

CIDIMAR ESTEVAM DE ASSIS

**ESTUDOS MOLECULARES E MORFOLÓGICOS INDICAM A PRESENÇA DE
SETE LINHAGENS E QUATRO POSSÍVEIS ESPÉCIES DO COMPLEXO DE
ESPÉCIES *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard 1824) (Cichliformes: Cichlidae)
NA BACIA DO RIO DOCE, SUDESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Amanda Ferreira e Cunha

Coorientador: Jorge Abdala Dergam

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2024

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A848e
2024

Assis, Cidimar Estevam de, 1993-

Estudos moleculares e morfológicos indicam a presença sete linhagens e quatro possíveis espécies do complexo de espécies *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard 1824) (Cichliformes: Cichlidae) na bacia do Rio Doce, sudeste do Brasil / Cidimar Estevam de Assis. – Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (76 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Amanda Ferreira e Cunha.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Animal, 2024.

Referências bibliográficas: f. 64-75.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.322>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Ictiologia - Doce, Rio, Bacia (MG e ES). 2. Código de barras de DNA taxonômico. 3. Filogeografia. 4. *Geophagus brasiliensis* - Classificação - Doce, Rio, Bacia (MG e ES). I. Cunha, Amanda Ferreira e, 1987-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. III. Título.

CDD 22. ed. 597.74


CIDIMAR ESTEVAM DE ASSIS

**ESTUDOS MOLECULARES E MORFOLÓGICOS INDICAM A PRESENÇA DE
SETE LINHAGENS E QUATRO POSSÍVEIS ESPÉCIES DO COMPLEXO DE
ESPÉCIES *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard 1824) (Cichliformes: Cichlidae)
NA BACIA DO RIO DOCE, SUDESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 30 de abril de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **CIDIMAR ESTEVAM DE ASSIS**
Data: 24/07/2024 08:09:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Cidimar Estevam de Assis

Autor

Documento assinado digitalmente
 **AMANDA FERREIRA E CUNHA**
Data: 22/07/2024 09:35:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Amanda Ferreira e Cunha

Orientador

Documento assinado digitalmente
 **JORGE ABDALA DERGAM DOS SANTOS**
Data: 22/07/2024 12:28:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jorge Abdala Dergam

Coorientador

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de cursar o mestrado.

Ao Departamento de Biologia Animal, o Laboratório de Sistemática Molecular Beagle, o Laboratório de Evolução e Genética Animal e o Museu de Zoologia João Moojen, pelo espaço físico e equipamentos cedidos para realização dessa pesquisa.

À professora Doutora Amanda Ferreira e Cunha, pela orientação e confiança.

Ao professor Doutor Jorge Abdala Dergam, pela coorientação e confiança.

À Fundação RENOVA, Fundação Espírito-santense de Tecnologia (FEST) e Rede Rio Doce Mar (RRDM), pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, minha irmã e meus amigos, pelo carinho e incentivo.

À Natália Maria de Freitas Vicente, Valéria Nogueira Machado e membros do Laboratório de Evolução e Genética Animal, pela extração e sequenciamento das amostras de DNA.

À Priscila Caroline Silva, pelos ensinamentos na área da taxonomia de peixes.

Aos membros e ex-membros do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática no trecho capixaba do Rio Doce (PMBA/Anexo7), pelo ótimo trabalho em equipe e companheirismo durante as atividades de campo e laboratoriais.

Aos membros e ex-membros do Laboratório de Sistemática Molecular (Beagle), pelo ótimo trabalho em equipe e companheirismo durante as atividades de campo e laboratoriais.

Aos pescadores e barqueiros que auxiliaram durante as atividades de coleta em campo.

“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”

(Albert Einstein)

RESUMO

ASSIS, Cidimar Estevam de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2024. **Estudos moleculares e morfológicos indicam a presença sete linhagens e quatro possíveis espécies do complexo de espécies *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard 1824) (Cichliformes: Cichlidae) na bacia do Rio Doce, sudeste do Brasil.** Orientadora: Amanda Ferreira e Cunha. Coorientador: Jorge Abdala Dergam

A ordem Cichliformes é um táxon muito diversificado que pode ser encontrado em rios e oceanos nas regiões tropicais e temperadas; já a família Cichlidae é o táxon mais diversificado dessa ordem, podendo ser encontrado em rios e oceanos nas regiões tropicais e subtropicais. A espécie *Geophagus brasiliensis* está alocada na família Cichlidae e é considerada um complexo de espécies formado por oito espécies que podem ser encontradas em rios e lagos nas regiões nordeste, sudeste e sul do Brasil. A bacia do Rio Doce está localizada no sudeste do Brasil, nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Considerando que os estudos moleculares e morfológicos podem ser aplicados para identificar espécies, inferir sobre as relações de parentesco, origem, ancestralidade e filogeografia, o objetivo desta pesquisa é associar padrões de DNA barcoding e morfologia para detectar possíveis linhagens e espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis* da bacia do Rio Doce. Para isso, amostras de tecido muscular foram retiradas de 62 espécimes coletados em 30 localidades na bacia do Rio Doce e enviadas ao Laboratório de Evolução e Genética Animal da Universidade Federal do Amazonas para extração, amplificação e sequenciamento do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (*COI*). Os estudos moleculares permitiram a construção de uma filogenia molecular e o cálculo de distâncias genéticas usando o software MEGA 11. Além das amostras do Rio Doce, vinte e quatro sequências provenientes de topótipos de oito espécies descritas do complexo de espécies *G. brasiliensis*, foram usadas como material comparativo. Os estudos morfológicos incluíram 21 caracteres merísticos, 23 caracteres morfométricos e variações nos padrões de coloração do corpo e nadadeiras. A topologia da filogenia molecular indicou a presença de sete linhagens do complexo de espécies *G. brasiliensis* na bacia do Rio Doce com distâncias genéticas que variaram entre 0,5% a 5,7% entre linhagens comparadas par a par, enquanto que as distâncias genéticas entre as sete linhagens e as oito espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis* variaram entre 0,0% a 8,3%. Diferenças morfológicas foram observadas entre algumas linhagens, assim como diferenças no padrão de distribuição geográfica ao longo da bacia e nas relações de parentesco com as outras espécies deste complexo de espécies. Foram encontradas evidências de quatro possíveis espécies não descritas deste complexo, na bacia

do Rio Doce, as quais foram inclusas em uma chave dicotômica. Os processos vicariantes entre as bacias costeiras do leste do Brasil podem explicar as relações de parentesco entre as linhagens e espécies deste complexo de espécies. A hipótese de introdução de alguns indivíduos na bacia do Rio doce pode explicar a distância genética igual a 0,0% encontrada entre a linhagem *G. brasiliensis* L1 e os espécimes da localidade-tipo, enquanto a hipótese de hibridização pode explicar os contrastes observados entre a filogenia molecular obtida neste estudo e a filogenia molecular baseada no genoma total que está disponível em relatórios técnicos ainda não publicados. Conclui-se que existem sete linhagens e quatro possíveis espécies ainda não descritas do complexo de espécies *G. brasiliensis* na bacia do Rio Doce, e possivelmente, houve introdução de espécies ou linhagens na bacia, podendo ainda haver algum grau de hibridização entre as linhagens e espécies.

Palavras-chave: Barcoding, Filogeografia, Ictiologia, Neotropical, Taxonomia integrativa

ABSTRACT

ASSIS, Cidimar Estevam de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, april, 2024. **Molecular and morphological studies indicate the presence of seven lineages and four possible species of the *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard 1824) species complex in the Rio Doce basin, southeastern Brazil (Cichliformes: Cichlidae).** Adviser: Amanda Ferreira e Cunha. Co-adviser: Jorge Abdala Dergam

The order Cichliformes is a very diverse taxon that can be found in rivers and oceans in tropical and temperate regions, while the Cichlidae family is the most diverse taxon in this order, and can be found in rivers and oceans in tropical and subtropical regions. The species *Geophagus brasiliensis* is allocated in the Cichlidae family and is considered a species complex composed by eight species that can be found in rivers and lakes in the northeast, southeast and south regions of Brazil. The Rio Doce basin is located in southeastern Brazil, in the states of Minas Gerais and Espírito Santo. Considering that molecular and morphological studies can be applied to identify species, infer about kinship relationships, origin, ancestry and phylogeography, the objective of this research is to associate DNA barcoding patterns and morphology to detect possible lineages and species of the *G. brasiliensis* species complex from the Rio Doce basin. For this, muscle tissue samples were taken from 62 specimens collected in 30 locations in the Rio Doce basin and sent to the Animal Evolution and Genetics Laboratory at the Federal University of Amazonas for extraction, amplification and sequencing of the *COI* mitochondrial gene. Molecular studies included the construction of molecular phylogeny and the calculation of interspecific distances using MEGA 11 software. Twenty-four sequences from topotypes of the eight species of the *G. brasiliensis* species complex was used as comparative material. Morphological studies included 21 meristic characters, 23 morphometric characters and variations in body and fin color patterns. The topology of the molecular phylogeny indicated the presence of seven lineages of the *G. brasiliensis* species complex in the Rio Doce basin with genetic distances that varied between 0.5% and 5.7% between each lineage compared pair by pair, while the genetic distances between the seven lineages and the eight species of the *G. brasiliensis* species complex varied between 0% and 8.3%. Morphological differences were observed between some lineages, as well as differences in the geographic distribution pattern throughout the basin and in kinship relationships with other species in the species complex. Evidence of four possible species of the *G. brasiliensis* species complex was found in the Rio Doce basin, and a dichotomous key was provided. Vicarious processes between the coastal basins of eastern Brazil may explain the kinship relationships between the group's

lineages and species. The hypothesis of introduction of some individuals into the Rio Doce basin can explain the genetic distance equal to 0% found between the lineage *G. brasiliensis* L1 and specimens from the type locality, while the hypothesis of hybridization can explain the contrasts observed between the molecular phylogeny obtained in this study and the molecular phylogeny based on the whole genome and available in technical reports not yet published. It is concluded that there are seven lineages and four possible species of the *G. brasiliensis* species complex in the Rio Doce basin, and possibly, some individuals were introduced into the basin and hybridization may be occurring between the lineages and species.

Keywords: Barcoding, Ichthyology, Integrative taxonomy, Neotropical, Phylogeography

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação gráfica dos 30 pontos amostrais na bacia do Rio Doce.....	16
Figura 2: Representação gráfica das bacias hidrográficas das localidades-tipo das oito espécies do complexo de espécies <i>G. brasiliensis</i> , incluindo a foz do Rio Doce.....	24
Figura 3: Representação esquemática dos caracteres merísticos.....	26
Figura 4: Representação esquemática dos caracteres morfométricos.....	28
Figura 5: Filogenia molecular mostrando as relações de parentesco das sete linhagens do complexo de espécies <i>G. brasiliensis</i> detectadas na bacia do Rio Doce e as oito espécies do complexo de espécies <i>G. brasiliensis</i>	31
Figura 6: Matriz de distâncias genéticas (Kimura-2-parâmetros/K2P) das sete linhagens do complexo de espécies <i>G. brasiliensis</i> detectadas na bacia do Rio Doce e as oito espécies do complexo de espécies <i>G. brasiliensis</i> já descritas.....	33
Figura 7: Representação gráfica das localidades de ocorrência das sete linhagens do complexo de espécies <i>G. brasiliensis</i> detectadas na bacia do Rio Doce.....	35
Figura 8: Esquema em diagrama de Venn mostrando os trechos de ocorrência das sete linhagens do complexo de espécies <i>G. brasiliensis</i> detectadas na bacia do Rio Doce.....	36
Figura 9: Espécime da linhagem <i>G. brasiliensis</i> L1.....	45
Figura 10: Espécime da linhagem <i>G. brasiliensis</i> L2.....	46
Figura 11: Espécime da linhagem <i>G. brasiliensis</i> L3.....	46
Figura 12: Espécime da linhagem <i>G. brasiliensis</i> L4.....	47
Figura 13: Espécime da linhagem <i>G. brasiliensis</i> L5.....	47
Figura 14: Espécime da linhagem <i>G. brasiliensis</i> L6.....	48
Figura 15: Espécime da linhagem <i>G. brasiliensis</i> L7.....	48
Figura 16: Filogenia molecular mostrando as relações de parentesco das linhagens do complexo de espécies <i>G. brasiliensis</i> detectadas na bacia do Rio Doce e as oito espécies do complexo de espécies <i>G. brasiliensis</i> após remoção das amostras das linhagens <i>G. brasiliensis</i> L5 e L7.....	52
Figura 17: Holótipo de <i>Geophagus brasiliensis</i>	53
Figura 18: Desenho esquemático do holótipo de <i>Geophagus brasiliensis</i>	53
Figura 19: Holótipo de <i>Geophagus rufomarginatus</i>	54
Figura 20: Holótipo de <i>Geophagus iporangensis</i>	55
Figura 21: Holótipo de <i>Geophagus santosi</i>	56

Figura 22: Agrupamento hierárquico das amostras de *G. brasiliensis* da bacia do Rio Doce, a partir do sequenciamento de fragmentos de DNA associados a sítios de restrição (RadSeq).....76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Localidades de coleta na bacia do Rio Doce com suas respectivas identificações e as coordenadas geográficas.....	16
Tabela 2: Códigos dos espécimes analisados neste estudo e as informações sobre as localidades de coleta.....	18
Tabela 3: Número de acesso das sequências comparativas obtidas no GenBank e as informações sobre a bacia hidrográfica de cada espécie.....	22
Tabela 4: Informações sobre as literaturas taxonômicas das oito espécies do complexo de espécies <i>G. brasiliensis</i> e das cinco espécies consideradas sinônimas.....	29
Tabela 5: Espécimes agrupados em cada linhagem de <i>G. brasiliensis</i> detectada na bacia do Rio Doce, e os trechos de ocorrência na bacia do Rio Doce.....	32
Tabela 6: Contagens dos caracteres merísticos das sete linhagens do complexo de espécies <i>G. brasiliensis</i> detectadas na bacia do Rio Doce.....	37
Tabela 7: Medidas dos caracteres morfométricos de <i>G. brasiliensis</i> L1.....	38
Tabela 8: Medidas dos caracteres morfométricos de <i>G. brasiliensis</i> L2.....	39
Tabela 9: Medidas dos caracteres morfométricos de <i>G. brasiliensis</i> L3.....	40
Tabela 10: Medidas dos caracteres morfométricos de <i>G. brasiliensis</i> L4.....	41
Tabela 11: Medidas dos caracteres morfométricos de <i>G. brasiliensis</i> L5.....	42
Tabela 12: Medidas dos caracteres morfométricos de <i>G. brasiliensis</i> L6.....	43
Tabela 13: Medidas dos caracteres morfométricos de <i>G. brasiliensis</i> L7.....	44
Tabela 14: Caracteres morfológicos que permitem distinguir as quatro possíveis espécies pertencentes ao complexo de espécies <i>G. brasiliensis</i> na bacia do Rio Doce.....	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1. Área de estudo e localidades de coleta.....	15
3.2. Análises moleculares.....	20
3.2.1. Extração, amplificação, purificação e sequenciamento do DNA.....	20
3.2.2. Alinhamento das sequências.....	21
3.2.3. Filogenia molecular.....	21
3.2.4. Distâncias genéticas.....	22
3.2.5. Sequências comparativas.....	22
3.3. Análises morfológicas.....	24
3.3.1. Caracteres merísticos.....	25
3.3.2. Caracteres morfométricos.....	27
3.3.3. Coloração do corpo e nadadeiras.....	28
3.3.4. Material comparativo.....	29
3.4. Delimitação de possíveis espécies.....	30
4. RESULTADOS.....	30
4.1. Filogenia molecular.....	30
4.2. Distâncias genéticas e relações de parentesco.....	33
4.3. Distribuição geográfica das linhagens.....	34
4.4. Delimitação morfológica.....	36
4.4.1. Caracteres merísticos.....	36
4.4.2. Caracteres morfométricos.....	38
4.4.3. Coloração do corpo e nadadeiras.....	44
4.4.4. Diagnose das sete linhagens detectadas neste estudo.....	48
4.5. Delimitação de quatro possíveis espécies na bacia do Rio Doce.....	51
4.6. Diagnose das quatro possíveis espécies.....	57
4.7. Chave de identificação das quatro possíveis espécies.....	60
5. DISCUSSÃO.....	60
6. CONCLUSÃO.....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
ANEXO A.....	76

1. INTRODUÇÃO

A ordem Cichliformes é um táxon de peixes muito diversificado, possuindo 2.591 espécies válidas, que estão distribuídas em 10 famílias e 351 gêneros (Fricke et al., 2024). Os peixes dessa ordem possuem distribuição geográfica mundial, podendo ser encontrados em todos os rios e oceanos nas regiões tropicais e temperadas (Fricke et al., 2024). Alocada nesta ordem, temos a família Cichlidae, um táxon de peixes que habitam ambientes dulcícolas e marinhos nas regiões tropicais e subtropicais das Américas, África e Ásia (Silvano, 2020; Fricke et al., 2024). Essa família de peixes possui 1.755 espécies válidas que estão distribuídas em 256 gêneros, sendo, portanto, a família mais diversa dentro da ordem Cichliformes (Fricke et al., 2024). A alta diversificação e a ampla distribuição geográfica dessa família de peixes pode ser explicada como resultado de uma longa história evolutiva e biogeográfica, que envolveu a separação dos continentes durante a era mesozoica e as mudanças geomorfológicas nas bacias hidrográficas da região Neotropical, principalmente durante os processos de orogênese da Cordilheira dos Andes e dos Escudos Brasileiros e das Guianas (Ribeiro, 2006; Albert et al., 2011; Reis et al., 2016; Albert et al., 2018).

A bacia do Rio Doce faz parte das drenagens costeiras do Atlântico Sudeste, estando localizada nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo (Vieira, 2009). Esta bacia hidrográfica possui uma área com aproximadamente 83.431 km² e é dividida em três subdivisões, o Alto Rio Doce, que compreende as drenagens e afluentes localizados à montante da foz do Rio Matipó, o Médio Rio Doce, que compreende as drenagens e afluentes localizados entre a foz do Rio Matipó e a divisa dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, e o Baixo Rio Doce, que compreende as drenagens e afluentes localizados entre a divisa dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo e a foz no Oceano Atlântico (Vieira, 2009; PIRH, 2010). Uma característica peculiar desta bacia é a presença de vários lagos, localizados em dois sistemas lacustres, os lagos do Médio e do Baixo Rio Doce (Godinho et al., 1996; Sarmiento-Soares et al., 2022). Existem evidências de que esses lagos foram formados durante o quaternário, após vários eventos de sedimentação e erosão ao longo do canal principal do Rio Doce e terras adjacentes (Pflug, 1968; Hatushika et al., 2007; Barroso et al., 2014).

A espécie *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard 1824), conhecida popularmente como Acará-papa-terra, está alocada na família Cichlidae (subfamília Cichlinae) e é considerada um complexo de espécies com distribuição geográfica muito ampla, podendo ser encontrada em rios e lagos nas regiões nordeste, sudeste e sul do Brasil (Vieira et al., 2015; Argolo et al., 2020; Fricke et al., 2024). Esta espécie foi descrita em 1824, a partir do

material-tipo coletado na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil durante a expedição de Louis Claude de Saulces de Freycinet ao Rio de Janeiro, entre os anos de 1817 a 1820 (Quoy & Gaimard, 1824; Gosse, 1975). As características morfológicas que permitem reconhecer esse complexo de espécies é a combinação dos seguintes caracteres morfológicos: lóbulo carnoso no ramo superior do primeiro arco branquial; ausência de espinho pequeno e pontiagudo na ponta do primeiro pterigióforo da nadadeira dorsal; faixa escurecida e transversal na cabeça, passando pela região dos olhos; menos de 30 escamas na série longitudinal e mediana do corpo; e manchas azuladas e iridescentes na cabeça e nas escamas do corpo (Gosse, 1975; Mattos & Costa, 2018).

Atualmente, este complexo de espécies é representado por oito espécies válidas: *G. brasiliensis* (Quoy & Gaimard 1824) stricto sensu, *G. obscurus* (Castelnau 1855), *G. iporangensis* Haseman 1911, *G. itapicuruensis* Haseman 1911, *G. diamantinensis* Mattos, Costa & Santos 2015, *G. multiocellus* Mattos & Costa 2018, *G. rufomarginatus* Mattos & Costa 2018 e *G. santosi* Mattos & Costa 2018 (Mattos & Costa, 2018; Argolo et al., 2020). Dentre as oito espécies citadas anteriormente, quatro foram descritas entre 2015 e 2018, quase 40 anos após a última revisão taxonômica do gênero *Geophagus* (Gosse, 1975; Mattos et al., 2015; Mattos & Costa, 2018). Considerando a ampla distribuição desta espécie, existe a possibilidade de existir outras espécies deste complexo de espécies, mas que ainda não foram formalmente descritas (Argolo et al., 2020).

O estudo de Alves-Silva & Dergam (2014) mostrou inconsistências na variação cariotípica e a existência de dois haplogrupos deste complexo de espécies na bacia do Rio Doce, entretanto o material usado neste estudo é proveniente somente de alguns lagos e afluentes do Alto e Médio Rio Doce e, portanto, não há clareza sobre a atual distribuição geográfica desses haplogrupos ao longo de toda a bacia do Rio Doce, por exemplo, nos afluentes e lagos do Baixo Rio Doce. Além disso, como o material comparativo usado no estudo de Alves-Silva & Dergam (2014) não inclui amostras provenientes das localidades-tipo das oito espécies citadas anteriormente, neste caso, ainda existem dúvidas sobre esses haplogrupos serem ou não representados por duas possíveis espécies não descritas. Já o estudo publicado por Argolo et al. (2020) incluiu uma hipótese filogenética baseada em filogenia molecular e morfometria geométrica, mostrando que existem duas espécies deste complexo de espécies na bacia do Rio Doce, sendo uma delas já descrita (*G. rufomarginatus*) e a outra não descrita formalmente (*Geophagus* sp. “Doce”). Entretanto, o estudo morfológico (morfometria geométrica) publicado por Argolo et al. (2020) foi pouco abrangente, uma vez que os principais caracteres morfológicos usados para diagnosticar as

espécies deste complexo de espécies são baseados em variações nas contagens de caracteres merísticos, nas medidas de caracteres morfométricos tradicionais e nos padrões de coloração do corpo e nadadeiras (Gosse, 1975; Mattos et al., 2015; Mattos & Costa, 2018); estes caracteres não foram analisados por Argolo e colaboradores.

