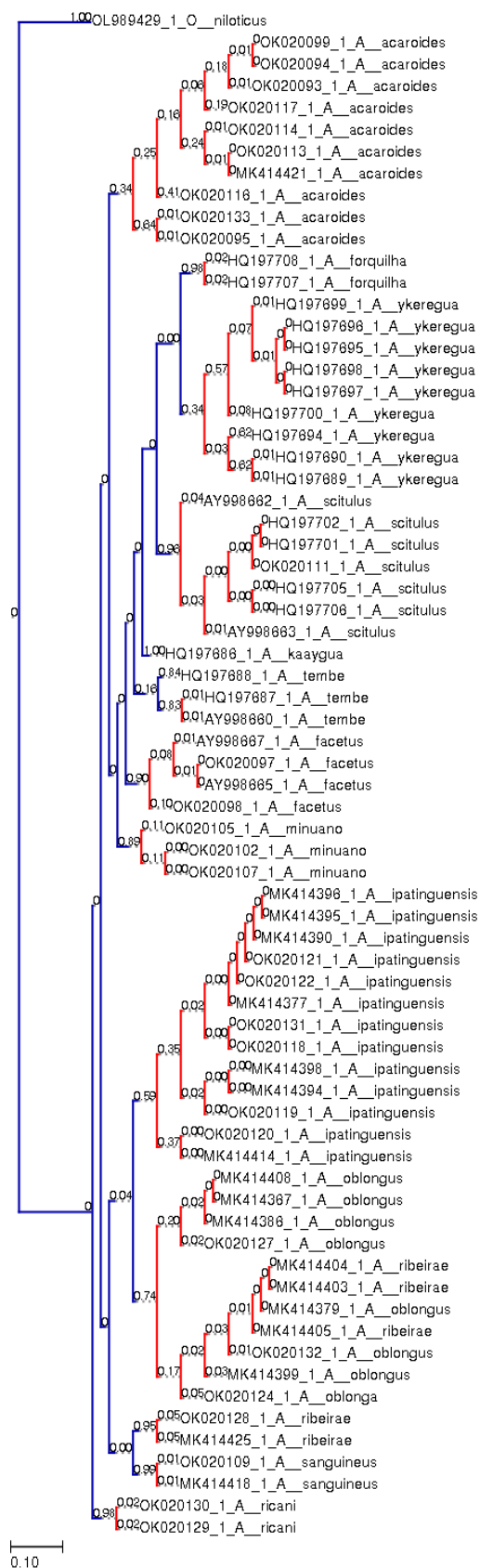


Figura 17: Resultado de delimitação de espécies da análise 8 para o gene CYTB, utilizando os grupos externos *Australoheros kaaygua* e *Oreochromis niloticus*, de acordo com o método bPTP. *As linhas azuis representam as espécies delimitadas e as linhas vermelhas representam eventos de coalescência intraespecíficos.

4 DISCUSSÃO

As primeiras análises de delimitação de espécies utilizaram linhagens de *Australoheros* como grupos externos. *Australoheros scitulus* e *A. kaaygua* foram escolhidos, respectivamente, para COI e CYTB. A partir da segunda análise, grupos externos de outras tribos foram adicionados até a sexta análise; a partir da sétima análise, grupo externo adicionado pertence a subfamília Pseudocrenilabrinae. Esse distanciamento filogenético na escolha dos grupos externos foi proposto para testar uma das premissas do método de delimitação bPTP, que sugere o uso de um grupo externo próximo para melhorar os resultados da delimitação (Zhang *et al.*, 2013).

4.1 Diferenças nas análises de delimitação de espécies baseadas no gene COI

Oito análises foram realizadas para investigar impacto gerado pela escolha de diferentes grupos externos, bem como o desempenho do gene COI para a delimitação de espécies do gênero *Australoheros*. Na análise 1, *A. scitulus* foi designado como grupo externo e raiz da árvore, delimitando 14 linhagens no total: quatro foram indicadas como linhagens distintas de *A. ipatinguensis* e outras nove sendo linhagens únicas: *A. angiru*, *A. oblongus*, *A. ribeirae*, *A. sanguineus*, *A. ricani*, *A. acaroides*, *A. facetus*, *A. sp "Arapey"* e *A. minuano*. *Caquetaia spectabilis* foi adicionada como grupo externo e raiz da análise 2, alterando *A. ipatinguensis* de quatro linhagens anteriormente indicadas para uma linhagem única. *Australoheros scitulus* + *A. angiru*; *A. minuano* e *A. sp "arapecy"*, também foram considerados como a mesma linhagem; *A. oblongus*, *A. ribeirae*, *A. sanguineus*, *A. ricani*, *A. acaroides*, *A. facetus* permaneceram iguais à análise anterior, totalizando nove linhagens de *Australoheros* delimitadas. A análise 3 adicionou *Cichlasoma portalegrense* como grupo externo e raiz delimitando oito linhagens para *Australoheros*. Pela primeira vez, *A. ipatinguensis* e *A. oblongus* foram recuperadas como a mesma linhagem. *A. ribeirae*, *A. sanguineus*, *A. ricani*, *A. acaroides*, *A. facetus*, *A. minuano* + *A. sp "arapecy"* e *A. scitulus* + *A. angiru* idênticas à análise anterior. A quarta e a quinta análise, adicionaram *Geophagus diamantinensis* e *Astronotus crassipinis* como grupos externos e raízes, respectivamente, indicando as mesmas linhagens da análise 3 e estabilizando a árvore com oito linhagens. *Cichla piquiti* foi integrada à sexta análise como raiz e grupo externo. Além das linhagens já delimitadas anteriormente (*A. scitulus* + *A. angiru*, *A.*

ricani, *A. acaroides*, *A. factus* + *A. minuano* e *A. minuano* + *A. sp. "Arapey"*) *A. ribeirae* e *A. sanguineus* se juntaram a *A. ipatinguensis* e *A. oblongus* como mesmas linhagens, totalizando seis linhagens delimitadas. A sétima análise e a oitava análise enraizaram suas árvores em *Oreochromis niloticus*, de modo que apenas a sétima análise utilizou os grupos externos adicionados anteriormente. Assim, na análise 7 nenhuma alteração nas linhagens de *Australoheros* foi observada, em relação à análise 6, mantendo a delimitação de seis linhagens. Para a última análise de COI, *A. ribeirae* e *A. sanguineus* foram separadas como espécies independentes, similar ao obtido com as análises 3, 4 e 5 delimitando oito espécies (ver tabela 4).

