



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA – PPGEAP

SUELLEN MARIA GALES SERRÃO

**Sistemática Molecular e biogeografia do gênero *Mastiglanis* Bockmann,
1994 (Siluriformes: Heptapteridae)**

Belém – PA
2020

SUELLEN MARIA GALES SERRÃO

**Sistemática Molecular e biogeografia do gênero *Mastiglanis*
Bockmann, 1994 (Siluriformes: Heptapteridae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

Orientador: João Bráullio de Luna Sales

Belém – PA
2020

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

S487s Serrão, Suellen Maria Gales
Sistemática Molecular e biogeografia do gênero *Mastiglanis*
Bockmann, 1994 (Siluriformes: Heptapteridae) / Suellen Maria
Gales Serrão. — 2020.
46 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Ecologia Aquática e Pesca, Núcleo de Ecologia Aquática e Pesca
da Amazônia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2020.

1. Especiação. 2. Peixes neotropicais. 3. Delimitação de
espécies. 4. Glaciações. 5. América do Sul. I. Título.

CDD 576.5

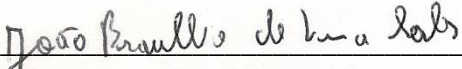
SUELLEN MARIA GALES SERRÃO

**Sistemática Molecular e biogeografia do gênero *Mastiglanis* Bockmann,
1994 (Siluriformes: Heptapteridae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do
Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em
Ecologia Aquática e Pesca.

Data:

Orientador:



Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales
(UFPA – Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade)

Banca examinadora:



Prof. Dr. Claudio de Oliveira
(UNESP-Botucatu)



Prof. Dr. Marcelo Costa Andrade
(UFPA – Núcleo de Ecologia e Pesca da Amazônia)



Prof. Dr. Luis Fernando da Silva Rodrigues Filho
(UFRA – Campus Capanema)

Suplentes:

Prof. Dr. Igor Guerreiro Hamoy
(UFRA – Laboratório de Genética Aplicada)

Prof. Dr. Julio Cesar Pieczarka
(UFPA – Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade)

Belém – PA
2020

AGRADECIMENTOS

Neste espaço agradeço imensamente a cada pessoa que contribuiu de alguma forma durante a minha jornada pelo mundo científico.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Jonathan Stuart Ready e a Prof^a. Dr^a. Wilsea Maria Batista de Figueiredo Ready que me acolheram desde o meu primeiro semestre de graduação e continuam me apoiando até hoje nas mais diversas situações da vida. Espero conseguir recompensar vocês de alguma forma futuramente.

Também sou muito grata ao meu orientador, Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales, que mesmo sem nos conhecermos muito bem aceitou essa missão de me orientar durante este trabalho. Agradeço imensamente por todos os ensinamentos de vida e acadêmicos adquiridos com você durante esses dois anos de convivência.

. Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Andrade por conceder amostras da localidade tipo de *M. asopos* que foram cruciais para a esse estudo. Também deixo aqui a minha gratidão aos curadores das coleções do LBP e ANSP por concederem o material de regiões que não tínhamos acesso enriquecendo ainda mais a pesquisa.

Agradeço aos colegas que fazem parte do Grupo de Investigação Biológica Integrada (GIBI) que ajudaram de alguma forma na realização desse trabalho. Agradeço especialmente: a Cintia Oliveira e a Talita Ribas por todos os trabalhos que fizemos juntas e ainda conseguimos sair para dar uma volta depois; o Derlan Silva que conseguiu coletar minhas amostras em lugares que eu não tinha conseguido pegar nada; o Fabrício dos Anjos e o Luiz Filipe por toda ajuda durante as coletas e o processamento das amostras, e também por todos os lanches que tivemos juntos depois de sair do laboratório de noite. Sem vocês eu não teria conseguido!

Não poderia esquecer de agradecer ao Grupo de Sempre! Os melhores amigos que a graduação podia me dar! Obrigada por todo suporte, carinho e compreensão!

Por último, mas não menos importante, agradeço a minha família que mesmo sem entender muito bem meu trabalho sempre me apoiaram e me incentivaram. Obrigada por tudo!

SUMÁRIO

Capítulo Geral	8
1. INTRODUÇÃO GERAL	8
1.1 DIVERSIDADE DA ICTIOFAUNA NEOTROPICAL E BIOGEOGRAFIA	8
1.2 FAMÍLIA HEPTAPTERIDAE Gill, 1861	9
1.3 GÊNERO <i>MASTIGLANIS</i> Bockmann, 1994	10
2. OBJETIVOS	13
3. REFERÊNCIAS	14
Capítulo 1	18
RESUMO	18
1. INTRODUÇÃO	18
2. MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1 AMOSTRAGEM	20
2.2 EXTRAÇÃO, PCR E SEQUENCIAMENTO	21
2.3 ANÁLISES FILOGENÉTICAS	21
2.4 DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES	22
2.5 TEMPO DE DIVERGÊNCIA	22
3. RESULTADOS	23
3.1 ANÁLISES FILOGENÉTICAS E DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES	23
3.2 ESTIMATIVA DO TEMPO DE DIVERGÊNCIA	25
4. DISCUSSÃO	26
4.1 FILOGENIA DO GÊNERO <i>MASTIGLANIS</i>	26
4.2 HISTÓRIA BIOGEOGRÁFICA DO GÊNERO	28
5. CONCLUSÃO	30
6. AGRADECIMENTOS	30
7. REFERÊNCIAS	31
8. LISTA DE IMAGENS E TABELAS	37