Os estudos moleculares e morfológicos são ferramentas muito úteis para identificar várias espécies de animais, uma vez que estes estudos permitem inferir sobre as relações de parentesco, origem e ancestralidade das espécies, que são as abordagens mais usadas para propor hipóteses filogenéticas e evolutivas (Davis & Nixon, 1992; Hebert et al., 2003a; Dayrat, 2005; Ward, 2009; Oliveira et al., 2013; Tresbach et al., 2015; Wendt et al., 2019). O sequenciamento de genes mitocondriais é a ferramenta mais usada para comparar e delimitar populações de várias espécies de peixes (DNA barcoding), de fato, vários estudos taxonômicos publicados atualmente são baseados em filogenias moleculares construídas a partir do sequenciamento dos genes mitocondriais *COI* e *CytB* (Hebert et al., 2003b; Ward, 2009; Carvalho et al., 2011a; 2011b; Feitosa et al., 2018; Dutra et al., 2022; Reis & De Pinna, 2022).

2. OBJETIVOS

O objetivo desta pesquisa é contribuir com a ampliação do conhecimento sobre as espécies do complexo *G. brasiliensis* na bacia do Rio Doce, associando os padrões de DNA barcoding (filogenia molecular baseada no sequenciamento do gene mitocondrial *COI*) e morfologia (combinações de caracteres morfológicos para diagnosticar espécies) para detectar possíveis linhagens e espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Área de estudo e localidades de coleta

Os espécimes analisados neste estudo foram coletados em 30 localidades na bacia do Rio Doce, incluindo afluentes e lagos nos trechos do Alto, Médio e Baixo Rio Doce (**Figura 1**). A representação gráfica das 30 localidades de coleta foi construída no software Google Earth Pro versão 7.3.6.9345.

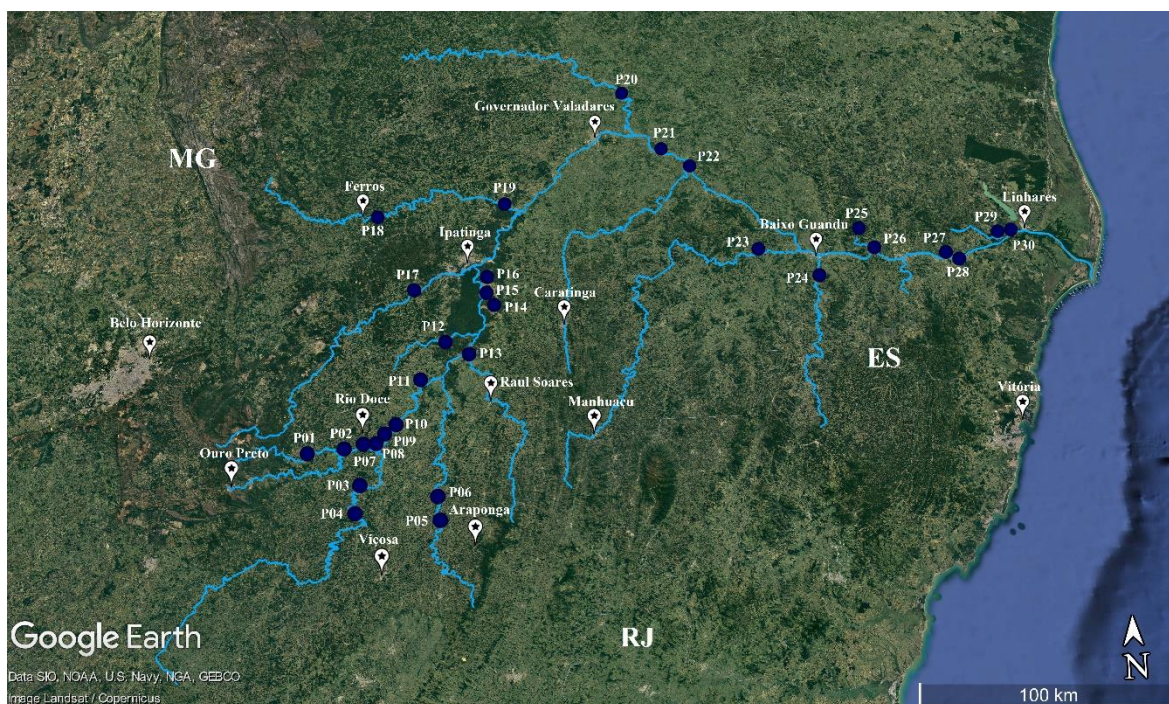


Figura 1: Representação gráfica dos 30 pontos amostrais na bacia do Rio Doce. P01 a P11: Alto Rio Doce; P12 a P22: Médio Rio Doce; P23 a P30: Baixo Rio Doce.

A relação dos 30 pontos amostrais e suas respectivas localizações geográficas estão listados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Localidades de coleta na bacia do Rio Doce com suas respectivas identificações e as coordenadas geográficas.

Numeração pontual	Localidade de coleta	Município/Estado	Trecho da bacia	Latitude	Longitude
P01	Rio Gualaxo do Norte	Mariana/MG	Alto	-20.296145	-43.197023
P02	Rio do Carmo	Barra Longa/MG	Alto	-20.285137	-43.048701
P03	Rio Piranga	Ponte Nova/MG	Alto	-20.433483	-42.979059
P04	Rio Piranga	Guaraciaba/MG	Alto	-20.540663	-42.994019
P05	Rio Casca	Pedra do Anta/MG	Alto	-20.583591	-42.656811
P06	Rio Casca	Jequeri/MG	Alto	-20.492717	-42.667664
P07	Rio do Carmo	Rio Doce/MG	Alto	-20.272882	-42.958718
P08	Início do Rio Doce	Rio Doce/MG	Alto	-20.271131	-42.919948

P09	UHE Risoleta Neves	Rio Doce/MG	Alto	-20.220098	-42.881756
P10	Rio Doce	Rio Doce/MG	Alto	-20.204597	-42.845521
P11	Rio Doce	São José do Goiabal/MG	Alto	-20.016760	-42.743936
P12	Lagoa Aguapé	Dionísio/MG	Médio	-19.858796	-42.642185
P13	Rio Matipó	Raul Soares/MG	Médio	-19.917002	-42.542258
P14	Lagoa Hortência	Pingo D'Água/MG	Médio	-19.702745	-42.435240
P15	Lagoa Linguíça	Pingo D'Água/MG	Médio	-19.613624	-42.469110
P16	Lagoa Cristal	Pingo D'Água/MG	Médio	-19.572090	-42.464249
P17	Rio Piracicaba	Jaguaraçu/MG	Médio	-19.616903	-42.779323
P18	Rio Santo Antônio	Ferros/MG	Médio	-19.255885	-42.950156
P19	Rio Santo Antônio	Naque/MG	Médio	-19.221627	-42.382798
P20	Rio Suaçuí Grande	Frei Inocência/MG	Médio	-18.653137	-41.820208
P21	Rio Doce	Tumiritinga/MG	Médio	-18.967411	-41.658009
P22	Rio Caratinga	Conselheiro Pena/MG	Médio	-19.063036	-41.534877
P23	Rio Manhuaçu	Aimorés/MG	Baixo	-19.491379	-41.188091
P24	Rio Guandu	Baixo Guandu/ES	Baixo	-19.625000	-41.018539
P25	Ribeirão São Pedro Frio	Colatina/ES	Baixo	-19.404324	-40.809718
P26	Rio Doce	Colatina/ES	Baixo	-19.499757	-40.756144
P27	Lagoa do Óleo	Marilândia/ES	Baixo	-19.530547	-40.441548
P28	Lagoa do Limão	Colatina/ES	Baixo	-19.563444	-40.388565
P29	Lagoa das Palmas	Linhares/ES	Baixo	-19.434064	-40.187754
P30	Rio Doce	Linhares/ES	Baixo	-19.455293	-40.183431

Sessenta e dois espécimes foram analisados neste estudo, e os vouchers estão depositados na coleção ictiológica do Museu de Zoologia João Moojen (MZUFV) e no banco de tecidos do Laboratório de Sistemática Molecular (Beagle), da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil (**Tabela 2**).

Tabela 2: Códigos dos espécimes analisados neste estudo e as informações sobre as localidades de coleta.

Código dos espécimes	Número dos lotes	Numeração pontual	Localidade de coleta	Município/Estado	Trecho da bacia
FF0323; FF0325	MZUFV7347	P01	Rio Gualaxo do Norte	Mariana/MG	Alto
CT5304; FB1244; FB1245; FB1246; FB1249; FB1254; FF0097	MZUFV5010; MZUFV7262 MZUFV8290	P02	Rio do Carmo	Barra Longa/MG	Alto
FB1006; FF1169; FF1170; FF1203; FF1204	MZUFV7654; MZUFV8216	P03	Rio Piranga	Ponte Nova/MG	Alto
FA0340; FA0342; FA0352; FF0078	MZUFV7253; MZUFV8331	P04	Rio Piranga	Guaraciaba/MG	Alto
JD3574	MZUFV3385	P05	Rio Casca	Pedra do Anta/MG	Alto
FB0939; FB0946	MZUFV8197	P06	Rio Casca	Jequeri/MG	Alto
FB0904; FF1150; FF1159	MZUFV7638; MZUFV8186	P07	Rio do Carmo	Rio Doce/MG	Alto
FF0029; FF0040; FF0301	MZUFV7241; MZUFV7339	P08	Início do Rio Doce	Rio Doce/MG	Alto
CT2720; FA0034; FA0038; FF1136	MZUFV4084; MZUFV7629; MZUFV7727	P09	UHE Risoleta Neves	Rio Doce/MG	Alto
FF0093	MZUFV7260	P10	Rio Doce	Rio Doce/MG	Alto
FA0390	MZUFV8346	P11	Rio Doce	São José do Goiabal/MG	Alto
CT2506	MZUFV3978	P12	Lagoa Aguapé	Dionísio/MG	Médio
FA0704; FA0705	MZUFV8446	P13	Rio Matipó	Raul Soares/MG	Médio

CT1200	MZUFV3825	P14	Lagoa Hortência	Pingo D'Água/MG	Médio
CT1994	MZUFV3757	P15	Lagoa Linguíça	Bom Jesus do Galho/MG	Médio
CT1284	MZUFV3665	P16	Lagoa Cristal	Pingo D'Água/MG	Médio
FF0120	MZUFV7275	P17	Rio Piracicaba	Jaguaraçu/MG	Médio
CT1776; CT2847	MZUFV3816; MZUFV4013	P18	Rio Santo Antônio	Ferros/MG	Médio
FF0172	MZUFV7287	P19	Rio Santo Antônio	Naque/MG	Médio
FB1139; FB1140	MZUFV8266	P20	Rio Suaçuí Grande	Frei Inocência/MG	Médio
FF1300; FF1330	MZUFV7684	P21	Rio Doce	Tumiritinga/MG	Médio
FF1344; FF1369	MZUFV7696	P22	Rio Caratinga	Conselheiro Pena/MG	Médio
FB0101; FF0674; JD35871	MZUFV7470; MZUFV7861; MZUFV11611	P23	Rio Manhuaçu	Aimorés/MG	Baixo
FB0176; FF1054	MZUFV7599; MZUFV7881	P24	Rio Guandu	Baixo Guandu/ES	Baixo
JD21442	MZUFV8693	P25	Ribeirão São Pedro Frio	Colatina/ES	Baixo
JD6302	MZUFV5198	P26	Rio Doce	Colatina/ES	Baixo
JD8944; JD10471	MZUFV5501; MZUFV5805	P27	Lagoa do Óleo	Marilândia/ES	Baixo
JD13070	MZUFV6036	P28	Lagoa do Limão	Colatina/ES	Baixo
JD21313	MZUFV8706	P29	Lagoa das Palmas	Linhares/ES	Baixo
JD6749; JD14143	MZUFV5185; MZUFV6240	P30	Rio Doce	Linhares/ES	Baixo

Obs: Os espécimes com códigos CT1284 (KP218747.1), CT1776 (KP218749.1), CT2720 (KP218751.1), CT1994 (KP218746.1), CT2506 (KP218743.1) e CT2847 (KP218750.1) estão publicados no estudo de Alves-Silva & Dergam (2014), foram usados como material comparativo no estudo de Argolo et al. (2020) e estão incluídos neste estudo para aumentar o número de amostras da bacia. As sequências do gene mitocondrial *COI* desses espécimes foram obtidas no banco de dados públicos GenBank e o número de acesso na plataforma está entre parênteses.

3.2. Análises moleculares

Amostras de tecido muscular, provenientes dos espécimes listados na tabela 2 (exceto os espécimes CT1284, CT1776, CT2720, CT1994, CT2506 e CT2847), foram enviadas para extração, amplificação, purificação e sequenciamento do gene mitocondrial *COI*. Os fragmentos de tecido muscular estavam armazenados em microtubos contendo álcool 100% e guardados nos freezers (em temperatura inferior à -20°C) da coleção ictiológica da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Já as sequências do gene mitocondrial *COI* provenientes dos espécimes CT1284, CT1776, CT2720, CT1994, CT2506 e CT2847 foram obtidas no banco de dados públicos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), e seus números de acesso na plataforma são KP218747.1, KP218749.1, KP218751.1, KP218746.1, KP218743.1 e KP218750.1, respectivamente.

3.2.1. Extração, amplificação, purificação e sequenciamento do DNA

As atividades de extração, amplificação, purificação e sequenciamento do gene mitocondrial *COI* foram feitas no Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL), da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas e no Laboratório de Sistemática Molecular Beagle, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais. O DNA genômico foi extraído seguindo o protocolo CTAB 2% (brometo de cetiltrimetilamônio) (Doyle & Doyle, 1987; Marengoni et al., 2006). Para a amplificação do gene mitocondrial *COI*, dois conjuntos de primers foram usados, sendo esses dois conjuntos desenvolvidos no âmbito desse projeto para sequenciamento na plataforma Ion Torrent. Cada conjunto de primer (forward e reverse) foi amplificado para cada indivíduo de cada espécie separadamente. Em seguida, os produtos das amplificações foram misturados formando um pool para cada indivíduo. Esses pools foram purificados usando o método de purificação com beads magnéticos, a fim de eliminar os fragmentos pequenos e restos de reagentes que podem consumir os adaptadores na etapa seguinte. Após a purificação dos pools, foi feita a ligação dos adaptadores contendo as sequências identificadoras de cada indivíduo. Em cada uma das extremidades dos fragmentos foram ligados dois tipos de adaptadores, o adaptador A e o adaptador P, respectivamente. Assim, cada indivíduo recebeu uma combinação única de sequências identificadoras.

Após a ligação dos adaptadores, os pools por indivíduo foram purificados novamente e misturados de forma equimolar para a formação das bibliotecas genômicas. As bibliotecas então foram cortadas no Pippin Prep (Sage Science), a fim de selecionar somente os

fragmentos com tamanho ideal para processamento no sequenciador de Nova Geração (Next Generation Sequencing – NGS) ION TORRENT PGM. A biblioteca cortada e purificada foi inserida no chip ION PGM 318 (Life Technologies™), com capacidade de geração de aproximadamente 10 milhões de leituras únicas (reads).

3.2.2. Alinhamento das sequências

As sequências foram alinhadas no software MEGA 11 versão 11.0.13 (Tamura et al., 2021), usando o alinhamento de pares de bases, seguido pelo alinhamento múltiplo das sequências sob o método Clustal W (Thompson et al., 1994; Chenna et al., 2003). Por ser um gene codificante, logo após o alinhamento, as sequências foram traduzidas em sequências de aminoácidos para verificar se as sequências de pares de bases foram alinhadas corretamente, ou seja, verificar a ausência de códons de parada ou ausência de algum nucleotídeo específico (Ranwez et al., 2011). Após o alinhamento múltiplo das sequências, algumas colunas de nucleotídeos foram inteiramente deletadas nas duas extremidades do alinhamento, para que todas as sequências tivessem comprimentos iguais ao comprimento da menor sequência.

3.2.3. Filogenia molecular

A filogenia molecular foi construída no software MEGA 11 versão 11.0.13 (Tamura et al., 2021), a partir do método de Agrupamento de Vizinhos/Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), usando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros/K2P (Kimura, 1980). Foi usado o teste de bootstrap (Efron, 1987) em 10.000 réplicas, para medir o nível de suporte estatístico das topologias geradas. De maneira geral, os níveis de suporte maiores que 70% são considerados significativos (Hillis & Bull, 1993), entretanto, os ramos mais posteriores com níveis de suporte maiores ou iguais a 95% podem ser considerados ainda mais significativos quando pretendemos nomear esses ramos como linhagens ou espécies (Felsenstein, 1985; Alfaro & Holder, 2006), embora os níveis de suporte maiores que 63% não geram resultados falsos-positivos (Suzuki et al., 2002). Os agrupamentos monofiléticos mais posteriores determinados na filogenia molecular com níveis de suporte maiores ou iguais a 90% foram considerados como “linhagens” do complexo de espécies *G. brasiliensis*. A representação gráfica das localidades de ocorrência das linhagens do complexo de espécies *G. brasiliensis* detectadas na bacia do Rio Doce foi construída no software Google Earth Pro versão 7.3.6.9345.

3.2.4. Distâncias genéticas

As distâncias genéticas entre as linhagens determinadas na filogenia molecular foram calculadas no software MEGA 11 versão 11.0.13 (Tamura et al., 2021), usando o modelo evolutivo Kimura-2-Parâmetros/K2P (Kimura, 1980). A probabilidade de coespecificidade é muito baixa em peixes quando os valores de distância genética são superiores a 2% (Ward, 2009). Portanto, os valores de distância genética maiores que 2% (ou muito próximos a esse valor) foram considerados como “ponto de corte” para delimitar as possíveis espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis*.

3.2.5. Sequências comparativas

Vinte e seis sequências do gene mitocondrial *COI* foram usadas como sequências comparativas neste estudo. Essas sequências foram obtidas no banco de dados públicos: GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Dentre essas sequências, 24 são provenientes de amostras extraídas de espécimes coletados nas localidades-tipo (topótipos) das oito espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis*. Para confirmar a veracidade das localidades de coleta desses espécimes e suas respectivas sequências do gene mitocondrial *COI*, os códigos dessas sequências foram acessados na tabela 1 de Mattos & Costa (2018). Já as outras duas sequências são de duas espécies da Subfamília Cichlinae (*Geophagus megasema* e *Satanoperca pappaterra*) que foram usadas como grupo externo para enraizamento da filogenia molecular (**Tabela 3** e **Figura 2**). A representação gráfica das bacias hidrográficas das localidades-tipo das oito espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis* foi construída no software Google Earth Pro versão 7.3.6.9345.

Tabela 3: Número de acesso das sequências comparativas obtidas no GenBank e as informações sobre a bacia hidrográfica de cada espécie.

Número de acesso no GenBank	Espécie	Bacia hidrográfica de origem	Estado
MH538060	<i>G. brasiliensis</i>	Baía de Guanabara	Rio de Janeiro
MH538062	<i>G. brasiliensis</i>	Baía de Guanabara	Rio de Janeiro
MH538063	<i>G. brasiliensis</i>	Baía de Guanabara	Rio de Janeiro
MN295884	<i>G. diamantinensis</i>	Rio Paraguaçu	Bahia
MN295885	<i>G. diamantinensis</i>	Rio Paraguaçu	Bahia

MN295886	<i>G. diamantinensis</i>	Rio Paraguaçu	Bahia
MH538065	<i>G. iporangensis</i>	Ribeira do Iguape	São Paulo
MH538066	<i>G. iporangensis</i>	Ribeira do Iguape	São Paulo
MH538067	<i>G. iporangensis</i>	Ribeira do Iguape	São Paulo
MH538074	<i>G. itapicuruensis</i>	Rio Itapicuru	Bahia
MH538075	<i>G. itapicuruensis</i>	Rio Itapicuru	Bahia
MH538076	<i>G. itapicuruensis</i>	Rio Itapicuru	Bahia
MH538078	<i>G. multiocellus</i>	Rio de Contas	Bahia
MH538079	<i>G. multiocellus</i>	Rio de Contas	Bahia
MH538080	<i>G. multiocellus</i>	Rio de Contas	Bahia
MN295881	<i>G. obscurus</i>	Rio Paraguaçu	Bahia
MN295882	<i>G. obscurus</i>	Rio Paraguaçu	Bahia
MN295883	<i>G. obscurus</i>	Rio Paraguaçu	Bahia
MH538069	<i>G. rufomarginatus</i>	Rio Buranhém	Bahia
MH538070	<i>G. rufomarginatus</i>	Rio Buranhém	Bahia
MH538071	<i>G. rufomarginatus</i>	Rio Buranhém	Bahia
MH538081	<i>G. santosi</i>	Rio Mariana	Bahia
MH538082	<i>G. santosi</i>	Rio Mariana	Bahia
MH538083	<i>G. santosi</i>	Rio Mariana	Bahia
MZ504389	<i>G. megasema</i>	Rio Guaporé	Mato Grosso
JN989214	<i>S. pappaterra</i>	Rio Guaporé	Mato Grosso

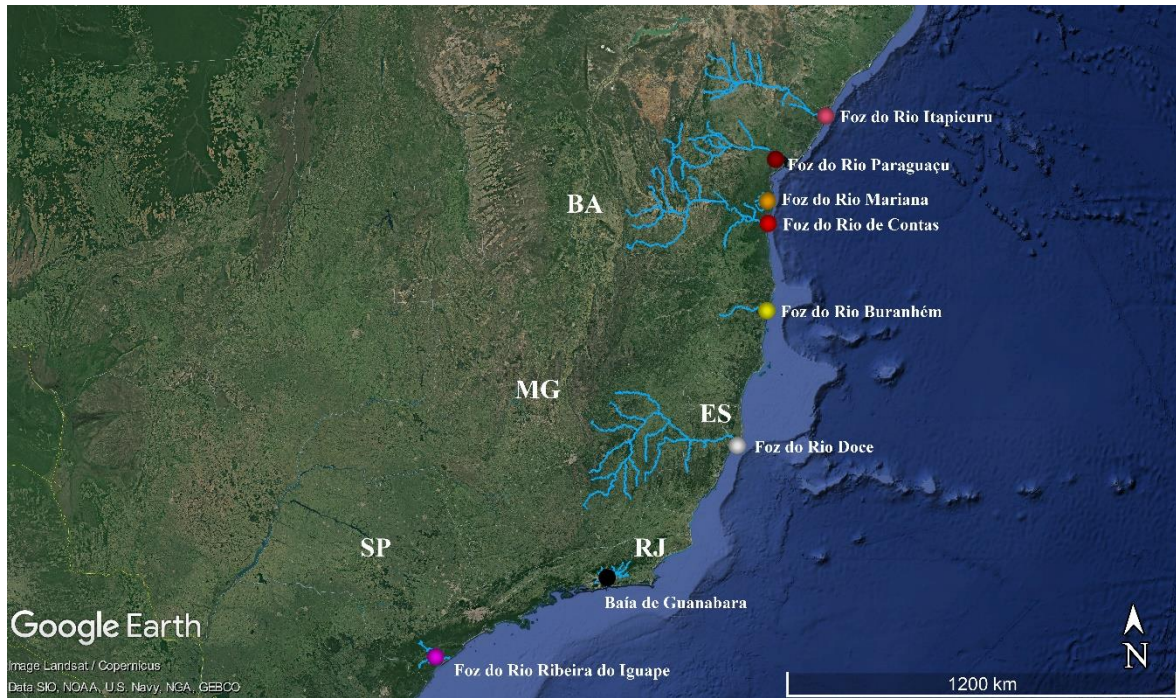


Figura 2: Representação gráfica das bacias hidrográficas das localidades-tipo das oito espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis*, incluindo a foz do Rio Doce (ponto branco) e a Baía de Guanabara (ponto preto), a localidade-tipo de *G. brasiliensis*.