4.2 Diferenças nas análises de delimitação de espécies baseadas no gene CYTB

Os padrões de experimentações aplicados para o gene COI também foram testados para CYTB, assim, oito análises de delimitação de espécies foram realizadas, com alteração do grupo externo utilizado na primeira análise, devido a existência de sete haplótipos distintos de *A. scitulus*. A análise 1 de CYTB utilizou *A. kaaygua* como grupo externo e raiz da árvore, delimitando 24 espécies para *Australoheros* sendo: três linhagens de *A. ykeregua*; duas linhagens de *A. facetus*; duas linhagens de *A. ipatinguensis*; *A. ribeirae*; três linhagens de *A. oblongus*; cinco linhagens de *A. acaroides*; duas linhagens de *A. tembe*. *A. forquilha*, *A. scitulus*, *A. minuano*, *A. oblongus* + *A. ribeirae*, *A. ribeirae*, *A. sanguineus* e *A. ricani* foram delimitados como haplótipos únicos. Com a adição de *Caquetaia spectabilis* para raiz e grupo externo, a segunda análise resultou na delimitação de 20 linhagens. As duas linhagens de *A. ipatinguensis* indicados na primeira análise, foram agrupados em uma única linhagem, assim como as três linhagens de *A. oblongus* se agruparam a *A. oblongus* + *A. ribeirae*. *A. ykeregua* (3), *A. facetus*, *A. acaroides* (5), *A. tembe* (2), *A. forquilha*, *A. scitulus*, *A. minuano*, *A. ribeirae*, *A. sanguineus*, *A. kaaygua* e *A. ricani* permaneceram indicados como na primeira análise. As cinco linhagens de *A. acaroides* anteriormente indicadas na análise 1 e 2 como linhagens diferentes, foram agrupadas em um único táxon na análise 3, devido a adição de *Cichlasoma portalegrense* como grupo externo e raiz. O restante das linhagens (*A. oblongus* + *A. ribeirae*, *A. ipatinguensis*, *A. ykeregua* (3), *A. facetus*, *A. ribeirae*, *A. tembe* (2), *A. forquilha*, *A. scitulus*, *A. minuano*, *A. sanguineus*, *A. kaaygua* e *A. ricani*) se manteve delimitada conforme análise 2, totalizando 16 linhagens delimitadas para

Australoheros. *Australoheros ykeregua* foi recuperada como uma única linhagem na adição de *Geophagus diamantinensis* como grupo externo e raiz para análise 4, sendo o restante das espécies delimitadas idêntico à análise 3. As árvores de delimitação de espécies se mantiveram estáveis da quarta até a oitava análise, finalizando os últimos testes de CYTB com 14 linhagens para *Australoheros*: *A. acaroides*, *A. facetus*, *A. forquilha*, *A. ipatinguensis*, *A. kaaygua*, *A. oblongus* + *A. ribeirae*, *A. minuano*, *A. ricani*, *A. ribeirae*, *A. sanguineus*, *A. scitulus*, duas linhagens para *A. tembe* e *A. ykeregua*.

4.3 Comparação dos resultados da delimitação de espécies entre o gene COI e o gene CYTB.

Os parâmetros utilizados na delimitação de espécies para o gene COI e CYTB foram semelhantes, se diferenciando apenas na utilização do grupo externo na primeira análise. Os resultados mostram que CYTB delimitou mais linhagens para o *Australoheros* do que COI. Alguns aspectos são capazes de explicar esses resultados. O primeiro está relacionado ao fato de que existem menos estudos de sequenciamento para o gene COI no mesmo conjunto de espécies, em relação a CYTB. Consequentemente, menos sequências de *Australoheros* para o gene COI estão disponíveis no Genbank. O Tópico 2.2 informa que o conjunto de dados inicial conta com 69 táxons para CYTB e 38 para COI. A outra hipótese é que o gene COI seja mais conservado que o gene CYTB em *Australoheros*, ou seja, que tenha uma taxa de evolução mais lenta e, portanto, tenha acumulado menos diferenças ao longo do tempo, não delimitando tantas linhagens. Ao comparar os resultados obtidos para os dois genes, é possível observar uma diminuição na quantidade de linhagens delimitadas a partir da segunda análise. Essa mudança é impactada pela escolha dos grupos externos. De acordo com as premissas do método bPTP (Zhang *et al.*, 2013), apresentado na introdução do trabalho, a utilização de grupos externos taxonomicamente mais distantes do gênero *Australoheros* interfere na quantidade de espécies delimitadas - quanto mais distante for o grupo externo em que a árvore está enraizada, menor será quantidade de espécies delimitada. A partir de um certo momento, as análises tendem a se estabilizar devido a perda de sensibilidade do método, assim as linhagens não serão alteradas mesmo com a adição de novos grupos externos. Segundo, Simon *et al.* (1994) ao analisar diversos genes mitocondriais codificantes, constataram que o gene COI é o mais conservado em relação à evolução de aminoácidos. Além disso, Avise (2000) menciona que CYTB é

um gene mitocondrial com rápida taxa de evolução e por isso é indicado para abordagens de delimitação de espécies, uma vez que acumula mutações em um intervalo de tempo menor. De acordo com pontos que serão apresentados a seguir e os argumentos teóricos propostos acima, é possível inferir que o gene COI é mais conservado em relação a CYTB no grupo estudado, o que pode explicar o método perde sensibilidade mais facilmente para CYTB.