3.3. Análises morfológicas

Os indivíduos de cada linhagem determinada na filogenia molecular foram comparados morfológicamente. As comparações morfológicas incluíram 21 caracteres merísticos, 23 caracteres morfométricos e variações nos padrões de coloração do corpo e nadadeiras, seguindo as metodologias propostas por Gosse (1975), Kullander (1986) e Mattos & Costa (2018). Os caracteres merísticos foram obtidos após a contagem dos caracteres com auxílio de microscópio estereoscópico (lupa). Os caracteres morfométricos foram obtidos com auxílio de paquímetro digital no lado esquerdo dos espécimes. As variações nos padrões de coloração do corpo e nadadeiras foram observadas em espécimes armazenados em solução de álcool 70% após a fixação em solução de formalina 10%, e também em espécimes *in-vivo* que fotografados antes da fixação na solução de formalina. Os indivíduos machos tendem a ser maiores e mais robustos que as fêmeas (Gubiani et al., 2009) e essa peculiaridade poderia influenciar nas comparações entre as medidas dos caracteres morfométricos. Portanto, os espécimes analisados neste estudo incluem indivíduos machos e fêmeas para amenizar os efeitos do dimorfismo sexual, e além disso, foram incluídas várias classes de tamanho para amenizar possíveis efeitos de alometria.

3.3.1. Caracteres merísticos

Foram avaliados os seguintes caracteres merísticos: **(1) escamas no ramo superior da linha lateral (ELS)**: número de escamas perfuradas no ramo superior e anterior da linha lateral; **(2) escamas no ramo inferior da linha lateral (ELI)**: número de escamas perfuradas no ramo inferior e posterior da linha lateral; **(3) escamas na série longitudinal E1 (LE1)**: número de escamas perfuradas na série longitudinal e mediana do corpo logo acima do ramo inferior da linha lateral; **(4) escamas na série longitudinal E0 (LE0)**: número de escamas perfuradas na série longitudinal e mediana do corpo que está no mesmo nível do ramo inferior da linha lateral (ou seja, é a continuação da série de escamas do ramo inferior da linha lateral em direção à cabeça dos espécimes); **(5) escamas na série longitudinal E2 (LE2)**: número de escamas perfuradas na série longitudinal e mediana do corpo logo abaixo do ramo inferior da linha lateral. As nomenclaturas **séries longitudinais E1, E0 e E2** são padronizações para peixes da família Cichlidae que possuem a linha lateral dividida em dois ramos; **(6) escamas acima do ramo superior da linha lateral (EAS)**: número de séries longitudinais de escamas entre o ramo superior da linha lateral e a origem do primeiro raio espinhoso da nadadeira dorsal; **(7) escamas abaixo do ramo inferior da linha lateral (EAI)**: número de séries longitudinais de escamas entre o ramo inferior da linha lateral e a origem do primeiro raio espinhoso da nadadeira anal; **(8) escamas no pré-opérculo (EPO)**: número de séries transversais de escamas no pré-opérculo; **(9) escamas circundando o pedúnculo caudal (EPC)**: número de séries longitudinais de escamas ao redor da região mais baixa do pedúnculo caudal; **(10) escamas pré-dorsais (EPD)**: número de escamas na série longitudinal e mediana da região pré-dorsal do corpo, entre a extremidade posterior do osso supra-occipital e a origem do primeiro raio da nadadeira dorsal; **(11) escamas entre os ramos superior e inferior da linha lateral (ELL)**: número de séries longitudinais de escamas entre a extremidade posterior do ramo superior da linha lateral e a extremidade anterior do ramo inferior da linha lateral; **(12) raios na nadadeira dorsal (RDO)**: número de elementos ósseos que compõem a nadadeira dorsal externamente (inclui os raios espinhosos e moles); **(13) raios na nadadeira peitoral (RPE)**: número de elementos ósseos que compõem a nadadeira peitoral externamente; **(14) raios na nadadeira pélvica (RPV)**: número de elementos ósseos que compõem a nadadeira pélvica externamente (inclui os raios espinhosos e moles); **(15) raios na nadadeira anal (RAN)**: número de elementos ósseos que compõem a nadadeira anal externamente; **(16) raios na nadadeira caudal (RCA)**: número de elementos ósseos que compõem a nadadeira caudal externamente; **(17) raios branquiostegais (RBQ)**: número de elementos ósseos que compõe

cada ramo da membrana branquial externamente, na região ventral da cabeça; **(18) rastros branquiais no ramo superior do primeiro arco branquial (RBS)**: número de rastros branquiais no ramo superior do primeiro arco branquial; **(19) rastros branquiais no ramo inferior do primeiro arco branquial (RBI)**: número de rastros branquiais no ramo inferior do primeiro arco branquial; **(20) dentículos nos rastros branquiais (DRB)**: presença ou ausência de dentículos nos primeiros rastros do ramo superior do primeiro arco branquial. Como os espécies analisados neste estudo possuem raios espinhosos e raios moles nas nadadeiras dorsal, pélvica e anal, logo, o número de raios espinhosos dessas nadadeiras foi indicado com algarismos romanos em caixa alta; **(21) posição da boca (PBO)**: a boca foi considerada isognata (ISO) quando as extremidades anteriores das mandíbulas superior e inferior estavam na mesma linha vertical; a boca foi considerada anisognata (ANI) quando a extremidade anterior da mandíbula superior estava deslocada mais anteriormente em relação à extremidade anterior da mandíbula inferior; a boca foi considerada prognata (PRO) quando a extremidade anterior da mandíbula inferior estava deslocada mais anteriormente em relação a extremidade anterior da mandíbula superior. A **Figura 3** mostra a representação esquemática dos caracteres merísticos analisados neste estudo.

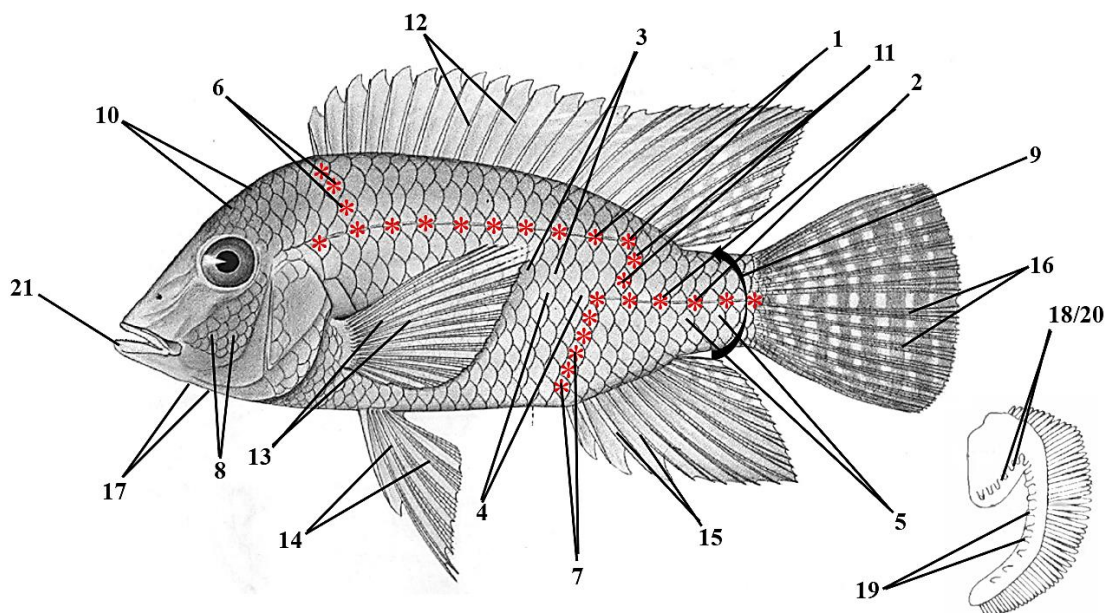


Figura 3: Representação esquemática mostrando os caracteres merísticos analisados neste estudo. Os números de 1 a 21 representam a numeração dos caracteres merísticos citados na seção 3.3.1. Modificado de Gosse (1975) e Britski et al. (1988).

3.3.2. Caracteres morfométricos

Foram avaliadas os seguintes caracteres morfométricos: **(1) comprimento padrão do corpo (CP)**: medido horizontalmente entre a extremidade anterior do focinho e a região mediana da base da nadadeira caudal; **(2) altura do corpo (ACO)**: medida verticalmente entre a origem do primeiro raio espinhoso da nadadeira dorsal e a região inferior do corpo; **(3) comprimento pré-dorsal (CPD)**: medido entre a extremidade anterior do focinho e a origem do primeiro raio espinhoso da nadadeira dorsal; **(4) comprimento da base da nadadeira dorsal (CBD)**: medido entre a origem do primeiro raio espinhoso da nadadeira dorsal e a origem do último raio mole da nadadeira dorsal; **(5) comprimento do último raio espinhoso da nadadeira dorsal (CED)**: medido entre a origem e a ponta do último raio espinhoso da nadadeira dorsal; **(6) comprimento pré-pélvico (CPP)**: medido entre a extremidade anterior do focinho e a origem do raio espinhoso da nadadeira pélvica; **(7) comprimento da nadadeira pélvica (CPV)**: medido entre a origem do raio espinhoso da nadadeira pélvica e a ponta do raio mais longo da nadadeira pélvica; **(8) comprimento do raio espinhoso da nadadeira pélvica (CEP)**: medido entre a origem e a ponta do raio espinhoso da nadadeira pélvica; **(9) comprimento da nadadeira peitoral (CPE)**: medido entre a origem do primeiro raio da peitoral e a ponta do raio mais longo da nadadeira peitoral; **(10) comprimento da base da nadadeira anal (CBA)**: medido entre a origem do primeiro raio espinhoso da nadadeira anal e a origem do último raio mole da nadadeira anal; **(11) comprimento da nadadeira anal (CAN)**: medido entre a origem do primeiro raio espinhoso da nadadeira anal e a ponta do raio mais longo da nadadeira anal; **(12) comprimento do último raio espinhoso da nadadeira anal (CEA)**: medido entre a origem e a ponta do último raio espinhoso da nadadeira anal; **(13) comprimento do pedúnculo caudal (CPC)**: medido entre a origem do último raio mole da nadadeira anal e a origem do primeiro raio mais inferior da nadadeira caudal; **(14) altura do pedúnculo caudal (APC)**: medida verticalmente entre as margens superior e inferior do pedúnculo caudal, passando pela região mediana do pedúnculo caudal; **(15) comprimento da cabeça (CC)**: medido entre a extremidade anterior do focinho e a margem posterior do opérculo, passando pela região mediana do opérculo; **(16) altura da cabeça (ACA)**: medida verticalmente entre as margens superior e inferior da cabeça, passando pela margem orbital posterior; **(17) largura da cabeça (LCA)**: medida lateralmente entre as margens posteriores dos pré-opérculos direito e esquerdo, passando pela região mediana da cabeça; **(18) diâmetro orbital horizontal (DOR)**: medido horizontalmente entre as margens orbital anterior e posterior, passando pela região mediana dos olhos; **(19) distância inter-orbital (DIT)**: medida transversalmente

entre as margens superiores das órbitas direita e esquerda; **(20) altura infra-orbital (AIF)**: medida verticalmente entre a margem orbital inferior e a margem ventral da cabeça; **(21) comprimento do focinho (CFO)**: medido entre a extremidade anterior do focinho e a margem orbital anterior; **(22) comprimento da mandíbula superior (CMS)**: medido entre a extremidade da mandíbula superior e o ponto de articulação das mandíbulas superior e inferior; **(23) comprimento da mandíbula inferior (CMI)**: medido entre a extremidade da mandíbula inferior e o ponto de articulação das mandíbulas superior e inferior. As medidas do corpo e das nadadeiras (caracteres 2 ao 15) foram apresentadas como percentuais do comprimento padrão, enquanto as medidas da cabeça (caracteres 16 ao 23) foram apresentadas como percentuais do comprimento da cabeça, exceto o comprimento da cabeça que foi apresentado como percentual do comprimento padrão. A **Figura 4** mostra a representação esquemática dos caracteres morfométricos analisados neste estudo.

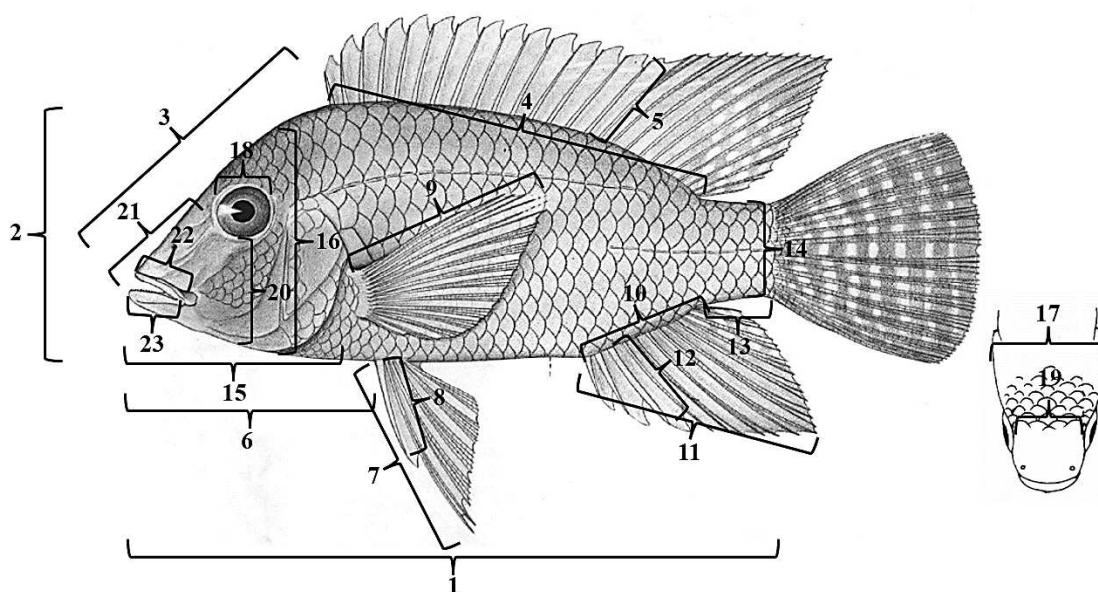


Figura 4: Representação esquemática mostrando os caracteres morfométricos analisados neste estudo. Os números de 1 a 23 representam a numeração dos caracteres morfométricos citados na Seção 3.3.2. Modificado de Gosse (1975) e Britski et al. (1988).

3.3.3. Coloração do corpo e nadadeiras

As variações no padrão de coloração do corpo e nadadeiras, que incluem a presença ou ausência de manchas, o formato, o arranjo e a intensidade de coloração das manchas, foram observados em espécimes fixados em solução de formalina 10% e que estavam armazenados em solução de álcool 70% durante alguns meses ou após anos na coleção

ictiológica. Alguns espécimes foram observados em coloração *in vivo*, pois os mesmos foram fotografados em campo, momentos antes da fixação em solução de formalina 10%. Os espécimes foram fotografados usando uma câmera Nikon CoolPix W300.

3.3.4. Material comparativo

Os caracteres morfológicos dos espécimes analisados neste estudo foram comparados com caracteres morfológicos das oito espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis* descritas em estudos taxonômicos publicados anteriormente, incluindo a descrição original de *Chromis brasiliensis* (atualmente *G. brasiliensis*) por Quoy & Gaimard (1824) e de *C. unimaculata* (atualmente sinônimo júnior de *G. brasiliensis*) por Castelnau (1855). Entretanto, como os materiais-tipo (holótipos e parátipos) das oito espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis* não foram observados e analisados pessoalmente, logo, as informações sobre os caracteres morfológicos considerados mais informativos foram acessadas nas literaturas taxonômicas de descrição e/ou revisão taxonômica das oito espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis* e das cinco espécies consideradas sinônimas. Ver **Tabela 4** para mais detalhes sobre as literaturas taxonômicas consultadas.

Tabela 4: Informações sobre as literaturas taxonômicas das oito espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis* e das cinco espécies consideradas sinônimas.

Espécie	Descrição original	Revisão taxonômica	Sinonímia
<i>Chromis brasiliensis</i>	Quoy & Gaimard (1824), páginas 286 e 287	Gosse (1975), páginas 34 a 44	Atualmente <i>G. brasiliensis</i>
<i>C. obscura</i>	Castelnau (1855), página 14	Gosse (1975), páginas 34 a 44	Atualmente <i>G. obscurus</i>
<i>G. iporangensis</i>	Haseman (1911), páginas 364 e 365	Gosse (1975), páginas 34 a 44	Sem sinonímia
<i>G. itapicuruensis</i>	Haseman (1911), página 365	Gosse (1975), páginas 34 a 44	Sem sinonímia
<i>G. diamantinensis</i>	Mattos et al. (2015), páginas 213 a 218	Não tem	Sem sinonímia
<i>G. multiocellus</i>	Mattos & Costa (2018), páginas 7 a 9	Não tem	Sem sinonímia
<i>G. rufomarginatus</i>	Mattos & Costa (2018), páginas 4 a 6	Não tem	Sem sinonímia
<i>G. santosi</i>	Mattos & Costa (2018), páginas 10 a 12	Não tem	Sem sinonímia

<i>G. brasiliensis</i>	Kner (1865), páginas 266 e 267	Gosse (1975), páginas 34 a 44	Sinônimo de <i>G. brasiliensis</i>
<i>Acara gymnopoma</i>	Günther (1862), páginas 278 e 279	Gosse (1975), páginas 34 a 44	Sinônimo de <i>G. brasiliensis</i>
<i>A. minuta</i>	Hensel (1870), páginas 53 e 54	Gosse (1975), páginas 34 a 44	Sinônimo de <i>G. brasiliensis</i>
<i>C. unimaculata</i>	Castelnau (1855), páginas 13 e 14	Gosse (1975), páginas 34 a 44	Sinônimo de <i>G. brasiliensis</i>
<i>C. unipunctata</i>	Castelnau (1855), página 13	Gosse (1975), páginas 34 a 44	Sinônimo de <i>G. obscurus</i>

3.4. Delimitação de possíveis espécies

A delimitação das possíveis espécies seguiu os princípios da taxonomia integrativa, que considera uma abordagem integrada entre os níveis de suporte dos ramos gerados na topologia da filogenia molecular, os pontos de corte obtidos após o cálculo das distâncias genéticas, a combinação de caracteres morfológicos obtidos após a Análise de Agregação Populacional e o padrão de distribuição geográfica. Na topologia da filogenia molecular, as espécies são delimitadas a partir de clados bem suportados e com distribuição geográfica concordante, conforme abordagem proposta por Wiens & Penkrot (2002). Os pontos de corte no cálculo das distâncias genéticas foram considerados a partir dos resultados obtidos para peixes no estudo de Ward (2009), no qual, a distância genética superior a 2% sugere que probabilidade de coespecificidade é muito baixa em peixes. O método conhecido como Análise de Agregação Populacional é baseado na combinação única de caracteres morfológicos únicos para diagnosticar espécies, e foi descrito formalmente por Davis & Nixon (1992). Os textos descritivos das comparações entre as linhagens e espécies foram organizados de forma semelhante à seção “Diagnose” das descrições taxonômicas formais. Uma chave de identificação das possíveis espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis* da bacia do Rio Doce foi elaborada neste estudo.

4. RESULTADOS

4.1. Filogenia molecular

A topologia da filogenia molecular, baseada no agrupamento Neighbor-Joining, indicou a presença de sete linhagens do complexo de espécies *G. brasiliensis* na bacia do Rio Doce, sendo representadas por sete grupos monofiléticos com níveis de suporte posteriores iguais ou maiores que 93%, embora o nível de suporte de alguns clados intermediários seja menor que 60% (**Figura 5**).

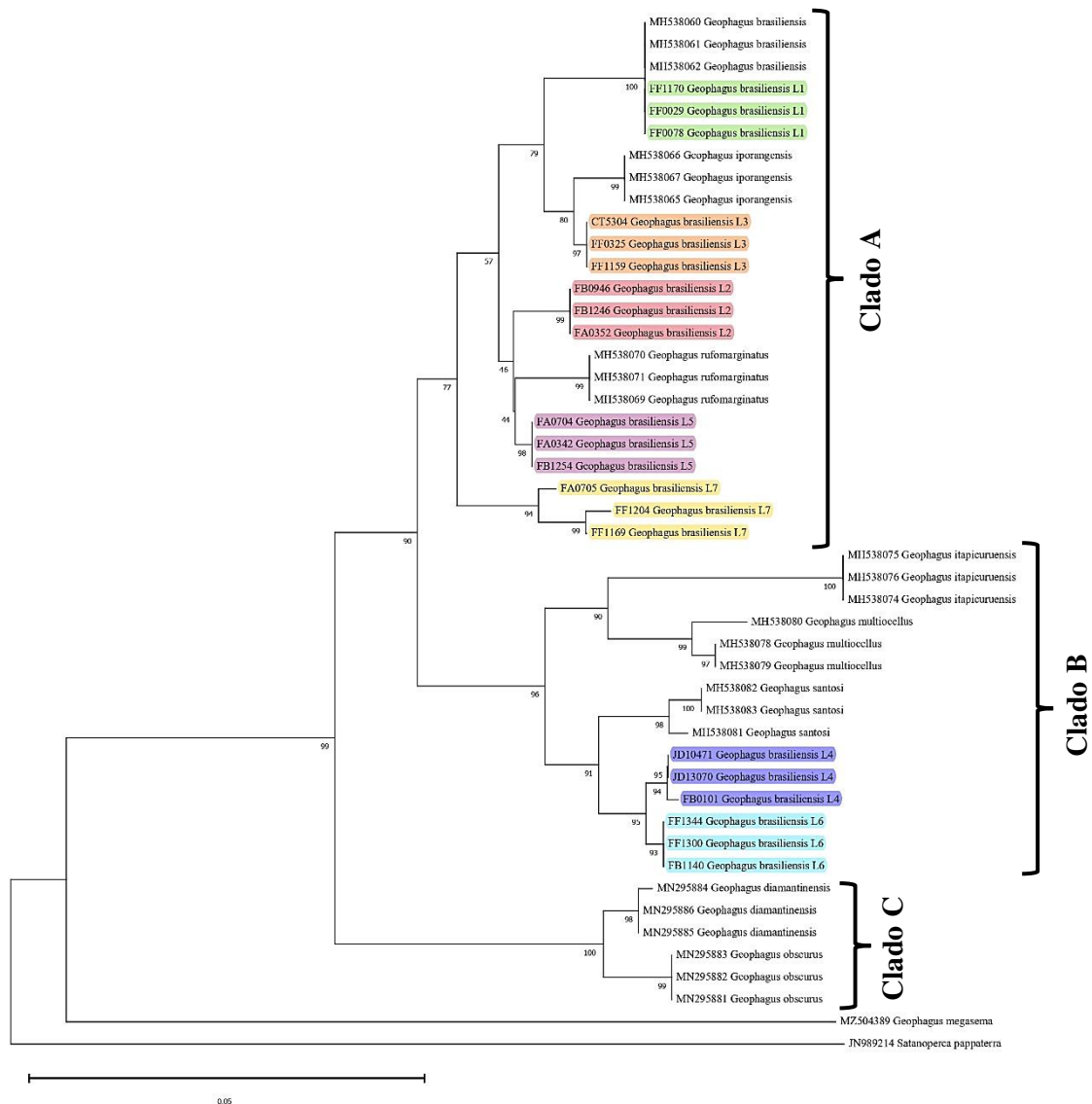


Figura 5: Filogenia molecular mostrando as relações de parentesco das sete linhagens do complexo de espécies *G. brasiliensis* detectadas na bacia do Rio Doce e as oito espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis* formalmente descritas até o momento. As sete linhagens detectadas na bacia do Rio Doce estão indicadas com os códigos L1 a L7 logo após o epíteto específico.

As sete linhagens do complexo de espécies *G. brasiliensis* detectadas na bacia do Rio Doce e as oito espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis* foram representadas somente por três amostras na filogenia molecular para otimizar o espaço ocupado pela figura 5. Os espécimes agrupados em cada linhagem obtida na filogenia molecular estão indicados na **Tabela 5**.

Tabela 5: Espécimes agrupados em cada linhagem de *G. brasiliensis* detectada na bacia do Rio Doce, e os trechos de ocorrência na bacia do Rio Doce.

Linhagens	Código dos espécimes	Trecho de ocorrência na bacia do Rio Doce
<i>G. brasiliensis</i> L1	FA0340; FF0029; FF0078; FF1170	Alto
<i>G. brasiliensis</i> L2	FA0034; FA0352; FB0904; FB0946; FB1006; FB1246; FF0040; FF0093; FF1136	Alto
<i>G. brasiliensis</i> L3	CT5304; FB1245; FF0323; FF0325; FF1159	Alto
<i>G. brasiliensis</i> L4	FB0101; FF0674; FF0172; JD6302; JD6749; JD8944; JD10471; JD13070; JD21442; JD21313	Médio e Baixo
<i>G. brasiliensis</i> L5	CT1776; CT2720; CT2847; FA0038; FA0342; FA0390; FA0704; FB0939; FB1244; FB1249; FB1254; FF0097; FF0120; FF0301; FF1150; FF1330; JD3574; JD14143; JD35871	Alto, Médio e Baixo
<i>G. brasiliensis</i> L6	CT1200; CT1284; CT1994; CT2506; FB1139; FB1140; FF1300; FF1344; FF1369	Médio
<i>G. brasiliensis</i> L7	FA0705; FF1169; FF1203; FF1204	Alto e Médio

Obs: os códigos dos espécimes coletados no Rio Guandu (ponto 24, Baixo Rio Doce) não foram incluídos nesta tabela devido a problemas no sequenciamento dessas amostras. As amostras CT1776, CT2720 e CT2847 estão alocadas no haplogrupo "Streambed" segundo Alves-Silva & Dergam (2014) e foram consideradas como *G. rufomarginatus* segundo Argolo et al (2020), enquanto as amostras CT1284, CT1994 e CT2506 estão alocadas no haplogrupo "Lacustrine" segundo Alves-Silva & Dergam (2014) e foram consideradas como *Geophagus* sp. "Doce" segundo Argolo et al (2020). O número de pares de base das sequências listadas nesta tabela variou de 615pb a 680pb.

A partir da topologia da filogenia molecular, podemos observar três clados maiores representando as linhagens e espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis*: o **Clado A** formado por *G. brasiliensis* típico, *G. brasiliensis* L1, *G. iporangensis*, *G. brasiliensis* L3, *G. brasiliensis* L2, *G. rufomarginatus*, *G. brasiliensis* L5 e *G. brasiliensis* L7; o **Clado B** formado por *G. itapicuruensis*, *G. multiocellus*, *G. santosi*, *G. brasiliensis* L4 e *G. brasiliensis* L6; e o **Clado C** formado por *G. diamantinensis* e *G. obscurus* (ver **Figura 5**).

4.2. Distâncias genéticas e relações de parentesco

A linhagem *G. brasiliensis* L1 está no mesmo clado que *G. brasiliensis* típico (ver **Figura 5**) e possuem sequências do gene mitocondrial *COI* idênticas, com distância genética igual a 0% (**Figura 6**). A linhagem *G. brasiliensis* L2 é irmã do clado formado por *G. brasiliensis* L5 e *G. rufomarginatus* (ver **Figura 5**), com distâncias genéticas iguais a 0,90% e 1,60%, respectivamente (**Figura 6**). A linhagem *G. brasiliensis* L3 é irmã de *G. iporangensis* (ver **Figura 5**), com distância genética entre cladogramas igual a 0,80% (**Figura 6**). A linhagem *G. brasiliensis* L4 é irmã de *G. brasiliensis* L6 (ver **Figura 5**), com distância genética entre cladogramas igual a 0,50% (**Figura 6**). A linhagem *G. brasiliensis* L5 é irmã de *G. rufomarginatus* (ver **Figura 5**), com distância genética entre cladogramas igual a 1,10% (**Figura 6**). As linhagens *G. brasiliensis* L4 e *G. brasiliensis* L6 formam um grupo irmão de *G. santosi* (ver **Figura 5**), com distância genética entre cladogramas igual a 2,00% (**Figura 6**). A linhagem *G. brasiliensis* L7 é irmã do clado formado por *G. brasiliensis*, *G. brasiliensis* L1, *G. brasiliensis* L2, *G. brasiliensis* L3, *G. brasiliensis* L5, *G. iporangensis* e *G. rufomarginatus* (ver **Figura 5**), com distâncias genéticas entre cladogramas iguais a 3,80%, 3,80%, 1,80%, 2,90%, 1,60%, 3,40% e 2,30%, respectivamente (**Figura 6**).

As linhagens e espécies do **Clado A** possuem distâncias genéticas em relação ao **Clado B** que variaram de 4,90% a 8,20%, e distâncias genéticas em relação ao **Clado C** que variaram de 5,90% a 7,80% (**Figura 6**). Por sua vez, as linhagens e espécies do **Clado B** possuem distâncias genéticas em relação ao **Clado C** que variaram de 8,20% a 9,10% (**Figura 6**).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	<i>G. brasiliensis</i>	****														
2	<i>G. diamantinensis</i>	0,066	****													
3	<i>G. iporangensis</i>	0,020	0,059	****												
4	<i>G. itapicuruensis</i>	0,082	0,091	0,073	****											
5	<i>G. multiocellus</i>	0,063	0,082	0,061	0,039	****										
6	<i>G. obscurus</i>	0,074	0,013	0,063	0,090	0,081	****									
7	<i>G. rufomarginatus</i>	0,032	0,075	0,032	0,070	0,055	0,078	****								
8	<i>G. santosi</i>	0,057	0,082	0,052	0,054	0,039	0,084	0,058	****							
9	<i>G. brasiliensis</i> L1		0,066	0,021	0,080	0,060	0,074	0,028	0,058	****						
10	<i>G. brasiliensis</i> L2	0,025	0,067	0,022	0,077	0,061	0,070	0,016	0,058	0,025	****					
11	<i>G. brasiliensis</i> L3	0,018	0,061	0,008	0,074	0,058	0,065	0,022	0,050	0,018	0,020	****				
12	<i>G. brasiliensis</i> L4	0,057	0,083	0,054	0,050	0,034	0,082	0,050	0,020	0,057	0,054	0,051	****			
13	<i>G. brasiliensis</i> L5	0,020	0,067	0,020	0,074	0,058	0,073	0,011	0,055	0,020	0,003	0,016	0,051	****		
14	<i>G. brasiliensis</i> L6	0,054	0,083	0,052	0,046	0,031	0,082	0,050	0,020	0,054	0,054	0,051	0,003	0,051	****	
15	<i>G. brasiliensis</i> L7	0,038	0,074	0,034	0,066	0,054	0,078	0,023	0,043	0,038	0,018	0,029	0,038	0,016	0,036	****

Figura 6: Matriz de distâncias genéticas (Kimura-2-parâmetros/K2P) das sete linhagens do complexo de espécies *G. brasiliensis* detectadas na bacia do Rio Doce e as oito espécies do complexo

de espécies *G. brasiliensis* já descritas. Células azuis: distâncias genéticas entre clados maiores ou iguais 5%. Células verdes: distâncias genéticas entre clados que variaram de 2,0% e 4,6%. Células amarelas: distâncias genéticas entre clados que variaram de 1,1 a 1,8%. Células vermelhas: distâncias genéticas entre clados menores que 1,0%.

4.3. Distribuição geográfica das linhagens

A linhagem *G. brasiliensis* L1 foi detectada em um afluente no trecho do Alto Rio Doce (Rio Piranga) e no canal principal do Alto Rio Doce. A linhagem *G. brasiliensis* L2 foi detectada em três afluentes no trecho do Alto Rio Doce (Rio do Carmo, Rio Piranga, Rio Casca) e no canal principal do Alto Rio Doce. A linhagem *G. brasiliensis* L3 parece ser uma linhagem com a distribuição geográfica mais restrita na bacia, pois a mesma foi detectada somente no trecho do Alto Rio Doce, no afluente Rio do Carmo e seu tributário, o Rio Gualaxo do Norte. A linhagem *G. brasiliensis* L4 foi detectada nos trechos do Médio e Baixo Rio Doce, que incluem os afluentes Rio Santo Antônio (Médio Rio Doce) e Rio Manhuaçu (Baixo Rio Doce), alguns lagos do Baixo Rio Doce (Lagos do Óleo, Limão e Palmas) e o canal principal do Baixo Rio Doce. A linhagem *G. brasiliensis* L5 parece ser uma linhagem com distribuição geográfica mais ampla na bacia, pois a mesma foi detectada nos trechos do Alto, Médio e Baixo Rio Doce, que incluem alguns afluentes do Alto Rio Doce (Rio do Carmo, Rio Piranga e Rio Casca), alguns afluentes do Médio Rio Doce (Rio Matipó, Rio Piracicaba e Rio Santo Antônio), um afluente do Baixo Rio Doce (Rio Manhuaçu) e no canal principal do Alto, Médio e Baixo Rio Doce. A linhagem *G. brasiliensis* L6 foi detectada somente no trecho do Médio Rio Doce, que incluem alguns afluentes do Médio Rio Doce (Rio Suaçuí Grande e Rio Caratinga), alguns lagos do Médio Doce (Lagos Aguapé, Cristal, Linguíça e Hortência) e o canal principal do Médio Rio Doce. A linhagem *G. brasiliensis* L7 foi detectada em um afluente do Alto Rio Doce (Rio Piranga) e um afluente do Médio Rio Doce (Rio Matipó). A **Figura 7** mostra a representação gráfica das localidades de ocorrência das sete linhagens do complexo de espécies *G. brasiliensis* na bacia do Rio Doce.

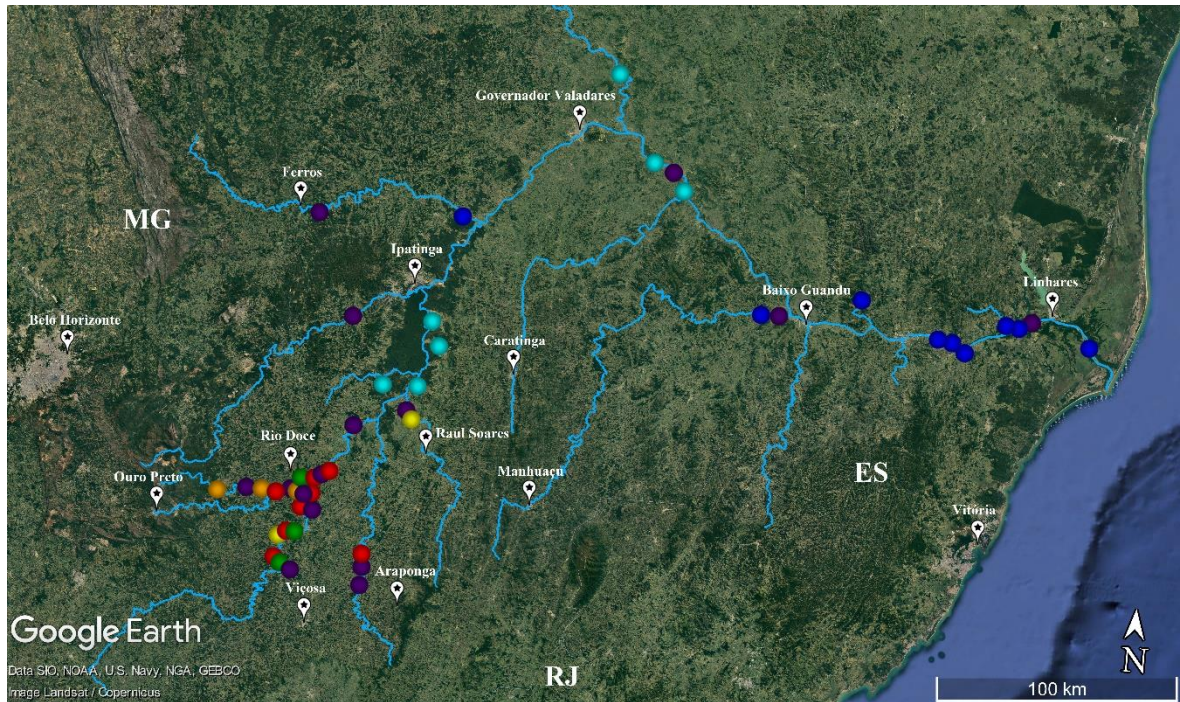


Figura 7: Representação gráfica das localidades de ocorrência das sete linhagens do complexo de espécies *G. brasiliensis* detectadas na bacia do Rio Doce. Pontos verdes: *G. brasiliensis* L1; Pontos vermelhos: *G. brasiliensis* L2; Pontos laranjas: *G. brasiliensis* L3; Pontos azuis-escuros: *G. brasiliensis* L4; Pontos roxos: *G. brasiliensis* L5; Pontos azuis-claros: *G. brasiliensis* L6; Pontos amarelos: *G. brasiliensis* L7.

As linhagens *G. brasiliensis* L1, L2, L3, L5 e L7 coocorrem no trecho do Alto Rio Doce, as linhagens *G. brasiliensis* L4, L5, L6 e L7 coocorrem no trecho do Médio Rio Doce e as linhagens *G. brasiliensis* L4 e L5 coocorrem no trecho do Baixo Rio Doce (**Figura 8**).

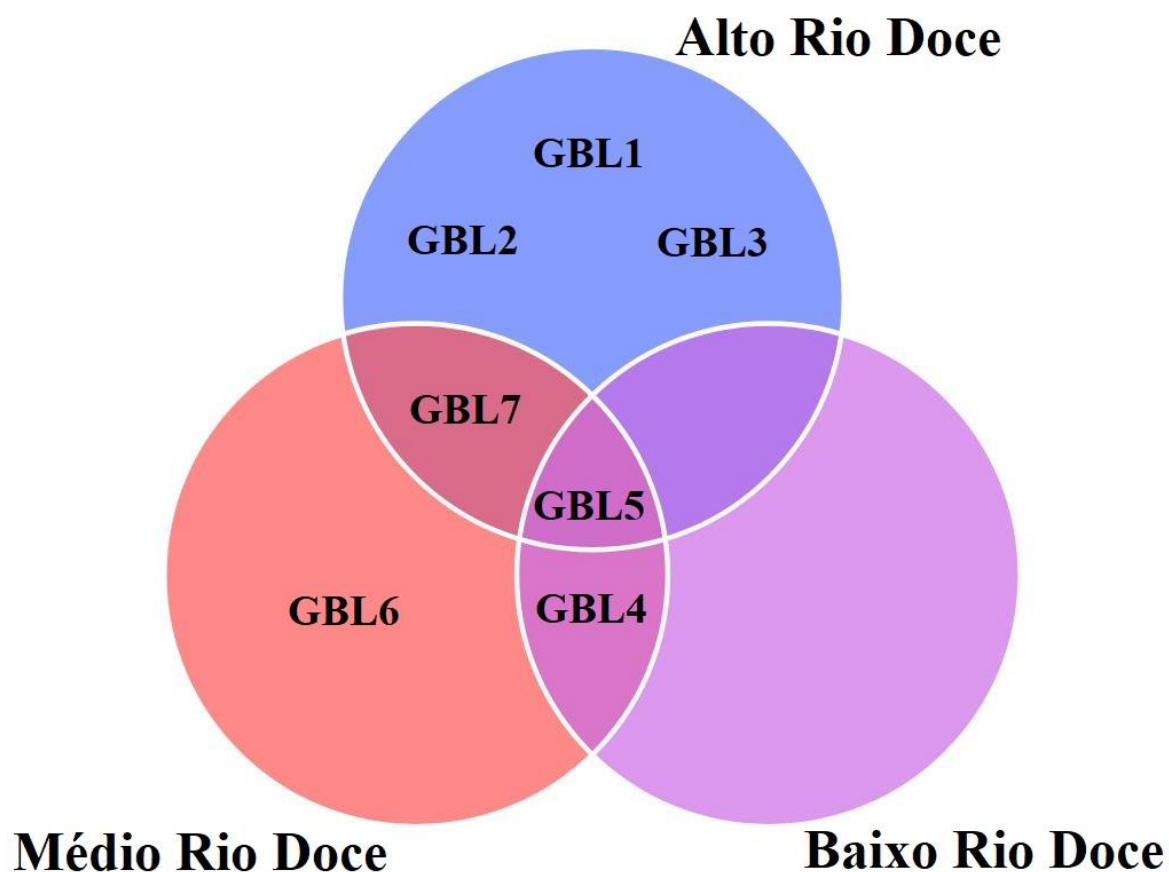


Figura 8: Esquema em diagrama de Venn mostrando os trechos de ocorrência das sete linhagens do complexo de espécies *G. brasiliensis* detectadas na bacia do Rio Doce. Azul: Alto Rio Doce; Vermelho: Médio Rio Doce; Roxo: Baixo Rio Doce. GBL1: *G. brasiliensis* L1; GBL2: *G. brasiliensis* L2; GBL3: *G. brasiliensis* L3; GBL4: *G. brasiliensis* L4; GBL5: *G. brasiliensis* L5; GBL6: *G. brasiliensis* L6; GBL7: *G. brasiliensis* L7.

4.4. Delimitação morfológica

4.4.1. Caracteres merísticos

Dentre os 21 caracteres merísticos avaliados neste estudo, somente dois foram considerados informativos: o número de elementos ósseos na nadadeira dorsal e o número de rastros branquiais no ramo superior do primeiro arco branquial (**Tabela 6**). Os demais caracteres não foram considerados informativos porque apresentaram sobreposição de valores nas contagens merísticas.

Tabela 6: Contagens dos caracteres merísticos das sete linhagens do complexo de espécies *G. brasiliensis* detectadas na bacia do Rio Doce. **GBL1:** *G. brasiliensis* L1; **GBL2:** *G. brasiliensis* L2; **GBL3:** *G. brasiliensis* L3; **GBL4:** *G. brasiliensis* L4; **GBL5:** *G. brasiliensis* L5; **GBL6:** *G. brasiliensis* L6; **GBL7:** *G. brasiliensis* L7. O número entre parênteses é o N amostral de espécimes analisados. ISO: boca isognata; ANI: boca anisognata; PRO: boca prognata.