Após a segunda análise do gene COI, grupos externos fora da tribo Heroini – na qual o gênero *Australoheros* está inserido (ver Tabela 3) – são adicionados, alterando a dinâmica das árvores. As análises 3, 4 e 5 recuperam as mesmas oito linhagens (*A. acaroides*, *A. facetus*, *A. ipatinguensis* + *A. oblongus*, *A. minuano* + *A. sp “Arapey”*, *A. ricani*, *A. ribeirae*, *A. sanguineus* e *A. scitulus*), o que indica uma estabilização das análises. Contudo, a adição de *Cichla piquiti*, da tribo Cichlini, a partir da análise 6, recupera *A. ipatinguensis* + *A. oblongus* + *A. ribeirae* + *A. sanguineus* como linhagem única, modificando a delimitação de *Australoheros* para seis linhagens. A adição de *Oreochromis niloticus*, da subfamília Pseudocrenilabrinae, como raiz na análise 7, não altera o número de linhagens, mas a análise 8, que utiliza apenas *Oreochromis niloticus* como grupo externo, torna a recuperar *A. ribeirae* e *A. sanguineus* como linhagens distintas, semelhante ao resultado obtido para as análises 3, 4 e 5. Assim, para o gene COI, houve alteração no número de espécies delimitadas até última análise. Ao analisar o desempenho do gene CYTB, é possível observar um maior número de espécies delimitadas em relação ao COI. Houve alterações no número de espécies delimitadas até a terceira análise (ver tabela 5). Na quarta análise, com a adição de *Geophagus diamantinensis*, da tribo Geophagini como grupo externo, 14 linhagens são recuperadas (*A. acaroides*, *A. facetus*, *A. forquilha*, *A. ipatinguensis*, *A. kaaygua*, *A. oblongus* + *A. ribeirae*, *A. minuano*, *A. ricani*, *A. ribeirae*, *A. sanguineus*, *A. scitulus*, *A. tembe* (2), *A. ykeregua*) e partir dessa análise, nenhuma alteração na delimitação de espécies foi observada. Portanto, para CYTB não há alteração no número de espécies até a última análise; a estabilização das árvores de delimitação de espécies é alcançada a partir da quarta análise, mesmo como a adição de diferentes grupos externos, o que indica que a perda de sensibilidade do método acontece mais rapidamente.

Além da variação existente na quantidade de linhagens delimitadas, algumas linhagens são mais frequentemente recuperadas que outras; e ainda há linhagens que permanecem inalteradas até a última análise. *Australoheros angiru* foi recuperado

como linhagem distinta apenas na primeira análise de COI; *A. ipatinguensis* e *A. oblongus* foram recuperados como linhagens distintas apenas nas duas primeiras análises de COI. *Australoheros ribeirae* e *A. sanguineus* foram recuperadas como linhagens distintas até a quinta análise de COI. Somente *A. acaroides*, *A. facetus*, *A. minuano*, *A. ricani* e *A. scitulus* foram recuperadas como linhagens únicas em todas as análises para o gene COI. Em relação às espécies recuperadas para os testes de CYTB, *A. ipatinguensis*, foi delimitada em quatro linhagens distintas na primeira análise, foi recuperada como uma linhagem única no segundo teste de CYTB. As três linhagens distintas *A. oblongus* inicialmente delimitadas na análise 1, foram recuperadas junto com *A. oblongus* + *A. ribeirae* a partir da análise 2. *Australoheros acaroides*, delimitado como cinco linhagens distintas na primeira análise de CYTB, foi considerado linhagem única a partir da terceira análise. *Australoheros ykeregua* deixou de ter três linhagens distintas para uma única linhagem na quarta análise; *Australoheros facetus*, *A. forquilha*, *A. kaaygua*, *A. minuano*, *A. ricani*, *A. ribeirae*, *A. sanguineus*, *A. scitulus* e *A. tembe* foram igualmente recuperadas em todas as análises para o gene CYTB. As análises de ambos os genes recuperaram em comum *A. facetus*, *A. minuano*, *A. ricani* e *A. scitulus*.

Existe uma relação entre a idade das linhagens e os resultados obtidos pelo método bPTP. Resultados obtidos por Ottoni *et al.* 2019, através do uso de dados moleculares para delimitar de espécies e construir uma filogenia datada do grupo de espécies *A. autrani* nos ajuda a interpretar os resultados obtidos neste trabalho,

além de facilitar a compreensão entre divergência das espécies e métodos de análise de coalescência.