Caracteres	GBL1 (4)	GBL2 (9)	GBL3 (5)	GBL4 (9)	GBL5 (8)	GBL6 (8)	GBL7 (4)
ELS	19	17 – 20	18 – 19	18 – 19	19 – 20	19	19
ELI	9 – 11	9 – 11	10 – 11	9 – 11	10 – 12	9 – 10	9 – 10
LE1	26 – 27	25 – 27	26 – 27	26 – 27	26 – 27	25 – 26	25 – 27
LE0	25 – 26	25 – 26	24 – 25	24 – 25	25 – 26	25 – 26	24 – 26
LE2	24 – 25	24 – 25	24 – 25	24 – 25	24 – 25	24 – 25	24 – 26
EAS	4	3 – 4	4	3 – 4	4	3 – 4	4
EAI	5	5 – 6	5	5	5	4 – 5	5
EPO	4 – 5	4	4 – 5	4 – 5	5 – 6	4 – 5	4 – 5
EPC	14 – 16	14 – 16	16	16	15 – 16	16	15 – 16
EPD	10 – 11	11 – 12	10 – 11	11 – 12	10 – 11	11 – 12	11 – 12
ELL	2	2	2	2	2	2	2
RDO	XV + 10 – 12	XV + 11	XIV – XVI + 9 – 12	XIII – XIV + 12 – 13	XIV – XVI + 11 – 12	XIV + 12 – 13	XIV – XV + 10 – 12
RPE	13 – 14	13 – 14	14 – 15	13 – 14	13 – 14	13	13 – 14
RPV	I + 5	I + 5	I + 5	I + 5	I + 5	I + 5	I + 5
RAN	III + 7 – 9	III + 8	III + 7 – 8	III + 8 – 9	III + 8 – 9	III + 8 – 9	III + 7 – 8
RCA	16	16	16 – 17	16	16	16	16
RBQ	3 – 4	3	3	3 – 4	3 – 4	3 – 4	3
RBS	8 – 9	7 – 9	7 – 8	7 – 8	8	6 – 7	7 – 9
RBI	9 – 10	9 – 10	9 – 10	9	9	9 – 10	8 – 9
DRB	Não	Não	Não	Sim ou Não	Sim ou Não	Sim ou Não	Não
PBO	ISO ou PRO	ISO ou ANI	ISO ou ANI	ISO ou ANI	ISO ou ANI	ISO ou ANI	ISO ou PRO

4.4.2. Caracteres morfométricos

Dentre os 23 caracteres morfométricos avaliados neste estudo, sete foram considerados informativos: altura do corpo, comprimento do último raio espinhoso da nadadeira dorsal, comprimento do raio espinhoso da nadadeira pélvica, comprimento do pedúnculo caudal, altura da cabeça, comprimento do focinho e o comprimento da mandíbula superior (**Tabelas 7 a 13**). Os demais caracteres não foram considerados informativos porque apresentaram sobreposição de valores nas medidas morfométricas.

Tabela 7: Medidas dos caracteres morfométricos de *G. brasiliensis* L1. O número entre parênteses é o N amostral de espécimes analisados.

Caracteres	Intervalo (n=4)	Média	Desvio padrão
CP	104,76 – 135,61	–	–
ACO	43,35 – 46,54	44,48	1,30
CPD	42,39 – 44,05	43,19	0,59
CBD	57,12 – 60,76	59,11	1,39
CED	14,87 – 16,69	15,67	0,67
CPP	39,06 – 41,66	40,81	1,03
CPV	27,21 – 34,87	30,82	2,84
CEP	13,51 – 15,44	14,29	0,74
CPE	29,01 – 31,92	30,41	1,47
CBA	17,67 – 20,78	41,77	2,77
CAN	37,86 – 45,63	19,54	1,15
CEA	13,84 – 15,70	14,69	0,69
CPC	12,74 – 14,91	13,62	0,84
APC	14,49 – 15,43	14,86	0,39
CC	34,74 – 36,07	35,25	0,51
ACA	99,66 – 106,16	51,66	2,58
LCA	43,19 – 54,81	49,54	2,15
DOR	21,56 – 24,71	102,59	2,45
DIT	32,07 – 33,31	47,17	4,71
AIF	46,65 – 52,15	23,11	1,11

CFO	47,25 – 53,77	32,51	0,47
CMS	25,79 – 30,70	27,72	1,83
CMI	25,06 – 28,47	27,31	1,34

Tabela 8: Medidas dos caracteres morfométricos de *G. brasiliensis* L2. O número entre parênteses é o N amostral de espécimes analisados.

Caracteres	Intervalo (n=4)	Média	Desvio padrão
CP	80,40 – 152,66	–	–
ACO	39,09 – 49,54	44,47	3,73
CPD	41,56 – 46,29	43,41	1,96
CBD	57,96 – 59,15	58,39	0,47
CED	14,49 – 16,52	15,49	0,99
CPP	39,27 – 41,94	40,11	1,08
CPV	28,31 – 33,23	31,51	2,01
CEP	13,39 – 14,88	14,34	0,59
CPE	27,62 – 31,42	29,73	1,45
CBA	18,91 – 20,63	44,38	4,17
CAN	37,21 – 47,61	19,74	0,63
CEA	13,02 – 14,93	14,04	0,76
CPC	11,12 – 12,24	11,87	0,44
APC	13,55 – 16,14	15,03	0,94
CC	33,83 – 35,93	35,02	0,78
ACA	88,66 – 109,61	52,44	5,67
LCA	48,16 – 55,97	49,37	3,67
DOR	19,64 – 26,61	98,87	7,43
DIT	29,36 – 37,15	51,54	2,88
AIF	45,42 – 55,36	23,79	2,57
CFO	44,38 – 60,27	34,02	3,11
CMS	24,51 – 31,56	27,93	2,74
CMI	22,87 – 30,33	27,21	2,72

Tabela 9: Medidas dos caracteres morfométricos de *brasiliensis* L3. O número entre parênteses é o N amostral de espécimes analisados.

Caracteres	Intervalo (n=4)	Média	Desvio Padrão
CP	93,35 – 130,88	–	–
ACO	42,41 – 46,24	44,62	1,43
CPD	40,81 – 44,76	43,33	1,56
CBD	57,13 – 58,11	57,56	0,36
CED	13,46 – 14,45	14,11	0,39
CPP	36,33 – 41,74	38,95	2,46
CPV	27,25 – 32,92	30,05	2,66
CEP	13,65 – 15,58	14,29	0,76
CPE	27,01 – 31,39	28,79	1,75
CBA	19,26 – 19,82	40,72	4,21
CAN	35,70 – 45,96	19,49	0,21
CEA	13,34 – 15,21	14,48	0,69
CPC	10,89 – 12,79	12,26	0,79
APC	15,23 – 15,88	15,61	0,27
CC	34,91 – 37,80	36,18	1,07
ACA	88,46 – 97,86	52,62	3,21
LCA	45,39 – 51,36	48,99	2,96
DOR	21,88 – 27,43	92,04	3,53
DIT	28,41 – 36,05	47,81	2,27
AIF	44,98 – 53,29	23,61	2,23
CFO	47,49 – 55,43	31,91	3,23
CMS	28,96 – 31,94	30,22	1,08
CMI	23,19 – 29,75	27,47	2,63

Tabela 10: Medidas dos caracteres morfométricos de *G. brasiliensis* L4. O número entre parênteses é o N amostral de espécimes analisados.

Caracteres	Intervalo (n=4)	Média	Desvio Padrão
CP	62,12 – 134,75	–	–
ACO	40,74 – 46,33	42,91	2,08
CPD	43,16 – 45,46	44,32	0,87
CBD	56,66 – 59,91	58,11	1,39
CED	15,76 – 18,35	17,12	1,12
CPP	38,39 – 42,68	41,11	1,73
CPV	27,37 – 39,78	31,85	4,78
CEP	14,18 – 16,31	15,19	0,97
CPE	29,36 – 34,09	31,83	1,91
CBA	17,63 – 21,36	40,93	7,32
CAN	36,12 – 53,59	19,26	1,39
CEA	13,30 – 16,37	14,73	1,14
CPC	10,63 – 13,58	12,48	1,17
APC	15,08 – 16,05	15,43	0,36
CC	34,35 – 40,37	36,10	2,48
ACA	81,82 – 103,40	50,96	6,94
LCA	47,24 – 50,26	47,47	5,41
DOR	20,03 – 31,98	93,78	7,89
DIT	25,99 – 34,30	49,19	1,22
AIF	39,67 – 54,14	26,08	4,27
CFO	39,55 – 56,79	31,03	3,21
CMS	17,98 – 28,94	25,75	4,54
CMI	25,48 – 29,78	27,86	1,76

Tabela 11: Medidas dos caracteres morfométricos de *G. brasiliensis* L5. O número entre parênteses é o N amostral de espécimes analisados.

Caracteres	Intervalo (n=4)	Média	Desvio Padrão
CP	76,81 – 140,20	–	–
ACO	40,75 – 45,68	43,38	1,79
CPD	42,47 – 45,52	43,61	1,21
CBD	55,40 – 59,07	57,08	1,68
CED	13,16 – 15,63	14,78	0,96
CPP	39,35 – 45,30	42,01	2,17
CPV	28,32 – 31,33	30,07	1,22
CEP	13,01 – 14,27	13,78	0,52
CPE	26,87 – 31,38	28,52	1,72
CBA	18,79 – 20,01	42,06	4,69
CAN	36,05 – 48,15	19,31	0,48
CEA	14,11 – 15,42	14,76	0,59
CPC	11,94 – 15,53	13,75	1,45
APC	14,04 – 15,68	15,21	0,68
CC	33,18 – 36,57	35,27	1,26
ACA	95,69 – 109,52	51,05	3,07
LCA	42,50 – 51,82	49,79	4,27
DOR	21,11 – 26,04	102,94	5,95
DIT	32,66 – 34,71	48,71	3,64
AIF	46,41 – 54,04	23,61	2,22
CFO	45,87 – 53,76	34,07	0,83
CMS	29,01 – 30,77	29,81	0,66
CMI	26,08 – 28,99	27,76	1,17

Tabela 12: Medidas dos caracteres morfométricos de *G. brasiliensis* L6. O número entre parênteses é o N amostral de espécimes analisados.

Caracteres	Intervalo (n=4)	Média	Desvio Padrão
CP	101,58 – 135,85	–	–
ACO	45,37 – 47,93	46,91	1,04
CPD	42,16 – 46,50	44,19	1,68
CBD	57,26 – 62,65	59,12	2,09
CED	15,67 – 19,25	17,07	1,39
CPP	38,09 – 44,66	40,32	2,56
CPV	27,42 – 38,78	33,49	4,03
CEP	15,26 – 16,30	15,60	0,41
CPE	26,17 – 34,41	30,03	2,95
CBA	18,95 – 20,78	43,08	3,38
CAN	39,68 – 47,41	19,72	0,67
CEA	13,71 – 17,50	15,21	1,41
CPC	12,63 – 13,79	13,19	0,43
APC	15,26 – 16,46	16,08	0,48
CC	32,44 – 38,70	35,38	2,39
ACA	98,73 – 112,56	56,51	1,44
LCA	46,32 – 51,02	54,73	4,61
DOR	20,44 – 23,34	106,41	6,07
DIT	32,81 – 36,15	48,37	1,69
AIF	49,28 – 60,42	22,11	1,18
CFO	55,41 – 58,92	34,81	1,32
CMS	26,76 – 34,75	29,78	3,11
CMI	27,07 – 32,24	28,69	2,11

Tabela 13: Medidas dos caracteres morfométricos de *G. brasiliensis* L7. O número entre parênteses é o N amostral de espécimes analisados.

Caracteres	Intervalo (n=4)	Média	Desvio Padrão
CP	103,89 – 122,64	–	–
ACO	39,17 – 44,89	41,13	2,27
CPD	42,65 – 43,74	43,31	0,41
CBD	54,37 – 58,05	56,66	1,41
CED	13,79 – 18,05	15,11	1,71
CPP	39,95 – 41,15	40,47	0,43
CPV	26,97 – 34,95	30,21	3,37
CEP	11,96 – 15,69	14,02	1,41
CPE	27,12 – 29,83	28,62	1,19
CBA	18,01 – 19,92	40,66	5,21
CAN	34,91 – 47,76	18,86	0,75
CEA	13,39 – 15,93	14,59	1,06
CPC	12,61 – 15,55	13,78	1,12
APC	14,06 – 15,29	14,71	0,44
CC	30,65 – 35,51	34,18	2,04
ACA	91,52 – 106,46	55,09	6,84
LCA	38,74 – 53,79	49,34	3,87
DOR	21,74 – 25,33	98,31	5,88
DIT	30,21 – 35,56	46,85	5,51
AIF	46,17 – 55,89	23,74	1,29
CFO	50,30 – 66,84	32,16	2,06
CMS	27,23 – 33,93	29,73	2,76
CMI	27,51 – 34,02	29,59	2,59

4.4.3. Coloração do corpo e nadadeiras

Não foram encontradas diferenças informativas nos padrões de coloração do corpo das sete linhagens detectadas neste estudo, pois todos os indivíduos possuem a coloração do corpo muito semelhante entre si. Embora alguns indivíduos possuam o corpo mais

escurecido que outros, essa intensidade de coloração do corpo não foi informativa para distinguir as sete linhagens. Nas nadadeiras dorsal, peitoral, pélvica e anal, não foram encontradas diferenças informativas nos padrões de coloração das mesmas; porém, na nadadeira caudal foi possível observar algumas diferenças bem marcantes entre as sete linhagens. Por exemplo, na nadadeira caudal das linhagens *G. brasiliensis* L1, L2, L3, L5 e L7, é possível observar a presença de manchas marrons e pouco mais escurecidas que as membranas da nadadeira, no qual essas manchas se alinham formando um padrão de barras transversais, e além disso, essas barras podem variar em número de três a sete, podendo estar bem definidas em alguns espécimes, principalmente nos indivíduos sub-adultos e adultos (setas brancas nas **figuras 9, 10, 11, 13 e 15**). Já na nadadeira caudal das linhagens *G. brasiliensis* L4 e L6, a maioria dos indivíduos não possuem o padrão de coloração descrito anteriormente, pois os mesmos não possuem as manchas marrons formando barras transversais nesta nadadeira (setas brancas nas **figuras 12 e 14**).



Figura 9: Espécime da linhagem *G. brasiliensis* L1, FF0078, 135,61 mm CP; Brasil, Minas Gerais, Guaraciaba, Rio Piranga, Alto Rio Doce. Barra de escala: 10 mm. Fotografado por Assis, C.E. As setas brancas estão indicando a coloração da nadadeira caudal.



Figura 10: Espécime da linhagem *G. brasiliensis* L2, FA0352, 125,41 mm CP; Brasil, Minas Gerais, Guaraciaba, Rio Piranga, Alto Rio Doce. Barra de escala: 10 mm. Fotografado por Assis, C.E. As setas brancas estão indicando a coloração da nadadeira caudal.



Figura 11: Espécime da linhagem *G. brasiliensis* L3, FF0323, 113,93 mm CP; Brasil, Minas Gerais, Mariana, Rio Gualaxo do Norte, Alto Rio Doce. Barra de escala: 10 mm. Fotografado por Assis, C.E. As setas brancas estão indicando a coloração da nadadeira caudal.



Figura 12: Espécime da linhagem *G. brasiliensis* L4, JD6302, 134,75 mm CP; Brasil, Espírito Santo, Colatina, Rio Doce, Baixo Rio Doce. Barra de escala: 10 mm. Fotografado por Assis, C.E. As setas brancas estão indicando a coloração da nadadeira caudal.



Figura 13: Espécime da linhagem *G. brasiliensis* L5, FF0301, 101,83 mm CP; Brasil, Minas Gerais, Rio Doce, Formação do Rio Doce, Alto Rio Doce. Barra de escala: 10 mm. Fotografado por Assis, C.E. As setas brancas estão indicando a coloração da nadadeira caudal.



Figura 14: Espécime da linhagem *G. brasiliensis* L6, FF1369, 101,58 mm CP; Brasil, Minas Gerais, Conselheiro Pena, Rio Caratinga, Médio Rio Doce. Barra de escala: 10 mm. Fotografado por Assis, C.E. As setas brancas estão indicando a coloração da nadadeira caudal.



Figura 15: Espécime da linhagem *G. brasiliensis* L7, FF1169, 103,89 mm CP; Brasil, Minas Gerais, Ponte Nova, Rio Piranga, Alto Rio Doce. Barra de escala: 10 mm. Fotografado por Assis, C.E. As setas brancas estão indicando a coloração da nadadeira caudal.

4.4.4. Diagnóse das sete linhagens detectadas neste estudo

A linhagem *G. brasiliensis* L1 pode ser distinguida de *G. brasiliensis* L2 por possuir o pedúnculo caudal mais longo (12,74 – 14,91% do CP vs. 11,12 – 12,24% do CP); de *G. brasiliensis* L3 por possuir o último espinho da nadadeira dorsal mais longo (14,87 – 16,69% do CP vs. 13,46 – 14,45% do CP) e cabeça mais alta (99,66 – 106,16% do CC vs. 88,46 – 97,86% do CC); de *G. brasiliensis* L4 por possuir maior número de raios espinhosos na nadadeira dorsal (15 vs. 13 ou 14); não foi possível distingui-la de *G. brasiliensis* L5; de *G. brasiliensis* L6 por possuir maior número de raios espinhosos na nadadeira dorsal (15 vs. 13 ou 14), maior número de rastros no ramo superior do primeiro arco branquial (8 ou 9 vs. 6

ou 7) e focinho mais curto (47,25 – 53,77% do CC vs. 55,41 – 58,92% do CC); e não foi possível distingui-la de *G. brasiliensis* L7.

A linhagem *G. brasiliensis* L2 pode ser distinguida de *G. brasiliensis* L1 por possuir o pedúnculo caudal mais curto (11,12 – 12,24% do CP vs. 12,74 – 14,91% do CP); de *G. brasiliensis* L3 por possuir o último espinho da nadadeira dorsal mais longo (14,49 – 16,52% do CP vs. 13,46 – 14,45% do CP); de *G. brasiliensis* L4 por possuir maior número de raios espinhosos na nadadeira dorsal (15 vs. 13 ou 14) e menor número de raios moles na nadadeira dorsal (11 vs. 12 ou 13); não pode ser distinguida de *G. brasiliensis* L5; de *G. brasiliensis* L6 por possuir maior número de raios espinhosos na nadadeira dorsal (15 vs. 13 ou 14), menor número de raios moles na nadadeira dorsal (11 vs. 12 ou 13), espinho da nadadeira pélvica mais curto (13,39 – 14,88% do CP vs. 15,26 – 16,30% do CP) e o pedúnculo caudal mais curto (11,12 – 12,24% do CP vs. 12,63 – 13,79% do CP); e de *G. brasiliensis* L7 por possuir o pedúnculo caudal mais curto (11,12 – 12,24% do CP vs. 12,61 – 15,55% do CP).

A linhagem *G. brasiliensis* L3 pode ser distinguida de *G. brasiliensis* L1 por possuir o último espinho da nadadeira dorsal mais curto (13,46 – 14,45% do CP vs. 14,87 – 16,69% do CP) e cabeça mais baixa (88,46 – 97,86% do CC vs. 99,66 – 106,16% do CC); de *G. brasiliensis* L2 por possuir o último espinho da nadadeira dorsal mais curto (13,46 – 14,45% do CP vs. 14,49 – 16,52% do CP); de *G. brasiliensis* L4 por possuir o último espinho da nadadeira dorsal mais curto (13,46 – 14,45% do CP vs. 15,76 – 18,35% do CP) e mandíbula superior mais longa (28,96 – 31,94% do CC vs. 17,98 – 28,94% do CC); não foi possível distingui-la de *G. brasiliensis* L5; de *G. brasiliensis* L6 por possuir o último espinho da nadadeira dorsal mais curto (13,46 – 14,45% do CP vs. 15,67 – 19,25% do CP) e cabeça mais baixa (88,46 – 97,86% do CC vs. 98,73 – 112,56% do CC); e não foi possível distingui-la de *G. brasiliensis* L7.

A linhagem *G. brasiliensis* L4 pode ser distinguida de *G. brasiliensis* L1 por possuir menor número de raios espinhosos na nadadeira dorsal (13 ou 14 vs. 15); de *G. brasiliensis* L2 por possuir menor número de raios espinhosos na nadadeira dorsal (13 ou 14 vs. 15) e maior número de raios moles na nadadeira dorsal (12 ou 13 vs. 11); de *G. brasiliensis* L3 por possuir o último espinho da nadadeira dorsal mais longo (15,76 – 18,35% do CP vs. 13,46 – 14,45% do CP) e mandíbula superior mais curta (17,98 – 28,94% do CC vs. 28,96 – 31,94% do CC); de *G. brasiliensis* L5 por possuir o último espinho da nadadeira dorsal mais longo (15,76 – 18,35% do CP vs. 13,16 – 15,63% do CP) e a mandíbula superior mais curta (17,98 – 28,94% do CC vs. 29,01 – 30,77% do CC); não foi possível distingui-la de *G.*

brasiliensis L6; e de *G. brasiliensis* L7 por possuir manchas marrons na nadadeira caudal não formando barras transversais mais escurecidas que as membranas da nadadeira vs. manchas marrons na nadadeira caudal formando barras transversais mais escurecidas que as membranas da nadadeira.

A linhagem *G. brasiliensis* L5 não foi possível distingui-la de *G. brasiliensis* L1; não foi possível distingui-la de *G. brasiliensis* L2; não foi possível distingui-la de *G. brasiliensis* L3; de *G. brasiliensis* L4 por possuir o último espinho da nadadeira dorsal mais curto (13,16 – 15,63% do CP vs. 15,76 – 18,35% do CP) e mandíbula superior mais longa (29,01 – 30,77% do CC vs. 17,98 – 28,94% do CC); de *G. brasiliensis* L6 por possuir maior número de rastros no ramo superior do primeiro arco branquial (8 vs. 6 ou 7), último espinho da nadadeira dorsal mais curto (13,16 – 15,63% do CP vs. 15,67 – 19,25% do CP), espinho da nadadeira pélvica mais curto (13,01 – 14,27% do CP vs. 15,26 – 16,30% do CP) e focinho mais curto (45,87 – 53,76% do CC vs. 55,39 – 58,92% do CC); e não foi possível distingui-la de *G. brasiliensis* L7.

A linhagem *G. brasiliensis* L6 pode ser distinguida de *G. brasiliensis* L1 por possuir menor número de raios espinhosos na nadadeira dorsal (13 ou 14 vs. 15), menor número de rastros no ramo superior do primeiro arco branquial (6 ou 7 vs. 8 ou 9) e focinho mais longo (55,39 – 58,92% do CC vs. 47,25 – 53,77% do CC); de *G. brasiliensis* L2 por possuir menor número de raios espinhosos na nadadeira dorsal (13 ou 14 vs. 15), maior número de raios moles na nadadeira dorsal (12 ou 13 vs. 11), espinho da nadadeira pélvica mais longo (15,26 – 16,30% do CP vs. 13,39 – 14,88% do CP) e pedúnculo caudal mais longo (12,63 – 13,79% do CP vs. 11,12 – 12,24% do CP); de *G. brasiliensis* L3 por possuir o último espinho da nadadeira dorsal mais longo (15,67 – 19,25% do CP vs. 13,46 – 14,45% do CP) e cabeça mais alta (98,73 – 112,56% do CC vs. 88,46 – 91,55% do CC); não foi possível distingui-la de *G. brasiliensis* L4; de *G. brasiliensis* L5 por possuir menor número de rastros no ramo superior do primeiro arco branquial (6 ou 7 vs. 8), último espinho da nadadeira dorsal mais longo (15,67 – 19,25% do CP vs. 13,16 – 15,63% do CP), espinho da nadadeira pélvica mais longo (15,26 – 16,30% do CP vs. 13,01 – 14,27% do CP) e focinho mais longo (55,41 – 58,92% do CC vs. 45,87 – 53,76% do CC); e de *G. brasiliensis* L7 por possuir o corpo mais alto (45,37 – 47,93% do CP vs. 39,17 – 44,89% do CP).

Não foi possível distinguir a linhagem *G. brasiliensis* L7 de *G. brasiliensis* L1; ela pode ser distinguida de *G. brasiliensis* L2 por possuir o pedúnculo caudal mais longo (12,61 – 15,55% do CP vs. 11,12 – 12,24% do CP); não foi possível distingui-la de *G. brasiliensis* L3; de *G. brasiliensis* L4 por possuir manchas marrons na nadadeira caudal formando barras

transversais mais escurecidas que as membranas da nadadeira vs. manchas marrons na nadadeira caudal não formando barras transversais mais escurecidas que as membranas da nadadeira; não foi possível distingui-la de *G. brasiliensis* L5; e de *G. brasiliensis* L6 por possuir o corpo mais baixo (39,17 – 44,89% do CP vs. 45,37 – 47,93% do CP).

4.5. Delimitação de quatro possíveis espécies na bacia do Rio Doce

As linhagens *G. brasiliensis* L1, L2 e L3 podem representar três espécies distintas (*Geophagus* sp.1, sp.2 e sp.3, respectivamente), pois elas formam três clados monofiléticos (ver **Figura 5**) com distâncias genéticas que variaram entre 1,8% e 2,5% (ver **Figura 6**) e puderam ser diagnosticadas morfológicamente entre si e das linhagens *G. brasiliensis* L4 e L6, simultaneamente (ver **Seção 4.4.4**).

As linhagens *G. brasiliensis* L4 e L6 podem representar uma única espécie (*Geophagus* sp.4), pois ambas possuem distância genética entre si igual a 0,5% (ver **Figura 6**), não foi possível distingui-las morfológicamente (ler **Seção 4.4.4**) e foram claramente distinguidas das linhagens *G. brasiliensis* L1, L2 e L3 a partir das mesmas combinações de caracteres morfológicos (ler **Seção 4.4.4**) e com distâncias genéticas maiores que 5% (ver **Figura 6**).

O padrão de distribuição geográfica das linhagens *G. brasiliensis* L1, L2, L3, L4 e L6 na bacia do Rio Doce parece ser bem característico em relação ao tipo de ambiente onde essas quatro linhagens foram detectadas, uma vez que as linhagens *G. brasiliensis* L1, L2 e L3 (= *Geophagus* sp.1, sp.2 e sp.3, respectivamente) demonstraram ser predominantes nos afluentes do Alto Rio Doce, enquanto as linhagens *G. brasiliensis* L4 e L6 (= *Geophagus* sp.4) demonstraram ser predominantes em ambientes lacustres do Médio e Baixo Rio Doce (ver **Figuras 7 e 8**).

Já as linhagens *G. brasiliensis* L5 e L7 podem não representar espécies diferentes, porque não foi possível encontrar uma combinação de caracteres informativa para distingui-las morfológicamente entre si e também das linhagens *G. brasiliensis* L1, L2 e L3 (ler **Seção 4.4.4**). E além disso, a reconstrução da filogenia molecular, após a remoção das amostras das linhagens *G. brasiliensis* L5 e L7, mostrou uma nova topologia com níveis de suporte maiores ou iguais a 63% (**Figura 16**) ao invés de valores maiores ou iguais 44% quando as amostras das linhagens *G. brasiliensis* L5 e L7 estavam incluídas (ver **Figura 5**).

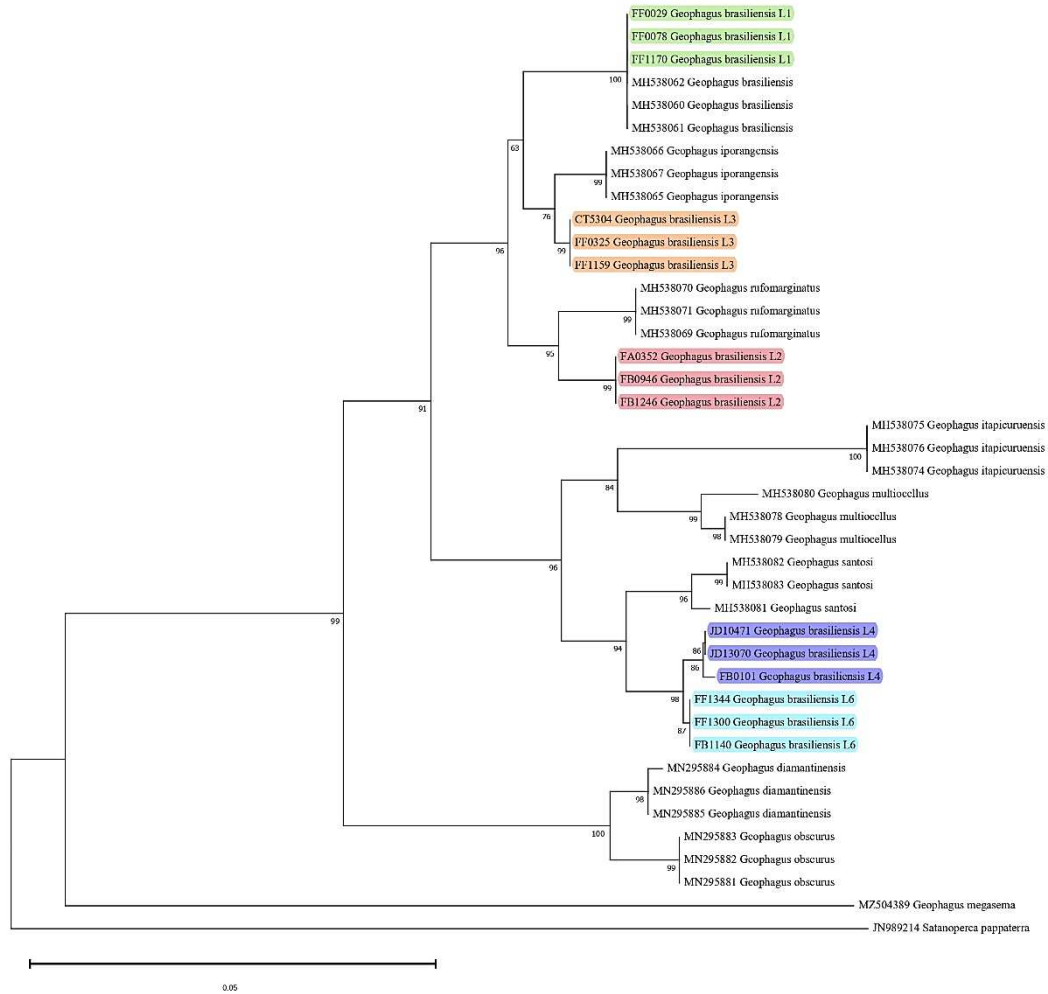


Figura 16: Filogenia molecular mostrando as relações de parentesco das linhagens do complexo de espécies *G. brasiliensis* detectadas na bacia do Rio Doce e as oito espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis* após a remoção das amostras das linhagens *G. brasiliensis* L5 e L7.

A linhagem *G. brasiliensis* L1 (= *Geophagus* sp.1) e *G. brasiliensis* foram agrupadas no mesmo clado com distância genética entre elas igual 0% (ver **Figuras 6 e 16**) e compartilham a presença de pontuações claras nos raios mais posteriores da nadadeira dorsal e anal, a presença de 15 raios espinhosos na nadadeira dorsal e a presença de manchas marrons na nadadeira caudal formando barras escurecidas e transversais, mas diferem entre si no formato da boca, sendo a boca em posição terminal ou subterminal em *G. brasiliensis* L1 versus boca em posição subdorsal em *G. brasiliensis* típico (ver **Figuras 9, 17 e 18**). Entretanto, como a distância genética entre ambas é muito baixa (igual 0%), mas há uma diferença morfológica entre elas e o material-tipo de *G. brasiliensis* não foi incluído nas análises merísticas e morformétricas deste estudo, por isso, vamos considerar a linhagem *G. brasiliensis* L1 do Rio Doce como *G. aff. brasiliensis*.



Figura 17: Holótipo de *Geophagus brasiliensis*, MNHN 9503; Brasil: Rio de Janeiro: Baía de Guanabara. Fonte: <https://science.mnhn.fr/institution/mnhn/collection/ic/item/a-9503>

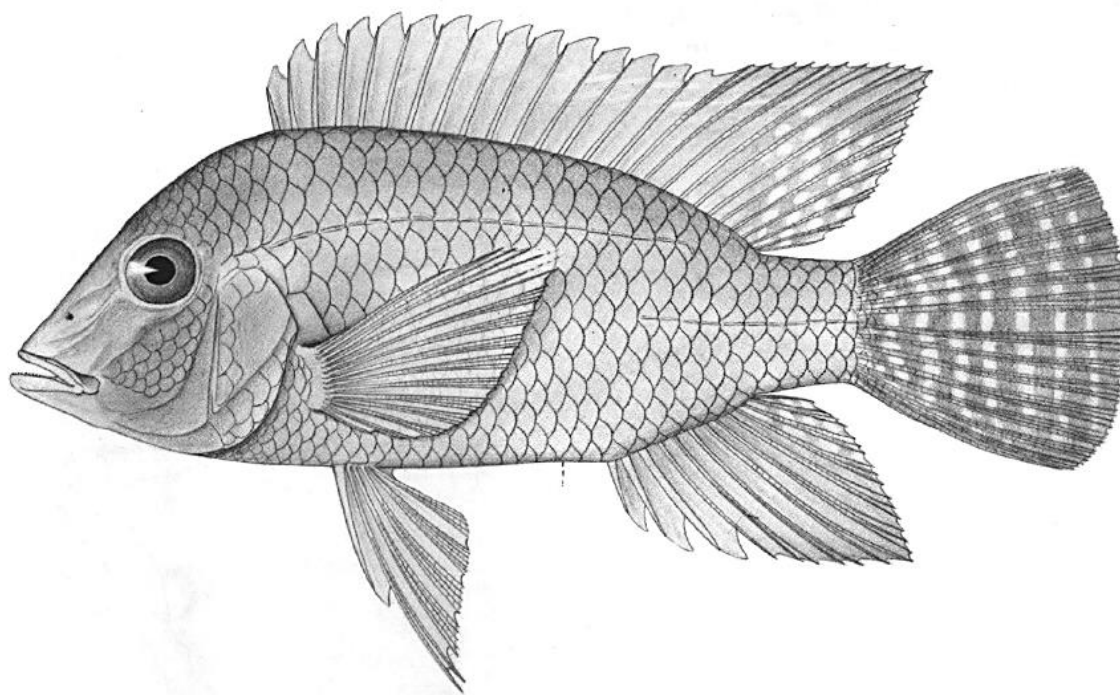


Figura 18: Desenho esquemático do holótipo de *Geophagus brasiliensis*, MNHN 9503, 136,80 mm CT; Brasil: Rio de Janeiro: Baía de Guanabara. Fonte: Gosse (1975).

A linhagem *G. brasiliensis* L2 (= *Geophagus* sp.2) é irmã de *G. rufomarginatus* com distância genética igual a 1,6% (ver **Figuras 6 e 16**) e diferem entre si no padrão de coloração

da nadadeira anal, no número de raios espinhosos e moles na nadadeira dorsal e no número de rastros no ramo inferior do primeiro arco branquial, na qual observamos a ausência de pontuações azuladas nos raios moles mais anteriores na nadadeira anal (ver **Figura 10**) e a presença de 15 raios espinhosos e 11 raios moles na nadadeira dorsal e na presença de 9 ou 10 rastros no ramo inferior do primeiro arco branquial de *G. brasiliensis* L2 versus a presença de pontuações azuladas nos raios moles mais anteriores na nadadeira anal (**Figura 19**), a presença de 14 raios espinhosos e 12 ou 13 raios moles na nadadeira dorsal e a presença de 12 rastros no ramo inferior do primeiro arco branquial de *G. rufomarginatus*.

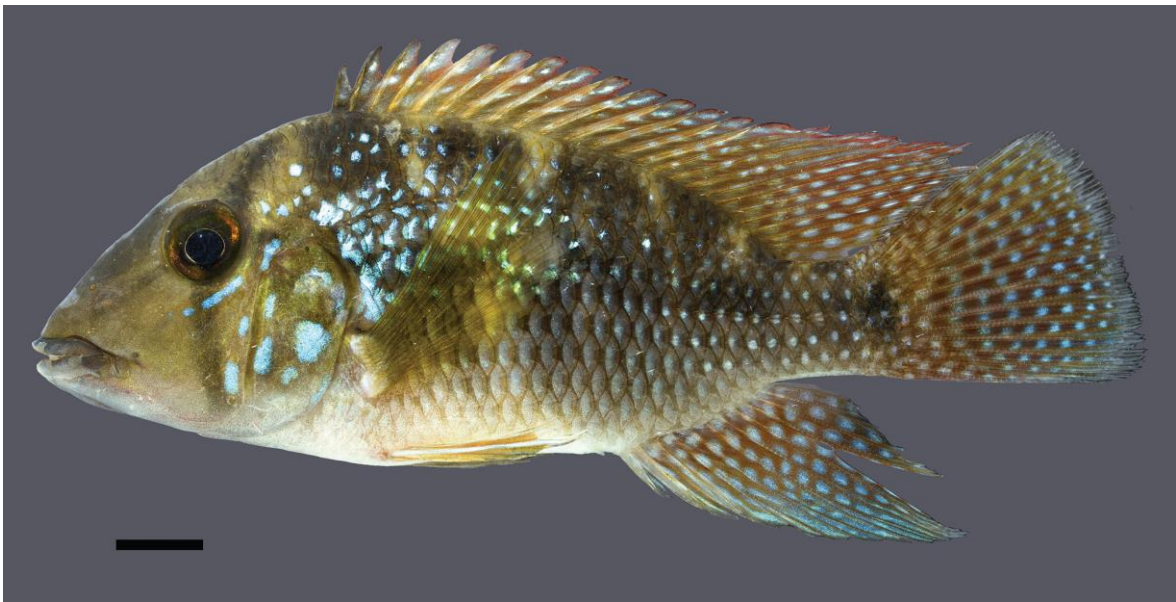


Figura 19: Holótipo de *Geophagus rufomarginatus*, UFRJ 9994, 96.8 mm CT; Brasil: Bahia: Rio Buranhém. Barra de escala: 10 mm. Fonte: Mattos & Costa (2018).

A linhagem *G. brasiliensis* L3 (= *Geophagus* sp.3) é irmã de *G. iporangensis* com distância genética entre elas igual 0,8% (ver **Figuras 6 e 16**) e diferem entre si no formato da nadadeira caudal, no número de escamas na série longitudinal e mediana do corpo e no número de rastros no ramo inferior do primeiro arco branquial, na qual observamos a nadadeira caudal com margem distal arredondada (ver **Figura 11**), a presença de 26 ou 27 escamas na série longitudinal e mediana do corpo e a presença de 7 ou 8 rastros no ramo inferior do primeiro arco branquial de *Geophagus* sp.3 versus a nadadeira caudal com margem distal reta (**Figura 20**), a presença de 28 escamas na série longitudinal e mediana do corpo e a presença de 9 rastros no ramo inferior do primeiro arco branquial de *G. iporangensis*. Entretanto, como a distância genética entre ambas é muito baixa (igual 0,8%), mas há duas diferenças morfológicas entre elas e o material-tipo de *G. iporangensis* não foi

incluído nas análises merísticas e morformétricas deste estudo, por isso, vamos considerar a linhagem *G. brasiliensis* L3 do Rio Doce como *G. aff. iporangensis*.

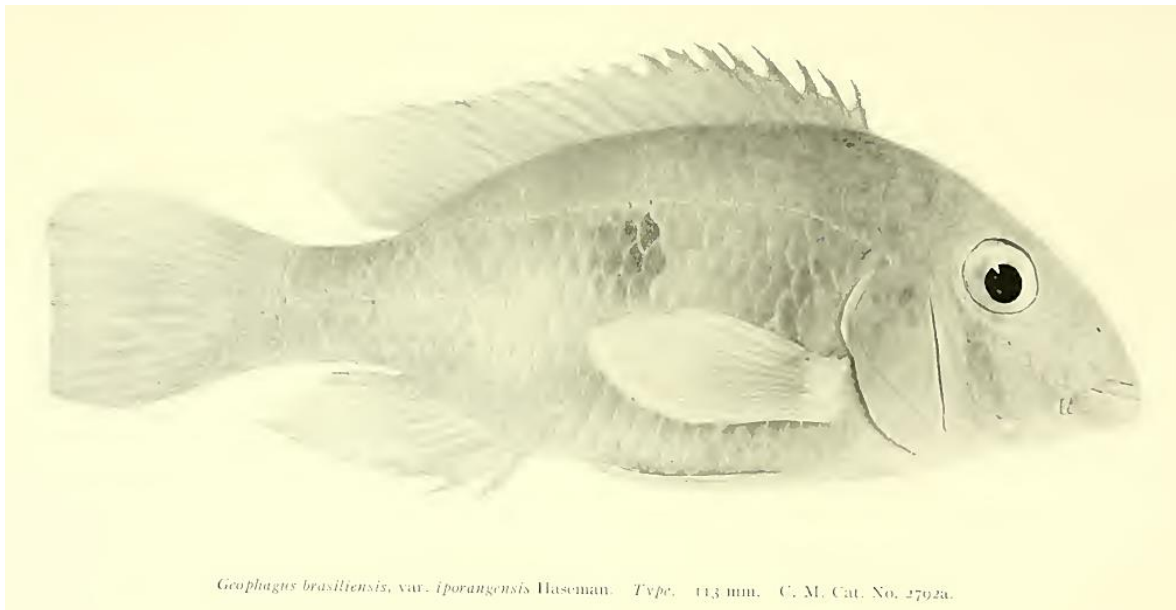


Figura 20: Holótipo de *Geophagus iporangensis*, 113 mm CT; Brasil: São Paulo: Rio Ribeira do Iguape. Fonte: Haseman (1911).

As linhagens *G. brasiliensis* L4 e L6 (= *Geophagus* sp.4) formam um clado irmão de *G. santosi* com distância genética igual a 2% (ver **Figuras 6 e 16**) e diferem entre si no padrão de coloração na base da nadadeira caudal, com a ausência de linhas azuladas e longitudinais na região basal da nadadeira caudal (ver **Figuras 12 e 14**) de *Geophagus* sp.4 versus a presença de linhas azuladas e longitudinais na região basal da nadadeira caudal (**Figura 21**) em *G. santosi*.



Figura 21: Holótipo de *Geophagus santosi*, UFRJ 11765, 110.6 mm CT; Brasil: Bahia: Rio Mariana. Barra de escala: 10 mm. Fonte: Mattos & Costa (2018).

Com base nos resultados, podemos considerar que existem quatro possíveis espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis* na bacia do Rio Doce: *Geophagus* sp.1 (*G. aff. brasiliensis*), *Geophagus* sp.2, *Geophagus* sp.3 (*G. aff. iporangensis*) e *Geophagus* sp.4; e construir uma nova matriz de caracteres informativos que permitem distingui-las (**Tabela 14**).

Tabela 14: Caracteres morfológicos que permitem distinguir as quatro possíveis espécies pertencentes ao complexo de espécies *G. brasiliensis* na bacia do Rio Doce. Os caracteres CED e CPC são percentuais do comprimento padrão do corpo e o caractere ACA é percentual do comprimento da cabeça. Os valores entre parênteses são os desvios padrão. RDO*: número de raios moles na nadadeira dorsal.