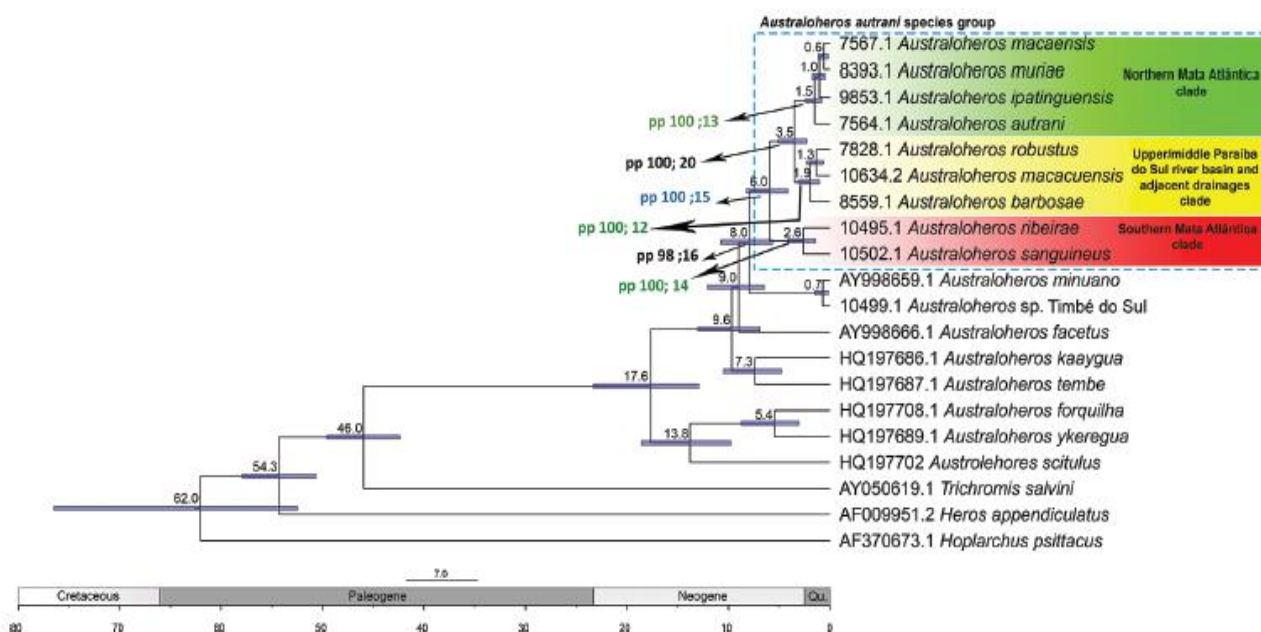


Figura 18: Filogenia datada (Inferência Bayesiana) do grupo de espécies *A. autrani* retirada de Ottoni et al. (2019). Os valores próximos acima dos nós representam a idade média dos nós em milhões de anos.

Os resultados de Ottoni et al., 2019 indicam o surgimento do gênero *Australoheros* há 46 m.a.a (milhões de anos atrás) e a diversificação de espécies por volta de 17 m.a.a. As linhagens que não sofreram alterações em suas delimitadas durante todas as análises: *A. facetus*, *A. minuano*, *A. ricani* e *A. scitulus*, recuperadas para ambos os genes; *A. acaroides* somente para COI e *A. forquilha*, *A. kaaygua*, *A. ribeirae*, *A. sanguineus*, e *A. tembe* somente para CYTB, são apresentadas por Ottoni et al. (2019) como linhagens que divergiram em até 3.5 m.a.a, com exceção de *A. minuano* de 0,7 milhões de anos (Ottoni et al., 2019), mais recente que as outras analisadas; esse dado pode ser um indicativo de que *A. minuano* é espécie com uma taxa de evolução rápida. As linhagens cujo o agrupamento de haplótipos teve maior variação conforme a adição de diferentes grupos externos - *Australoheros ribeirae*, *A. sanguineus*; *A. barbosae*, *A. macacuensis* e *A. robustus* (correspondentes a *A. oblongus*); *A. autrani*, *A. ipatinguensis*, *A. muriae* e *A. macaensis* (correspondente a *A. ipatinguensis*) datam de 2,6 m.a.a para menos (Ottoni et al., 2019).

Essas mesmas linhagens foram apresentadas, segundo os resultados de divergência de Ottoni et al. (2019) como linhagens mais recentes, ou seja, com menor tempo de divergência. Outros métodos de delimitação de espécies, como o GYMC,

funcionam para espécies com maior tempo de divergência. Espécies que divergiram recentemente, ou clados passando por radiação rápida, provavelmente não serão identificáveis sob esse modelo (Reid and Carstens, 2012). O método bPTP, como observado na filogenia data de Ottoni et al., 2019, é eficaz para recuperação de linhagens com tempo de divergência mais curto.

4.4 Comparação dos resultados obtidos em relação ao trabalho de Lucena et al. (2022).

A análise de COI realizada por Lucena et al. (2022) totaliza 12 linhagens delimitadas para *Australoheros* e cita em seu trabalho a utilização de *Cichlasoma portalegreense*, da tribo Cichlasomatini, como grupo externo, mas esse táxon aparentemente não foi utilizado, pois não está presente na árvore (ver Figura 19). Supomos que essa árvore pode ter sido enraizada em *A. tembe*. As seguintes linhagens foram recuperadas pelo trabalho de Lucena e seus colaboradores (ver tabela 2 para melhor compreensão entre as correspondências das linhagens):

1. *Australoheros tembe* (possivelmente utilizado como grupo externo);
2. Táxon *A. scitulus* + *A. angiru*;
3. Duas linhagens do táxon *A. canterai*, sendo uma correspondente a *A. minuano* e outra a *A. sp* “Arapey” em nossa análise;
4. *Australoheros acaroides*;
5. *Australoheros ribeirae*;
6. *Australoheros sanguineus*;
7. Duas linhagens de *A. ipatinguensis*;
8. *Australoheros oblongus*;
9. *Australoheros facetus*;
10. *Australoheros ricani*.

Iremos comparar os resultados de Lucena et al. (2022) com as análises 1 e 2 de COI devido à similaridade taxonômica entre os grupos externos utilizados na delimitação de espécies.

A primeira análise de COI (figura 2) utilizou *A. scitulus* como raiz e delimitou 14 linhagens. *Australoheros acaroides*, *A. scitulus*, *A. ribeirae*, *A. sanguineus*, *A. facetus*,

A. oblongus (3)², *A. sp* “Arapey” (3) e *A. ricani* se mostraram iguais às de Lucena *et al.* (2022). As principais diferenças foram: delimitação de quatro linhagens distintas de *A. ipatinguensis* em comparação a duas linhagens indicadas por Lucena *et al.* (2022) e a ausência de *A. tembe* em nossa análise. *Australoheros tembe* não foi utilizado pois a sequência de DNA não foi encontrada nem no GenBank nem no BoldSystems ‘<https://boldsystems.org/>’.

Caquetaia spectabilis foi a raiz da segunda análise de COI (figura 3), delimitando *A. acaroides*, *A. facetus*, *A. ipatinguensis*, *A. minuano*, *A. oblongus*, *A. ricani*, *A. ribeirae*, *A. sanguineus*, *A. scitulus* + *A. angiru*. As principais diferenças para a análise 2 em relação aos resultados de Lucena *et al.* (2022) foram: linhagem única para *A. ipatinguensis*; *A. minuano* (3) e *A. sp* “araapey” (3) consideradas como a mesma

² O número entre parênteses se refere às linhagens delimitadas por Lucena *et al.* (2022), descritas na lista acima.

linhagem e a inclusão de *A. minuano* no clado de *A. facetus* (ver figura 19).