Caracteres	<i>Geophagus</i> sp.1	<i>Geophagus</i> sp.2	<i>Geophagus</i> sp.3	<i>Geophagus</i> sp.4
RDO	15	15	14 – 16	13 – 14
RDO*	10 – 12	11	9 – 12	12 – 13
CED	14,87 – 16,69 (0,67)	14,49 – 16,52 (0,99)	13,46 – 14,45 (0,39)	15,67 – 19,25 (1,27)
CPC	12,74 – 14,91 (0,84)	11,12 – 12,24 (0,44)	10,89 – 12,79 (0,79)	10,63 – 13,79 (0,95)
ACA	99,66 – 106,16 (2,58)	88,66 – 109,61 (5,67)	88,46 – 97,86 (3,21)	81,82 – 112,56 (9,45)

4.6. Diagnóstico das quatro possíveis espécies

Geophagus sp.1 (= *G. aff. brasiliensis*) pode ser distinguida de *Geophagus* sp.2 por possuir o pedúnculo caudal mais longo (12,74 – 14,91% do CP vs. 11,12 – 12,24% do CP); de *Geophagus* sp.3 (= *G. aff. iporangensis*) por possuir o último espinho da nadadeira dorsal mais longo (14,87 – 16,69% do CP vs. 13,46 – 14,45% do CP) e cabeça mais alta (99,66 – 106,16% do CC vs. 88,46 – 97,86% do CC); de *Geophagus* sp.4 por possuir maior número de raios espinhosos na nadadeira dorsal (15 vs. 13 ou 14); de *G. brasiliensis* por possuir a boca em posição terminal ou subterminal (vs. boca subdorsal em *G. brasiliensis*); de *G. diamantinensis* pela ausência de mancha escurecida e pequena próxima à origem da nadadeira peitoral e 15 raios espinhosos na nadadeira dorsal (vs. presença de mancha escurecida e pequena próxima à origem da nadadeira peitoral e 14 raios espinhosos na nadadeira dorsal de *G. diamantinensis*); de *G. iporangensis* por possuir a nadadeira caudal com margem distal arredondada (vs. nadadeira caudal com margem distal reta em *G. iporangensis*); de *G. itapicuruensis* por possuir a mancha médio-lateral escurecida e arredondada e 15 raios espinhosos na nadadeira dorsal (vs. mancha médio-lateral escurecida e verticalmente elíptica e 13 raios espinhosos na nadadeira dorsal de *G. itapicuruensis*); de *G. multiocellus* pela ausência de pequenas pontuações brilhantes na região central das manchas azuladas da nadadeira caudal e 15 raios espinhosos na nadadeira dorsal (vs. presença de pequenas pontuações brilhantes na região central das manchas azuladas da nadadeira caudal e 14 raios espinhosos na nadadeira dorsal de *G. multiocellus*); de *G. obscurus* por possuir pontuações azuladas e pequenas na região opercular e 15 raios espinhosos na nadadeira dorsal (vs. manchas grandes e azuladas na região opercular e 14 raios espinhosos na nadadeira dorsal de *G. obscurus*); de *G. rufomarginatus* pela ausência de pontuações azuladas nos raios moles mais anteriores na nadadeira anal e 15 raios espinhosos na nadadeira dorsal (vs. presença de pontuações azuladas nos raios moles mais anteriores na nadadeira anal e 14 raios espinhosos na nadadeira dorsal de *G. rufomarginatus*); e de *G. santosi* pela ausência de linhas azuladas e longitudinais na região basal da nadadeira caudal e 15 raios espinhosos na nadadeira dorsal (vs. presença de linhas azuladas e longitudinais na região basal da nadadeira caudal e 14 raios espinhosos na nadadeira dorsal de *G. santosi*).

Geophagus sp.2 pode ser distinguida de *Geophagus* sp.1 (= *G. aff. brasiliensis*) por possuir o pedúnculo caudal mais curto (11,12 – 12,24% do CP vs. 12,74 – 14,91% do CP); de *Geophagus* sp.3 (= *G. aff. iporangensis*) por possuir o último espinho da nadadeira dorsal mais longo (14,49 – 16,52% do CP vs. 13,46 – 14,45% do CP); de *Geophagus* sp.4 por

possuir maior número de raios espinhosos na nadadeira dorsal (15 vs. 13 ou 14) e menor número de raios moles na nadadeira dorsal (11 vs. 12 ou 13); de *G. brasiliensis* por possuir a boca em posição terminal ou subterminal (vs. boca subdorsal em *G. brasiliensis*); de *G. diamantinensis* pela ausência de mancha escurecida e pequena próxima à origem da nadadeira peitoral e 15 raios espinhosos na nadadeira dorsal (vs. presença de mancha escurecida e pequena próxima à origem da nadadeira peitoral e 14 raios espinhosos na nadadeira dorsal de *G. diamantinensis*); de *G. iporangensis* por possuir a nadadeira caudal com margem distal arredondada (vs. nadadeira caudal com margem distal reta em *G. iporangensis*); de *G. itapicuruensis* por possuir a mancha médio-lateral escurecida e arredondada e 15 raios espinhosos na nadadeira dorsal (vs. mancha médio-lateral escurecida e verticalmente elíptica e 13 raios espinhosos na nadadeira dorsal *G. itapicuruensis*); de *G. multiocellus* pela ausência de pequenas pontuações brilhantes na região central das manchas azuladas da nadadeira caudal e 15 raios espinhosos na nadadeira dorsal (vs. presença de pequenas pontuações brilhantes na região central das manchas azuladas da nadadeira caudal e 14 raios espinhosos na nadadeira dorsal de *G. multiocellus*); de *G. obscurus* por possuir pontuações azuladas e pequenas na região opercular e 15 raios espinhosos na nadadeira dorsal (vs. manchas grandes e azuladas na região opercular e 14 raios espinhosos na nadadeira dorsal de *G. obscurus*); de *G. rufomarginatus* pela ausência de pontuações azuladas nos raios moles mais anteriores na nadadeira anal e 15 raios espinhosos na nadadeira dorsal (vs. presença de pontuações azuladas nos raios moles mais anteriores na nadadeira anal e 14 raios espinhosos na nadadeira dorsal de *G. rufomarginatus*); e de *G. santosi* ausência de linhas azuladas e longitudinais na região basal da nadadeira caudal e 15 raios espinhosos na nadadeira dorsal (vs. presença de linhas azuladas e longitudinais na região basal da nadadeira caudal e 14 raios espinhosos na nadadeira dorsal de *G. santosi*).

Geophagus sp.3 (= *G. aff. iporangensis*) pode ser distinguida de *Geophagus* sp.1 (= *G. aff. brasiliensis*) por possuir o último espinho da nadadeira dorsal mais curto (13,46 – 14,45% do CP vs. 14,87 – 16,69% do CP) e cabeça mais baixa (88,46 – 97,86% do CC vs. 99,66 – 106,16% do CC); de *Geophagus* sp.2 por possuir o último espinho da nadadeira dorsal mais curto (13,46 – 14,45% do CP vs. 14,49 – 16,52% do CP); de *Geophagus* sp.4 por possuir o último espinho da nadadeira dorsal mais curto (13,46 – 14,45% do CP vs. 15,76 – 18,35% do CP); de *G. brasiliensis* por possuir a boca em posição terminal ou subterminal (vs. boca subdorsal em *G. brasiliensis*); de *G. brasiliensis* por possuir a boca em posição terminal ou subterminal e 13 ou 14 raios espinhosos na nadadeira dorsal (vs. boca subdorsal e 15 raios espinhosos na nadadeira dorsal de *G. brasiliensis*); de *G. diamantinensis* pela

ausência de mancha escurecida e pequena próxima à origem da nadadeira peitoral (vs. presença de mancha escurecida e pequena próxima à origem da nadadeira peitoral de *G. diamantinensis*); de *G. iporangensis* por possuir a nadadeira caudal com margem distal arredondada (vs. nadadeira caudal com margem distal reta em *G. iporangensis*); de *G. itapicuruensis* por possuir a mancha médio-lateral escurecida e arredondada (vs. mancha médio-lateral escurecida e verticalmente elíptica em *G. itapicuruensis*); de *G. multiocellus* pela ausência de pequenas pontuações brilhantes na região central das manchas azuladas da nadadeira caudal (vs. presença de pequenas pontuações brilhantes na região central das manchas azuladas da nadadeira caudal de *G. multiocellus*); de *G. obscurus* por possuir pontuações azuladas e pequenas na região opercular (vs. manchas grandes e azuladas na região opercular de *G. obscurus*); de *G. rufomarginatus* pela ausência de pontuações azuladas nos raios moles mais anteriores na nadadeira anal (vs. presença de pontuações azuladas nos raios moles mais anteriores na nadadeira anal de *G. rufomarginatus*); e de *G. santosi* pela ausência de linhas azuladas e longitudinais na região basal da nadadeira caudal (vs. presença de linhas azuladas e longitudinais na região basal da nadadeira caudal de *G. santosi*).

Geophagus sp.4 pode ser distinguida de *Geophagus* sp.1 (= *G. aff. brasiliensis*) por possuir menor número de raios espinhosos na nadadeira dorsal (13 ou 14 vs. 15); de *Geophagus* sp.2 por possuir menor número de raios espinhosos na nadadeira dorsal (13 ou 14 vs. 15) e maior número de raios moles na nadadeira dorsal (12 ou 13 vs. 11); de *Geophagus* sp.3 (= *G. aff. iporangensis*) por possuir o último espinho da nadadeira dorsal mais longo (15,76 – 18,35% do CP vs. 13,46 – 14,45% do CP); de *G. brasiliensis* por possuir a boca em posição terminal ou subterminal e 13 ou 14 raios espinhosos na nadadeira dorsal (vs. boca subdorsal e 15 raios espinhosos na nadadeira dorsal de *G. brasiliensis*); de *G. diamantinensis* pela ausência de mancha escurecida e pequena próxima à origem da nadadeira peitoral (vs. presença de mancha escurecida e pequena próxima à origem da nadadeira peitoral de *G. diamantinensis*); de *G. iporangensis* por possuir a nadadeira caudal com margem distal arredondada e 13 ou 14 raios espinhosos na nadadeira dorsal (vs. nadadeira caudal com margem distal reta e 15 raios espinhosos na nadadeira dorsal de *G. iporangensis*); de *G. itapicuruensis* por possuir a mancha médio-lateral escurecida e arredondada (vs. mancha médio-lateral escurecida e verticalmente elíptica em *G. itapicuruensis*); de *G. multiocellus* pela ausência de pequenas pontuações brilhantes na região central das manchas azuladas da nadadeira caudal (vs. presença de pequenas pontuações brilhantes na região central das manchas azuladas da nadadeira caudal de *G.*

multicellus); de *G. obscurus* por possuir pontuações azuladas e pequenas na região opercular (vs. manchas grandes e azuladas na região opercular de *G. obscurus*); de *G. rufomarginatus* pela ausência pontuações azuladas nos raios moles mais anteriores na nadadeira anal (vs. presença de pontuações azuladas nos raios moles mais anteriores na nadadeira anal de *G. rufomarginatus*); e de *G. santosi* ausência de linhas azuladas e longitudinais na região basal da nadadeira caudal (vs. presença de linhas azuladas e longitudinais na região basal da nadadeira caudal de *G. santosi*).

4.7. Chave de identificação das quatro possíveis espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis* com ocorrência na bacia do Rio Doce

- 1 – Comprimento do último espinho da nadadeira dorsal menor que 14,45% do comprimento padrão.....***Geophagus sp.3 (G. aff. iporangensis)***
- 1' – Comprimento do último espinho da nadadeira dorsal maior que 14,49% do comprimento padrão.....2
- 2 – Nadadeira dorsal com 13 ou 14 raios espinhosos.....***Geophagus sp.4***
- 2' – Nadadeira dorsal com 15 raios espinhosos.....3
- 3 – Comprimento do pedúnculo caudal maior que 12,74% do comprimento padrão.....***Geophagus sp.1 (G. aff. brasiliensis)***
- 3' – Comprimento do pedúnculo caudal menor que 12,24% do comprimento padrão.....***Geophagus sp.2***

5. DISCUSSÃO

Alves-Silva & Dergam (2014) detectaram dois haplogrupos de *G. brasiliensis* na bacia do Rio Doce, sendo um deles formado por haplótipos predominantes nos lagos do Médio Rio Doce (“Lacustrine”) e outro por haplótipos predominantes nos afluentes do Alto e Médio Rio Doce (“Streambed”). Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o haplogrupo “Lacustrine” é geneticamente equivalente à linhagem *G. brasiliensis* L6 e o haplogrupo “Streambed” é geneticamente equivalente à linhagem *G. brasiliensis* L5, e que esses dois haplogrupos podiam representar duas espécies claramente distinguíveis entre si. De fato, os dados obtidos neste estudo indicam que é possível elaborar uma diagnose a partir das combinações de caracteres morfológicos das linhagens *G. brasiliensis* L5 e L6.

Posteriormente, Argolo et al. (2020) detectaram duas espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis* na bacia do Rio Doce (*G. rufomarginatus* e *Geophagus* sp. “Doce”).

Após analisar as sequências comparativas usadas por esses autores, verificamos que as linhagens *G. brasiliensis* L5 e L6 são geneticamente equivalentes às espécies *G. rufomarginatus* e *Geophagus* sp. “Doce” (ambas senso Argolo et al., 2020), respectivamente. No entanto, foi observado neste estudo que os espécimes da linhagem *G. brasiliensis* L5 não possuem pontuações azuladas nos raios moles mais anteriores da nadadeira anal, um caráter presente em *G. rufomarginatus* (Mattos & Costa, 2018), e juntamente com a distância genética de 1,1% entre a linhagem *G. brasiliensis* L5 e *G. rufomarginatus*, isso indica que as amostras do Rio Doce analisadas por Argolo et al. (2020) são geneticamente muito próximas a *G. rufomarginatus*, mas não podem ser consideradas como pertencentes a essa espécie.

Os processos vicariantes entre as bacias hidrográficas podem explicar as relações de parentesco e a diferenciação entre as sequências do gene mitocondrial *COI* das linhagens do complexo de espécies *G. brasiliensis* detectadas na Rio Doce e algumas espécies das bacias costeiras adjacentes (por exemplo, *G. brasiliensis* L2 e *G. rufomarginatus*; *G. brasiliensis* L3 e *G. iporangensis*; *G. brasiliensis* L4 e *G. santosi*). De fato, alguns estudos mostram que existem evidências de conexões entre as paleodrenagens costeiras durante o Pleistoceno e vários eventos de incursões marinhas durante as eras glaciais (transgressões e regressões) que resultaram na perda de conexão entre várias bacias costeiras no leste do Brasil (Ribeiro, 2006; Bloom & Lovejoy, 2011; Thomaz et al., 2015; Thomaz & Knowles, 2018; Pio & Carvalho, 2021), sendo essa separação de bacias hidrográficas o principal fator responsável pelo isolamento de populações de espécies de peixes que seguiram a sua história evolutiva independentemente entre si, e alguns casos, implicou em especiação alopátrica (Buckup, 2011; Pereira et al., 2013a; Machado et al., 2018; Wendt et al., 2019; Souza et al., 2023). Relações de parentesco semelhantes foram observadas em outras espécies presentes nas bacias costeiras no leste do Brasil, no qual espécies como *Astyanax lacustris*, *Hisonotus leucofrenatus*, *Hoplias malabaricus*, *Hypomasticus copelandii* e *Megaleporinos conirostris* são representadas por haplótipos, linhagens ou espécies formando um complexo de espécies que estão amplamente distribuídas nas bacias costeiras adjacentes no sudeste e nordeste do Brasil (Santos et al., 2009; Pereira et al., 2013b; Lucena & Soares, 2016; Ramirez et al., 2017; Thomaz & Knowles, 2018; Pio & Carvalho, 2021; Mendes et al., 2022).

Os processos de formação dos lagos do Médio e do Baixo Rio Doce poderiam explicar as relações de parentesco intimamente próximas entre as duas linhagens detectadas nesses dois sistemas lacustres (*G. brasiliensis* L4 e *G. brasiliensis* L6), uma vez que a formação desses lagos é relativamente recente (entre 10000 e 15000 anos atrás) (Pflug, 1968;

Suguio & Kohler, 1992; Mello et al., 1999; Hatushika et al., 2007), e portanto, a separação entre essas duas linhagens pode ter sido recente, refletindo-se na baixa diferenciação entre as sequências do gene mitocondrial *COI*. Vários lagos na América Central e na África são conhecidos por manter espécies da família Cichlidae isoladas entre si, no qual essas espécies foram isoladas no passado e passaram por processos de especiação ou são representadas por linhagens muito relacionadas entre si (Turner et al., 2001; Kocher, 2004; Stauffer et al., 2006; Fan et al., 2012; Rican et al., 2016).

A partir da descrição original de *Chromis brasiliensis* (atualmente *G. brasiliensis*) e da revisão taxonômica do gênero *Geophagus*, descobrimos que o material-tipo desta espécie possui manchas marrons na nadadeira caudal formando barras escurecidas e transversais nessa nadadeira (Gosse, 1975) e 15 raios espinhosos na nadadeira dorsal (Quoy & Gaimard, 1824), sendo estes dois caracteres compartilhados com as espécies *Geophagus* sp.1 (*G. aff. brasiliensis*) e sp.2, e que o segundo caráter é muito informativo para distinguir *G. brasiliensis* típico da espécie *Geophagus* sp.4, que possui 13 ou 14 raios espinhosos na nadadeira dorsal. Além disso, Mattos & Costa (2018) observaram que a boca em posição subdorsal é uma característica dos topótipos de *G. brasiliensis*, e neste estudo, foi observado que esse caráter não é compartilhado com as espécies *Geophagus* sp.1 (*G. aff. brasiliensis*), sp.2, sp.3 (*G. aff. iporangensis*) e sp.4, que possuem a boca em posição terminal ou subterminal.

Com base nas descrições originais de *Acara gymnopoma*, *A. minuta* e *Chromis unimaculata*, atualmente consideradas três sinonímias de *G. brasiliensis* (Gosse, 1976), consideramos o seguinte: a primeira delas (*A. gymnopoma*), parece ser mais relacionada com *G. rufomarginatus* devido ao padrão de coloração da nadadeira anal e ao número de raios espinhosos na nadadeira dorsal, pois ambas possuem manchas arredondadas e esbranquiçadas na nadadeira anal e 14 raios espinhosos na nadadeira dorsal (Günther, 1862; Mattos & Costa, 2018), entretanto, como não há informações sobre a localidade-tipo exata de *Acara gymnopoma*, logo, esta sinonímia é enigmática; a segunda sinonímia (*A. minuta*), parece ser mais relacionada com *G. iporangensis* devido ao número de escamas na série longitudinal e mediana do corpo (série E1) e à distribuição geográfica, uma vez que ambas possuem 28 escamas na série longitudinal e mediana do corpo e tem distribuição geográfica em sobreposição que inclui a bacia do Rio Ribeira do Iguape e rios costeiros no estado do Rio Grande do Sul (Hensel, 1870; Haseman, 1911; Argolo et al., 2020); já a terceira sinonímia (*C. unimaculata*) parece ser mais relacionada com *G. brasiliensis* típico devido à distribuição geográfica, pois o holótipo dessas duas espécies são provenientes de rios

costeiros no estado do Rio de Janeiro, embora ambas tenham diferenças no número de raios espinhosos da nadadeira dorsal (Quoy & Gaimard, 1824; Castelnau, 1855).

O genoma mitocondrial é herança genética materna, enquanto o genoma nuclear é herança genética materna/paterna e responsável pela manifestação das características fenotípicas (Olson et al., 2009; Souza et al., 2011; Oliveira et al., 2013). Indivíduos híbridos tendem a possuir genoma mitocondrial da espécie materna, enquanto o genoma nuclear e as características morfológicas são das espécies materna e paterna (Oliveira et al., 2006; Almeida-Ferreira et al., 2011).

O alto grau de complexidade deste complexo de espécies na bacia do Rio Doce pode ser demonstrado com as espécies *Geophagus* sp.1 (*G. aff. brasiliensis*) e *G. brasiliensis* típico. As duas espécies possuem distância genética igual a 0% entre as sequências do gene mitocondrial *COI*, mas há uma diferença morfológica entre elas. Ou ainda, se os espécimes de *Geophagus* sp.1 (*G. aff. brasiliensis*) forem provenientes de uma localidade muito próxima à localidade-tipo de *G. brasiliensis* típico e os mesmos foram introduzidos na bacia do Rio Doce recentemente, logo, se ocorrer hibridização entre esses espécimes “não-nativos” e os espécimes nativos do Rio Doce, então poderiam surgir descendentes que tenham sequências do gene mitocondrial *COI* idênticas às sequências dos indivíduos “não-nativos” (*G. brasiliensis* típico), devido à herança genética materna, mas com caracteres morfológicos intermediários compartilhados com os indivíduos nativos do Rio Doce (*Geophagus* sp.1/*G. aff. brasiliensis*), devido à herança genética materna e paterna.

A hipótese sobre a introdução de alguns indivíduos da espécie *G. brasiliensis* na bacia do Rio Doce é viável quando considera-se que esta espécie é frequentemente utilizada em empreendimentos de pisciculturas, aquarismo e pesca comercial (Innes, 1954; Santos & Fontoura, 2000; Bizerril & Primo, 2001; Castellani & Barrella, 2005; Alves et al., 2009; Junior et al., 2011; Bastos et al., 2011; Beatty et al., 2013; Rocha et al., 2019; Medina et al., 2021; Pereira, 2021; Aquarismo Paulista, 2024); é alvo em projetos de reintrodução de peixes nativos em vários rios no Brasil, incluindo o Rio Doce (Lucena, 1983; Mardini, 1983; Mardini & Mardini, 1998; PMBG, 2013; ENERCAN, 2016; DAAE, 2021); e foi introduzida em ambientes aquáticos de outros países devido ao aquarismo (Graaf & Coutts, 2010; Chan et al., 2023). Além disso, Argolo et al. (2020) propõem que introduções recentes podem explicar quando duas populações geneticamente idênticas se encontram em bacias geográficas disjuntas, por exemplo, populações de *G. brasiliensis* ocorrendo em rios no Rio de Janeiro e em rios a norte da foz do Rio São Francisco, em Pernambuco. Da mesma forma, como a bacia do Rio Doce e os rios que deságuam na Baía de Guanabara se encontram em

regiões hidrográficas disjuntas, com a interposição da bacia do Rio Paraíba do Sul (ANA, 2024), a ocorrência de espécimes de *G. brasiliensis* geneticamente idênticos nas bacias do Rio Doce e na Baía de Guanabara devem ser considerados como resultado de introduções antrópicas.

Relatórios técnicos não publicados mostram um agrupamento hierárquico (baseado na distância genética entre as amostras) a partir do sequenciamento de fragmentos de DNA associados a sítios de restrição (RadSeq), e esses resultados indicam a presença de quatro Clusters de *G. brasiliensis* na bacia do Rio Doce: Clusters A, B, C e D (ver **Figura 22, Anexo A**). Um contraste entre esses resultados e os resultados obtidos neste estudo mostraram que algumas amostras agrupadas na linhagem *G. brasiliensis* L4 encontram-se separadas nos Clusters A e B, enquanto algumas amostras das linhagens *G. brasiliensis* L2 e L3 foram agrupadas no Cluster D (ver **Figura 22, Anexo A**). Considerando que o sequenciamento RadSeq é majoritariamente referente ao genoma nuclear nas análises (Andrews et al., 2016), interpretamos estas inconsistências como evidência de hibridização (tanto fluxo gênico recente quanto hibridações mais antigas) entre as linhagens e espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis* na bacia do Rio Doce, na qual, algumas amostras da linhagem *G. brasiliensis* L4 podem apresentar genes nucleares de duas espécies progenitoras enquanto mantém o gene mitocondrial *COI* da linhagem materna de uma das espécies progenitoras.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados moleculares e morfológicos obtidos neste estudo, concluímos que existem sete linhagens e quatro possíveis espécies do complexo de espécies *G. brasiliensis* na bacia do Rio Doce, sendo duas delas ainda não descritas. Também apresentamos evidências que sugerem a introdução de indivíduos de *G. brasiliensis* típico na bacia do Rio Doce e um processo de hibridização entre as linhagens e espécies nesta bacia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albert, J.S. & Reis, R.E. (2011). Historical biogeography of neotropical freshwater fishes. Berkeley and Los Angeles: University of California, 368p.

Albert J.S. et al. (2011). Major Biogeographic and Phylogenetic Patterns. In: Albert, J.S. & Reis, R.E. (2011). Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. California: University of California, p21 – 56.

Albert, J.S. et al. (2018). Upland and lowland fishes: A test of the river capture hypothesis. In: C. Hoorn, A. Perrigo, & A. Antonelli (2018), Mountains, climate and biodiversity, p273 – 294.

Alfaro, M.E. & Holder, M.T. (2006). The posterior and the prior in Bayesian phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37: 19 – 42.

Almeida-Ferreira, G.C. et al. (2011). Spar genetic analysis of two invasive species of *Cichla* (Tucunaré) (Perciformes: Cichlidae) in the Paraná River basin. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 33: 79 – 85.

Alves-Silva, A.P. & Dergam, J.A. (2014). Cryptic speciation within the Neotropical Cichlid *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard 1824) (Teleostei Cichlidae): a new paradigm in karyotypical and molecular Evolution. *Zebrafish*, 12: 91 – 101.

Alves, C. et al. (2009). Ictiofauna capturada por pescadores artesanais na Lagoa Pequena – Região estuarina da Lagoa dos Patos – RS. *Biotemas*, 22: 229 – 234.

ANA (2024). Região Hidrográfica Atlântico Sudeste. Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico. <https://www.gov.br/ana/pt-br/assuntos/gestao-das-aguas/panorama-das-aguas/regioes-hidrograficas/regiao-hidrografica-atlantico-sudeste> Versão eletrônica acessada em fevereiro de 2024.

Andrews, K.R. et al. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17: 81 – 92.

Aquarismo Paulista (2024). Acará Papa Terra (*Geophagus brasiliensis*). <http://www.aquarismopaulista.com/cara-geophagus-brasiliensis/> Versão eletrônica acessada em fevereiro de 2024.

Argolo, L.A. et al. (2020). Unraveling the systematics and evolution of the ‘*Geophagus*’ *brasiliensis* (Cichliformes: Cichlidae) species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 150: 1 – 12.

Barroso, G.F. et al. (2014). The morphometry of Lake Palmas, a deep natural Lake in Brazil. *PLOS ONE*, 9: e111469.

Bastos, R.F. et al. (2011). Diet and food consumption of the pearl cichlid *Geophagus brasiliensis* (Teleostei: Cichlidae): relationships with gender and sexual maturity. *Neotropical Ichthyology*, 9: 825 – 830.

Beatty, S.J. et al. (2013). The tropical South American cichlid, *Geophagus brasiliensis* in Mediterranean climatic south-western Australia. *Aquatic Invasions*, 8: 21 – 36.

Bizerril, C.R.S.F. & Primo, P.B.S. (2001). Peixes de águas interiores do Estado do Rio de Janeiro. Fundação de Estudos do Mar. Rio de Janeiro: FEMAR, 417p.

Bloom, D.D. & Lovejoy, N.R. (2011). The Biogeography of Marine Incursions in South America. In: Albert, J.S. & Reis, R.E. (2011). *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. California: University of California, p137 – 142.

Britski, H.A. et al. (1988). Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). 3ª edição. Brasília: Codevasf, Divisão de Psicultura e Pesca, 115p.

Buckup, P.A. (2011). The Eastern Brazilian Shield. In: Albert, J.S. & Reis, R.E. (2011). *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. California: University of California, p203 – 210.

Carvalho, D.C. et al. (2011a). Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial DNA*, 22: 80 – 86.

Carvalho, D.C. et al. (2011b). DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22: 97 – 105.

Castellani, D. & Barrella, W. (2005). Caracterização da piscicultura na região do Vale do Ribeira-SP. *Ciência e Agrotecnologia*, 29: 168 – 176.

Castelnau, F.L. (1855). Poissons. In: Animaux nouveaux or rares recueillis pendant l'expédition dans les parties centrales de l'Amérique du Sud, de Rio de Janeiro a Lima, et de Lima au Para; exécutée par ordre du gouvernement Français pendant les années 1843 a 1847 ... Part 7, Zoologie. Paris (P. Bertrand), 2: i-xii + 1-112, Pls. 1 – 50.

Chan, J.C. et al. (2023). The non-native freshwater fishes of Hong Kong: diversity, distributions and origins. *Raffles Bulletin of Zoology*, 71: 128 – 168.

Chenna, R. et al. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic acids research*, 31: 3497 – 3500.

DAAE (2021). DAAE promove reprodução de peixes para repovoar rios do Alto Tietê. Departamento de Águas e Energia Elétrica. <http://www.dae.sp.gov.br/site/dae-promove-reproducao-de-peixes-para-repovoar-rios-do-alto-tiete/> Versão eletrônica acessada em fevereiro de 2024.

Davis, J.I. & Nixon, K.C. (1992). Populations, Genetic Variation, and the Delimitation of Phylogenetic Species. *Systematic Biology*, 41: 421 – 435.

Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological journal of the Linnean society*, 85: 407 – 417.

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, 19: 11 – 15.

Dutra, G.M. et al. (2022). Integrative taxonomy reveals a new species of *Cyphocharax* (Characiformes: Curimatidae) from the Upper Paraíba do Sul River basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 20: e220017.

Efron, B. (1987). Better bootstrap confidence intervals. *Journal of the American statistical Association*, 82: 171 – 185.

ENERCAN (2016). Soltura de Peixes Nativos no Rio Canoas. Campos Novos Energia. http://famacom.com.br/wp-content/uploads/2020/05/Folder_Peixes-Nativos_Enercan_vers%C3%A3o-final.pdf Versão eletrônica acessada em fevereiro de 2024.

Fan, S. et al. (2012). Genomics of adaptation and speciation in cichlid fishes: recent advances and analyses in African and Neotropical lineages. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367: 385 – 394.

Feitosa, L.M. et al. (2018). DNA-based identification reveals illegal trade of threatened shark species in a global elasmobranch conservation hotspot. *Scientific reports*, 8: 3347.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783 – 791.

Fricke, R. et al. (2024). Catalog of Fishes: genera, species and references. <https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> Electronic version accessed February 2024.

Godinho, A.L. et al. (1996). Peixes do Parque Estadual do Rio Doce. Belo Horizonte: Instituto Estadual de Florestas, Universidade Federal de Minas Gerais, 48p.

Gosse, J.P. (1975). Révision du genre *Geophagus* (Pisces Cichlidae). *Académie Royal des Sciences d'Outre-Mer, Classe des Sciences Naturelles et Médicales*, 19: 1 – 173.

Graaf, M & Coutts, T. (2010). Invasive potential of a South-American fish species, *Geophagus brasiliensis*, in the Swan River, Western Australia: based on tolerance to instantaneous and gradual changes in salinity. *Journal of the Royal Society of Western Australia*, 93: 147 – 151.

Gubiani, E.A. et al. (2009). Length–length and length–weight relationships for 48 fish species from reservoirs of the Paraná State, Brazil. *Lakes & Reservoirs: Research & Management*, 14: 289 – 299.

Günther, A. (1862). Catalogue of the fishes in the British Museum. Catalogue of the Acanthopterygii, Pharyngognathi and Anacanthini in the collection of the British Museum. British Museum, London, 4: i-xxi + 1 – 534.

Haseman, J.D. (1911). An annotated catalog of the cichlid fishes collected by the expedition of the Carnegie Museum to central South America. Annals of the Carnegie Museum, 7: 329 – 373.

Hatshika, R.S. et al. (2007). Sismoestratigrafia de alta resolução no lago Juparanã, Linhares (ES-Brasil) como base para estudos sobre a sedimentação e tectônica quaternária. Revista Brasileira de Geofísica, 25: 433 – 442.

Hebert, P.D.N. et al. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 270: 313 – 321.

Hebert, P.D.N. et al. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 270: 96 – 99.

Hensel, R. (1870). Beiträge zur Kenntniss der Wirbelthiere Südbrasilens. (Fortsetzung). Archiv für Naturgeschichte, 36: 50 – 91.

Hillis, D.M. & Bull, J.J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. Systematic biology, 42: 182 – 192.

Innes, W.T. (1954). Exotic Aquarium Fishes: A Work of General Reference, 17th ed. Philadelphia, Innes publishing company, 533p.

Junior, H.A. et al. (2011). Pesquisa de comparação entre a taxa de crescimento do Acará *Geophagus brasiliensis* e a Tilápia *Oreochromis niloticus* em condições de monocultivo intensivo utilizando ração e alimento vivo. Revista Electrónica de Veterinária, 12: 1 – 22.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111 – 120.

Kner, R. (1865). *Fische. Reise der österreichischen Fregatte "Novara" um die Erde in den Jahren 1857 – 1859, unter den Befehlen des Commodore B. von Wüllerstorff-Urbain*. Wien. Zool. Theil., 1: 111 – 272.

Kocher, T. (2004). Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nature Reviews Genetics*, 5: 288 – 298.

Kullander, S.O. (1986). Cichlid fishes of the Amazon River drainage of Peru. Swedish Museum of Natural History, Stockholm, 431p.

Lucena, C.A. & Soares, H.G. (2016). Review of species of the *Astyanax bimaculatus* "caudal peduncle spot" subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. *Zootaxa*, 4072: 101 – 125.

Lucena, C.A.S. (1983). Considerações preliminares sobre o crescimento do cará-manteiga *Geophagus brasiliensis*, em açudes (Pisces, Cichlidae). Relatório Interno do Departamento de Pesca, Porto Alegre. In: Mardini, L.B.L.F. & Mardini, C.V. (1998). Ictiofauna da Foz do Rio Maquiné, Terra de Areia, Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, 4: 203 – 209.

Machado, C.B. et al. (2018). Bayesian analyses detect a history of both vicariance and geodispersal in Neotropical freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, 45: 1313 – 1325.

Mardini, L.B.L.F. & Mardini, C.V. (1998). Ictiofauna da Foz do Rio Maquiné, Terra de Areia, Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, 4: 203 – 209.

Mardini, C. (1983). Desova em confinamento do cará-manteiga, *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard 1824) e comentários sobre a espécie. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul. In: Santos, G.O. & Fontoura, N.P (2000). Dinâmica

Reprodutiva de *Geophagus brasiliensis* (QUOY & GAIMARD 1824), no açude Águas Belas, Viamão, Rio Grande do Sul, (TELEOSTEI, CICHLIDAE). Pesquisa Agropecuária Gaúcha – Seção: Recursos Naturais Renováveis, 6: 131 – 144.

Marengoni, N.G. et al. (2006). Extração de DNA genômico em tecidos sólidos de peixes teleósteos Extraction of genomic DNA from solid tissues of teleostei fish. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 27: 99 – 106.

Mattos, J.L.O. & Costa, W.J.E.M. (2018). Three new species of the ‘*Geophagus*’ *brasiliensis* species group from the northeast Brazil (Cichlidae, Geophagini). Zoosystematics and Evolution, 94: 325 – 337.

Mattos, J.L.O. et al. (2015). *Geophagus diamantinensis*, a new species of the *G. brasiliensis* species group from Chapada Diamantina, north-eastern Brazil (Cichlidae: Geophagini). Ichthyological Exploration of Freshwaters, 26: 209 – 220.

Medina, L.D.S. et al. (2021). Growth of *Geophagus brasiliensis* reared at different temperatures and feeding regimes. Boletim do Instituto de Pesca, 47: 1 – 8.

Mello, C.L. et al. (1999). Quaternary sedimentation, neotectonics and the evolution of the Doce river middle valley lake system (southeastern Brazil). Revista do Instituto Geológico, 20: 29 – 36.

Mendes, I.S. et al. (2022). Phylogeography of *Hypomasticus copelandii* (Teleostei, Anostomidae) Reveals Distinct Genetic Lineages along Atlantic Coastal Drainages of Eastern Brazil. Diversity, 14: 1 – 17.

Oliveira, A.V. et al. (2006). Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interspecific hybridization. Journal of Fish Biology, 69: 260 – 277.

Oliveira, J.A. et al. (2013). Sequências de gene mitocondrial para identificação de espécies animais. Revista Colombiana de Ciência Animal, 5: 396 – 407.

Olson, Z.H. et al. (2009). The use of molecular markers in wild sheep research in North America: a review. In: Proceeding of the Northern Wild Sheep and Goat Council Biennial Symposium, 16: 251 – 269.

Pereira, L.H. et al. (2013a). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? BMC genetics, 14: 1 – 14.

Pereira, T.L. et al. (2013b). Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. Journal of Biogeography, 40: 905 – 914.

Pereira, M. et al. (2021). Ictiofauna comercial de Gurupá, Pará Commercial ichthyofauna in Gurupá, Pará. Brazilian Journal of Development, 7: 67015 – 67023.

Pflug, R. (1969). Quaternary lakes or Eastern Brazil. Photogrametria, 24: 29 – 35.

Sarmiento-Soares, L.M. et al. (2012). A fauna de peixes nas bacias do sudeste do Espírito Santo, Brasil. Sitientibus série Ciências Biológicas, 1: 1 – 25.

PIRH (2010). Bacia Hidrográfica do Rio Doce. Plano Integrado de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Rio Doce e Planos de Ações para as Unidades de Planejamento e Gestão de Recursos Hídricos no Âmbito da Bacia do Rio Doce. Volume I – Relatório Final. Consórcio Ecoplan-Lume, 127p.

PMBG (2013). Grupo EDP realiza soltura de peixes na Usina de Mascarenhas. Prefeitura Municipal de Baixo Guandu. <https://pmbg.es.gov.br/grupo-edp-realiza-soltura-de-peixes-na-usina-de-mascarenhas/> Versão eletrônica acessada em fevereiro de 2024.

Quoy, J.R.C. & Gaimard J.P. (1824). Description des Poissons. Chapter IX. In: Freycinet, L. de, Voyage autour du Monde...exécuté sur les corvettes de L. M. "L'Uranie" et "La Physicienne," pendant les années 1817, 1818, 1819 et 1820. Paris. 192 – 401 [1 – 328 in 1824; 329 – 616 in 1825], Atlas pls., 43 – 65.

Ramirez, J.L. et al. (2017). Revealing hidden diversity of the underestimated neotropical ichthyofauna: DNA barcoding in the recently described genus *Megaleporinus* (Characiformes: Anostomidae). *Frontiers in Genetics*, 8: 1 – 11.

Ranwez, V. et al. (2011). MACSE: Multiple Alignment of Coding Sequences accounting for frameshifts and stop codons. *PloS one*, 6: e22594.

Reis, V. & De Pinna, M. (2023). Diversity and systematics of *Trichomycterus* Valenciennes 1832 (Siluriformes: Trichomycteridae) in the Rio Doce Basin: iterating DNA, phylogeny and classical taxonomy. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 197: 344 – 441.

Reis, R.E. et al. (2016). Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of fish biology*, 89: 12 – 47.

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

Rican, O. et al. (2016). Diversity and evolution of the Middle American cichlid fishes (Teleostei: Cichlidae) with revised classification. *Vertebrate Zoology*, 66: 1 – 102.

Rocha, A.F. et al. (2019). Caracterização seminal de carás (*Geophagus brasiliensis*-Cichlidae) induzidos artificialmente. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, 25: 104 – 118.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406 – 425.

Santos, U. et al. (2009). Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. *Journal of Fish Biology*, 75: 2326 – 2343.

Santos, G.O. & Fontoura, N.P. (2000). Dinâmica Reprodutiva de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard 1824), no açude Águas Belas, Viamão, Rio Grande do Sul, (TELEOSTEI, CICHLIDAE). *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, 6: 131 – 144.

Sarmiento-Soares, L.M. et al. (2022). Endemicity Analysis of the Ichthyofauna of the Rio Doce Basin, Southeastern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94: e20210646.

Silvano, R.A. (2020). Fish and fisheries in the Brazilian Amazon: people, ecology and conservation in black and clear water rivers. Springer Nature, 420p.

Souza, I.R. et al. (2011). *Genética evolutiva*. Florianópolis: BIOLOGIA/EAD/UFSC, 231p.

Souza, V. et al. (2023). Phylogeography of *Oligosarcus acutirostris* (Characiformes: Characidae): testing biogeographic hypotheses in the Northeastern Mata Atlântica freshwater ecoregion. *Neotropical Ichthyology*, 21: e220084.

Stauffer, J. et al. (2006). Cichlid fish diversity and speciation. p213 – 225. In: *Reconstructing the Tree of Life: Taxonomy and Systematics of Species Rich Taxa*. T. R. Hodgkinson and J. A. N. Parnell (eds.). Systematics Association Special Series, CRC Press, New York.

Suguió, K. & Kohler, H.C. (1992). Quaternary Barred Lake Systems of the Doce River (Brazil). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 64: 183 – 191.

Suzuki, Y. et al. (2002). Overcredibility of molecular phylogenies obtained by Bayesian phylogenetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 16138 – 16143.

Tamura, K. et al. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab>

Thomaz, A.T. & Knowles, L.L. (2018). Flowing into the unknown: inferred paleodrainages for studying the ichthyofauna of Brazilian coastal rivers. *Neotropical Ichthyology*, 16: e180019.

Thomaz, A.T. et al. (2015). Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: study of a Neotropical fish of the Brazilian coastal Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*, 42: 2389 – 2401.

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

Tresbach, R.H. et al. (2015). DNA barcoding: uma ferramenta de apoio molecular para identificação de espécies de peixes. *Scientia Agraria Paranaensis*, 14: 77 – 81.

Turner, G.F. et al. (2001). How many species of cichlid fishes are there in African lakes? *Molecular ecology*, 10(3): 793 – 806.

Vieira, F. et al. (2015). Peixes do Quadrilátero Ferrífero: guia de identificação. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 208p.

Vieira, F. (2009). Distribuição, impactos ambientais e conservação da fauna de peixes da bacia do rio Doce. Belo Horizonte: MG Biota, 2: 5 – 22.

Ward, R.D. (2009). DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1077 – 1085.

Wendt, E.W. et al. (2019). Phylogenetic relationships and historical biogeography of *Oligosarcus* (Teleostei: Characidae): Examining riverine landscape evolution in southeastern South America. *Molecular phylogenetics and evolution*, 140: 106604.

Wiens, J.J. & Penkrot, T.A. (2002). Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic biology*, 51: 69 – 91.

ANEXO A

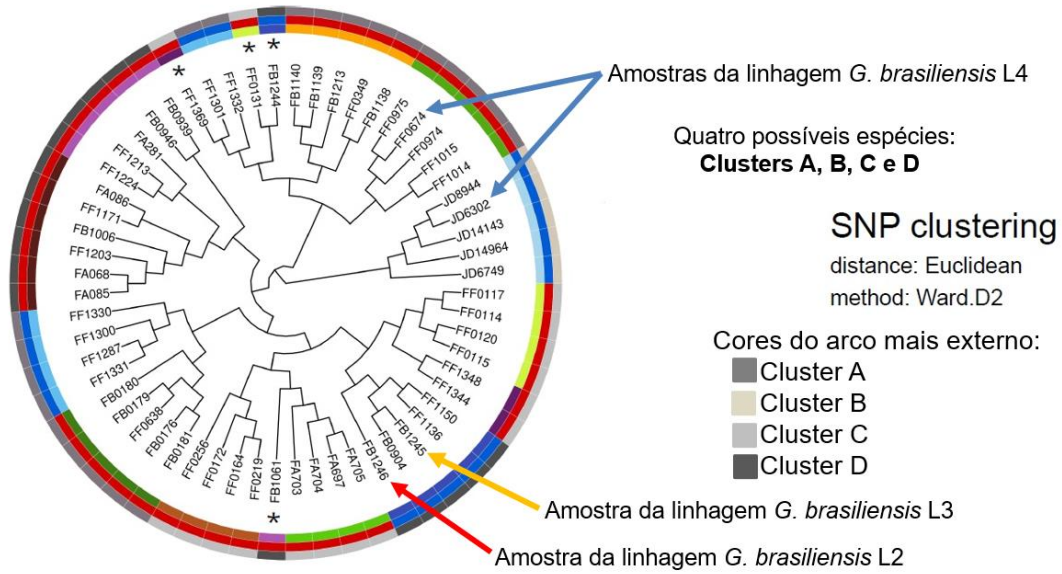


Figura 22: Agrupamento hierárquico das amostras de *G. brasiliensis* da bacia do Rio Doce, a partir do sequenciamento de fragmentos de DNA associados a sítios de restrição (RadSeq). Fonte: Pedro Vidigal (2021).