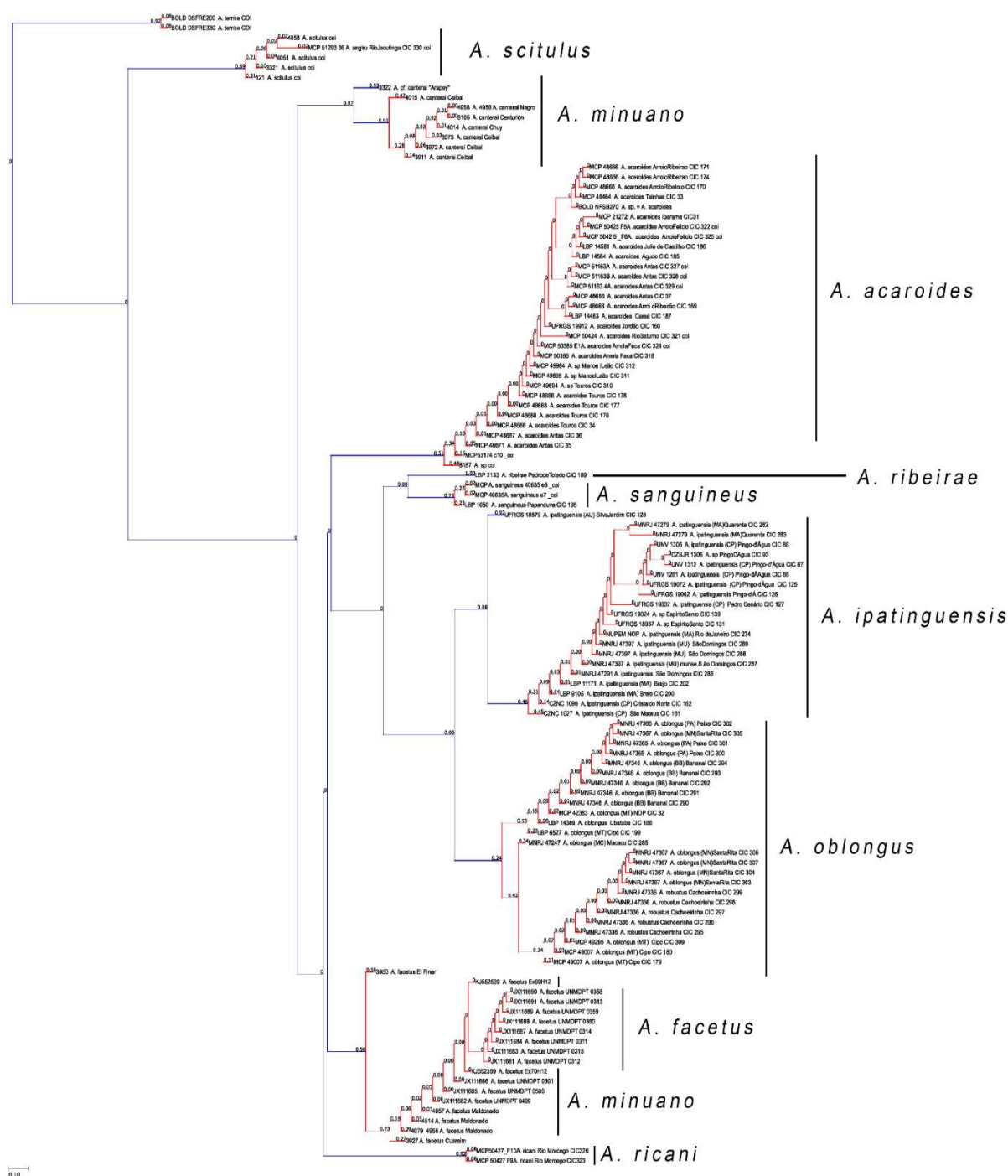


Figura 19: Delimitação de espécies de *Australoheros* com base na análise bPTP de sequências COI. Modificado de Lucena et al. 2022. Os nomes de espécie estão em destaque apenas para facilitar a visualização.

A análise de CYTB realizada por Lucena et al. (2022) delimitou 22 espécies para *Australoheros*, utilizando *Amphilophus citrinellus* (Gunther, 1864) e *Neetroplus nematopus* (Gunther, 1867), ambos pertencentes a tribo Heroini, como grupos externos. Para CYTB, foram comparadas as análises 1 e 2 pelos mesmos motivos justificados para COI. As seguintes linhagens foram recuperadas por Lucena e seus

colaboradores (ver tabela 2 para melhor compreensão entre as correspondências das linhagens):

1. *Australoheros scitulus*;
2. Duas linhagens para *A. canterai* ceibal, correspondente a *A. minuano*;
3. Três linhagens para *A. acaroides*;
4. *Australoheros sanguineus*;
5. *Australoheros ribeirae*;
6. Táxon *A. perdi* + *A. ipatinguensis* + *A. cf. capixaba* + *A. macaenses* + *A. muriae* correspondente a *A. ipatinguensis*;
7. Táxon *A. cf. autrani* + *A. saquarema* correspondente a *A. ipatinguensis*;
8. Duas linhagens para *A. macacuensis* corresponde a *A. oblongus*;
9. Táxon *A. robustus* cachoeirinha + *A. mattsosi* + *A. sp. ouro branco* + *A. cf. montanus* (correspondentes a *A. oblongus*) + *A. robustus* (corresponde a *A. ribeirae*);
10. Táxon CIC Juiz de fora + *A. tavaresi* + *A. cf. paraibae* + *A. barbosae* + *A. cf. barbosae* + *A. paraibae* correspondente a *A. oblongus*.
11. *Australoheros ricani*;
12. *Australoheros facetus*;
13. Duas linhagens para *A. tembe*
14. *Australoheros kaaygua*;
15. Três linhagens para *A. ykeregua*;
16. *Australoheros forquilha*.

A primeira análise de CYTB utilizou *A. kaaygua* como grupo externo (Figura 10) e recuperou 24 linhagens. *Australoheros ykeregua* (15)³, *A. ipatinguensis* (6 e 7), *A. ribeirae*, *A. tembe* (13), *A. forquilha*, *A. scitulus*, *A. oblongus* + *A. ribeirae* (9), *A. sanguineus*, *A. ricani*, *A. kaaygua* e *A. oblongus* (8) foram recuperadas tal qual os resultados de Lucena *et al.* (2022). As alterações em relação a análise de Lucena *et al.* (2022) foram: cinco linhagens para *A. acaroides* ao invés de três e uma linhagem recuperada para *A. minuano* (2) ao invés de duas.

A segunda análise de CYTB (figura 11) recuperou 20 linhagens utilizando *Caquetaia spectabilis* como grupo externo. Em comparação com análise de Lucena *et al.* (2022), *A. ipatinguensis* (6) foi considerado linhagem única ao invés de duas e *A.*

³ O número entre parêntesis se refere às linhagens delimitadas por Lucena *et al.* (2022), descritas na lista acima

oblongus não foi considerado como duas linhagens distintas, com seus haplótipos agrupados com *A. ribeirae* (9).

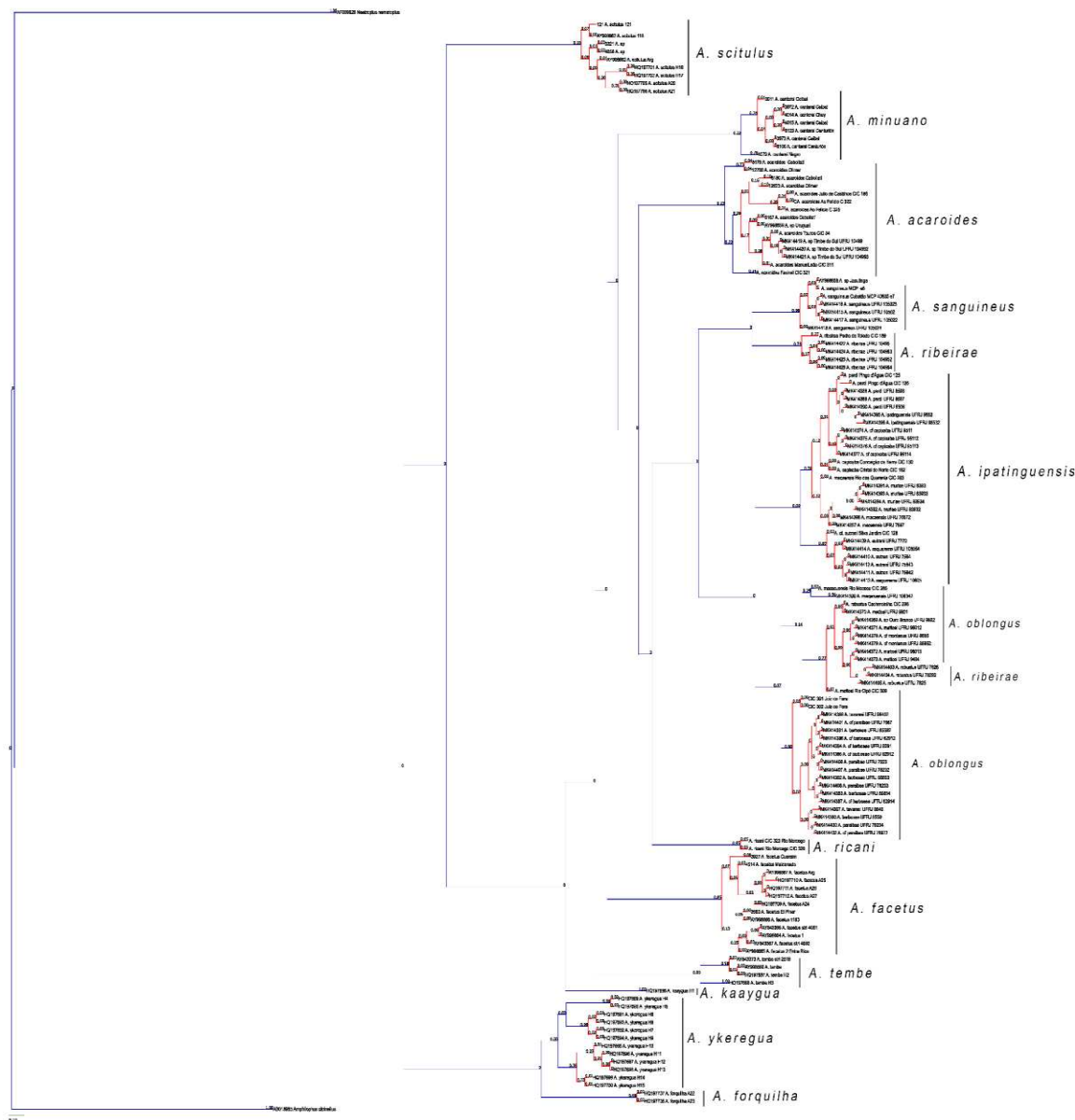


Figura 20: Delimitação de espécies de *Australoheros* com base na análise bPTP de sequências CYTB. Modificado de Lucena et al. 2022. Os nomes de espécie estão em destaque apenas para facilitar a visualização.

Lucena et al. (2022) defende o uso do conceito unificado de espécies (De Queiroz, 2007) e acredita que a taxonomia integrativa é importante na identificação e descrição de novas espécies, na premissa que a deficiência de um método analítico pode ser compensada pelos pontos positivos de outro método, e, por isso, exploram a diversidade e filogenia de *Australoheros* utilizando filogenias baseadas em DNA, a análise de coalescência e também critérios morfológicos. Nosso trabalho, neste

momento, não tem a intenção de descrever e questionar relacionamentos entre espécies, então iremos debater apenas análises para delimitação de espécies.

De maneira geral, as primeiras análises de delimitação de espécies para COI e CYTB não foram tão discrepantes aos resultados obtidos pelas análises de Lucena *et al.* (2022).

O grupo externo indicado por Lucena *et al.* (2022) para a delimitação de espécies de COI não foi utilizado e essa alteração não foi justificada. O trabalho referenciado se baseia exclusivamente nos resultados obtidos com a análise do gene COI como mais satisfatório para a delimitação de *Australoheros*. Duas novas espécies são descritas neste estudo: *Australoheros mboapari*, que surgiu a partir de comparações morfológicas com o parapátrico *A. acaroides*, sem análise molecular, pois é conhecido apenas por espécimes fixados em formalina (não há sequências de DNA disponíveis) e *A. ricani*, que foi sugerida com base na posição nas árvores filogenéticas de COI e CYTB, sem caracteres morfológicos diagnósticos. Portanto, não podemos dizer que a congruência de análises moleculares e morfológicas foi o que determinou a escolha de COI como gene mais satisfatório para delimitação do gênero.

Os autores consideraram que a análise para CYTB sofreu “overdone splitting”, ou seja, teria delimitado espécies “em excesso”, o que explicaria o maior número de linhagens delimitadas. Os pesquisadores acreditam que esse fenômeno seria causado pela fraqueza de dados, em grande parte dos dados disponíveis no Genbank, além do CYTB possuir sequências mais curtas em relação à COI, o que pode ter influenciado na obtenção de resultados (Lucena *et al.*, 2022, p.46). Apesar dessa citação sobre o tamanho dos fragmentos de CYTB por Lucena *et al.* (2022), as sequências de CYTB utilizadas para esse trabalho eram de 1099pb e as de COI eram de 654pb. Assim, Lucena e seus colaboradores rejeitam a análise para CYTB pois, segundo eles, falharam em encontrar uma árvore genética confiável.

Se torna complexo comparar os dois trabalhos e compreender a rejeição do gene CYTB já que a não deleção dos haplótipos idênticos por Lucena e colaboradores pode ter influenciado o funcionamento do bPTP. O próprio trabalho de Lucena *et al.* (2022, p. 5) cita que COI é um gene pouco utilizado para sistemática de ciclídeos até o momento, mas menciona que o COI se mostra eficiente e que há o surgimento de novos estudos (DeSalle & Goldstein, 2019; Kullander *et al.*, 2019) para sua aplicação na delimitação de espécies e análise filogenética.

Porém, como discutido nesse trabalho, sequências de CYTB permitem um resultado mais sensível para análise de bPTP por serem genes menos conservados. Além disso, outros estudos realizados nos mesmos parâmetros, como de Ottoni, (2019) e Silva *et al.* (2022), também utilizam CYTB como gene para delimitação de espécies de *Australoheros* e teorizam essa utilização pelas mesmas razões, mostrando que CYTB é um gene mitocondrial com rápidas taxas evolutivas.

5 CONCLUSÃO

Australoheros tem apresentado estudos controversos nos últimos anos. A delimitação de espécies foi um grande problema para a biologia devido à existência de conceitos alternativos de espécie, mas com a unificação desse conceito, proposta por De Queiroz (2007), o problema deixou de ser conceitual para ser metodológico, criando a necessidade de melhorar as ferramentas de delimitação de espécies. A Teoria da Coalescência, uma análise temporal que rastreia o ancestral comum mais próximo de cada alelo, transformou esse cenário, fornecendo uma base teórica para criação de novos algoritmos capazes de delimitar espécies utilizando árvores filogenéticas enraizadas. Dentre esses modelos, o método bPTP faz uso de um modelo estatístico baseado em filogenias não ultramétricas, baseado na proposição de que a substituição de nucleotídeos é maior em relação a uma taxa interespecífica do que a uma taxa intraespecífica. Além disso, duas premissas importantes são discutidas para o bom desempenho de bPTP: o enraizamento das árvores com grupos externos filogeneticamente próximos do gênero delimitado, bem como a deleção de haplótipos idênticos para evitar o surgimento de ramificações terminais de comprimento zero nas árvores de saída.

Os resultados obtidos pelas 16 análises realizadas neste trabalho demonstraram que CYTB é mais sensível do que gene COI para a delimitação de espécies de *Australoheros* pois delimitou mais linhagens em todas as análises realizadas. É notório que a escolha dos grupos externos para as raízes das árvores impacta na forma com que as linhagens são delimitadas. De acordo com o servidor bPTP '<https://species.h-its.org/>', o grupo externo deve ser escolhido o mais próximo possível do grupo de espécies delimitadas. Além disso, é de extrema importância que a base de dados utilizada para gerar as árvores de delimitação tenham seus haplótipos idênticos reduzidos, para permitir a eficácia do método e não gerar falsos resultados.

A taxonomia integrativa surgiu como ferramenta para solucionar problemas taxonômicos, assim como o conceito unificado de espécie. A utilização de critérios morfológicos, ecológicos e moleculares pode trazer grandes avanços para a compreensão da diversidade do gênero e completar lacunas existentes em métodos taxonômicos mais antigos. Além da análise de bPTP (Zhang *et al.*, 2013), análises como método baseado em árvores proposto por Wiens e Penkrot (tree-based method,

Wiens and Penk-rot, 2002) e o método General Mixed Yule Coalescent (GMYC; Pons et al. (2006) também podem ser empregados, com intuito de enriquecer a pesquisa e aumentar a compreensão da taxonomia do gênero de *Australoheros*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avice, J.C. (2000). *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Oxford University Press, Cambridge.
- Camargo, A., & Sites, J. Jr. (2013). Species delimitation: A decade after the Renaissance. In *The Species Problem - Ongoing Issues*. InTech. Available at: <http://dx.doi.org/10.5772/52664>.
- Cosme Damião Cruz, F., Medeiros Ferreira, F., & Pessoni, L.A. (2020). *Biometria Aplicada ao Estudo da Diversidade Genética*. Viçosa: UFV. ISBN: 978-85-60249-70-1.
- Cracraft, J. (1983). Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology*, 1, 159–187.
- da Silva, M.A., Ottoni, F.P., Mattos, J.L.O., et al. (2023). Species diversity and phylogeography of the *Australoheros autrani* group (Teleostei, Cichlidae) in eastern Brazil. *Ichthyological Research*, 70, 378–385. <https://doi.org/10.1007/s10228-022-00888-9>
- de Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56, 879–886. <https://doi.org/10.1080/10635150701701083> PMID: 18027281
- DeSalle, R., Goldstein, P. (2019). Review and interpretation of trends in DNA barcoding. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 302. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00302>
- DeSalle, R., Narechania, A., & Tessler, M. (2023). Multiple outgroups can cause random rooting in phylogenomics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 184, 107806. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2023.107806>
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797.
- Fricke, R., Eschmeyer, W.N., & van der Laan, R. (Eds.). (2024). *ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES: Genera, Species, References*. Electronic version accessed 08/28/2024. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>
- Graça, W.J. da. (2008). *Sistemática da Tribo Heroini Kullander, 1998 (Perciformes, Cichlidae)*. Maringá. Disponível em: <http://repositorio.uem.br:8080/jspui/handle/1/5107>

- Hein, J., Schierup, M.H., & Wiuf, C. (2005). *Gene Genealogies, Variation and Evolution: A Primer in Coalescent Theory*. Oxford University Press, USA.
- Kingman, J.F.C. (1982a). The coalescent. *Stochastic Processes and their Applications*, 13, 235–248.
- Kingman, J.F.C. (1982b). Exchangeability and the evolution of large populations. In: Koch, G., & Spizzichino, F. (Eds.), *Exchangeability in Probability and Statistics*. North-Holland, Amsterdam, pp. 97–112.
- Kingman, J.F.C. (1982c). On the genealogy of large populations. *Journal of Applied Probability*, 19A, 27–43.
- Kiihl, S.F. (2005). *Análise Estatística de Polimorfismo Molecular em Sequências de DNA Utilizando Informações Filogenéticas*. Campinas.
- Kullander, S.O. (1998). A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes). In Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., & Lucena, C.A.S. (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: EdIPUCRS, pp. 461–498.
- Kullander, S., Norén, M., Rahman, M.M., & Mollah, A.R. (2019). Chameleonfishes in Bangladesh: Hipshot taxonomy, sibling species, elusive species, and limits of species delimitation (Teleostei: Badidae). *Zootaxa*, 4586(2), 301–337. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4586.2.7> PMID: 31716133
- Liu, L., Wang, Q., Ma, K., Wang, L., Zhou, S., Sun, J., Zhang, T., Liu, X., Zhang, Y., Wang, Y., He, S., & Yang, X. (2023). Phylogenomic evidence for the ancient origin of the yellow-lipped sea krait (*Laticauda colubrina*) and its early divergence from the true sea kraits (*Laticaudinae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2023.107806>
- NA Rosenberg (2006). Gene genealogies. In Fox, C.W., & Wolf, J.B. (Eds.), *Evolutionary Genetics: Concepts and Case Studies*. Oxford University Press, pp. 173–189. Accessed at <https://rosenberglab.stanford.edu/papers/Rosenberg2006-EvolGenetBookChapter.pdf>
- Rambaut, A. (2018). Figtree ver 1.4.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh.
- Rambaut, A., Suchard, M., & Drummond, A. (2021). Tracer. Version 1.7.2.

- Reid, N.M., & Carstens, B.C. (2012). Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: A Bayesian implementation of the general mixed Yule-Coalescent model. *BMC Evolutionary Biology*, 12, 196. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-196>
- Rosa, J.R.B.F. (2016). Análise da Estrutura Populacional e do Desequilíbrio de Ligação de um Paineiro de Acessos de Sorgo: Uma Abordagem Usando Teoria da Coalescência. Piracicaba. Tese (Doutor em Genética e melhoramento de plantas) — Universidade de São Paulo. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-09062016-155937/publico/Joao_Ricardo_Bachega_Feijo_Rosa_versao_revisada.pdf. Acesso em: [28 de Agosto de 2024].
- Santos de Lucena, C.A., Kullander, S., Norén, M., & Calegari, B. (2022). Conjectures and refutations: Species diversity and phylogeny of *Australoheros* from coastal rivers of southern South America (Teleostei: Cichlidae). *PLoS ONE*, 17(12), e0261027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261027>
- Silva, Shyrley Glenda. (2017). Distribuição Geográfica das Espécies do Grupo *Australoheros* *autrani*, Endêmico da Região da Mata Atlântica, Leste do Brasil (Teleostei: Cichlidae: Heroini). Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) — Universidade Federal do Maranhão, São Luís. Disponível em: <https://monografias.ufma.br/jspui/bitstream/123456789/1322/1/Shyrley%20Glenda.pdf>. Acesso em: [28 de Agosto de 2024].
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6), 651–701. <https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>
- Smith, L., Chakrabarty, P., & Sparks, J.S. (2008). Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). *Cladistics*, 24, 625–641.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38, 3022–3027.
- Tomochika, F., & Barraclough, T.G. (2013). Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed Yule-Coalescent approach: A revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic Biology*, 62(5), 707–724. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syt033>
- Xia, X. (2018). DAMBE7: New and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1550–1552.

- Říčan, O., & Kullander, S.O. (2006). Character- and tree-based delimitation of species in the *Cichlasoma facetum* group (Teleostei, Cichlidae) with the description of a new genus. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 44, 136–152.
- Říčan, O., & Kullander, S.O. (2008). The *Australoheros* (Teleostei: Cichlidae) species of the Uruguay and Paraná River drainages. *Zootaxa*, 1724, 1–51.