RESUMO

A família Heptapteridae, endêmica da região Neotropical, é composta por indivíduos de tamanhos reduzidos, até espécies de médio porte, possuindo uma grande diversidade dentro da ordem Siluriformes. A maioria dos heptapterídeos apresentam problemas taxonômicos e sistemáticos devido à grande similaridade morfológica entre as espécies, o que em muitos casos está associada a presença de espécies crípticas. O gênero *Mastiglanis*, até recentemente monotípico, é frequentemente identificado de forma errônea em estudos de levantamento de biota e de ecologia como *Imparfinis* por apresentarem características morfológicas semelhantes como barbilhões maxilares longos, nadadeira caudal profundamente furcada e corpo com pouca pigmentação. O presente estudo tem como objetivo realizar a primeira inferência molecular direcionada ao gênero *Mastiglanis*, investigar a monofilia do gênero a partir de dados moleculares, determinar a relação entre as espécies presentes no gênero e entre outros membros da família Heptapteridae, bem como inferir quais eventos biogeográficos possivelmente influenciaram na distribuição atual do gênero. As sequências produzidas para os indivíduos morfológicamente identificáveis como *Mastiglanis asopos* provem de diferentes bacias (Amazonas, Orinoco e Essequibo) da região Neotropical. Com o auxílio das análises de delimitação de espécies (ABGD, GMYC, bPTP) e de filogeografia utilizando o gene ribossomal RNA 16S, observamos que o gênero foi recuperado como monofilético, porém, *M. asopos* não foi recuperado como uma linhagem monofilética, sendo um complexo de espécies contendo 21 espécies putativas. Nossos dados indicam o provável surgimento do gênero durante o Mioceno intermediário, habitando os tributários do Lago Pebas. O primeiro evento de especiação do gênero ocorreu em ~12Ma, provavelmente, devido as introgressões marinhas; as subsequentes diversificações das linhagens ocorreram durante o Mioceno tardio e o Plioceno possivelmente influenciadas por eventos paleogeográficos; e as linhagens mais recentes podem ter se diversificado sob a influência das glaciações que ocorreram durante o Quaternário. O presente estudo é primeiro a abordar os aspectos filogenéticos e biogeográficos do gênero *Mastiglanis*, apontando a presença de linhagens crípticas não descritas ao longo de uma grande área de amostragem. Entretanto, sua ampla área de dispersão no Continente Sul Americano reforça a necessidade de amostragem adicional bem como revisões sistemáticas mais apuradas para a correta descrição e delimitação das novas espécies putativas, o que levará a um aumento significativo na diversidade desta espécie Neotropical.

Palavras-chave: especiação, peixes neotropicais, delimitação de espécies, glaciações, América do Sul.

ABSTRACT

The Heptapteridae family, endemic to the Neotropical region, is composed of individuals of small sizes, even medium-sized species, with great diversity within the order Siluriformes. Most heptapterids have taxonomic and systematic problems due to the great morphological similarity between species, which in many cases is associated with the presence of cryptic species. The genus *Mastiglanis*, until recently monotypic, is frequently wrongly identified in studies of biota and ecology surveys as *Imparfinis* because they present similar morphological characteristics such as long maxillary barbels, deeply forced caudal fin and body with little pigmentation. The present study aims to carry out the first molecular inference directed to the genus *Mastiglanis*, to investigate the monophyly of the genus from molecular data, to determine the relationship between the species present in the genus and among other members of the Heptapteridae family, as well as to infer which biogeographic events possibly influenced the current gender distribution. The sequences produced for individuals morphologically identifiable as *Mastiglanis asopos* come from different basins (Amazonas, Orinoco and Essequibo) in the Neotropical region. With the aid of species delimitation analysis (ABGD, GMYC, bPTP) and phylogeography using the 16S ribosomal RNA gene, we observed that the genus was recovered as monophyletic, however, *M. asopos* was not recovered as a monophyletic lineage, being a complex species containing 21 putative species. Our data indicate the probable emergence of the genus during the Middle Miocene, inhabiting the tributaries of Lake Pebas. The first speciation event of the genus occurred at ~12Ma, probably due to marine introgressions; the subsequent diversification of the lineages occurred during the late Miocene and Pliocene possibly influenced by paleogeographic events; and the more recent lineages may have diversified under the influence of the glaciations that occurred during the Quaternary. The present study is the first to address the phylogenetic and biogeographic aspects of the genus *Mastiglanis*, pointing out the presence of cryptic species not described over a large sampling area. However, its wide area of dispersion in the South American continent reinforces the need for additional sampling as well as more accurate systematic reviews for the correct description and delimitation of the new putative species, which will lead to a significant increase in the diversity of this Neotropical species.

Keywords: speciation, neotropical fish, species delimitation, glaciations, South America.

Capítulo Geral

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 DIVERSIDADE DA ICTIOFAUNA NEOTROPICAL E BIOGEOGRAFIA

A região Neotropical possui uma das maiores riquezas de espécies de peixes de água doce, estimando-se chegar a, aproximadamente, 7.000 espécies distintas na América Central e América do Sul (Albert & Reis, 2011). Estima-se que só na América do Sul estão descritos 5.160 espécies, 739 gêneros, 69 famílias e 20 ordens de peixes de água doce (Reis *et al.*, 2016), sendo que a descoberta de novas espécies para região é constante. As principais bacias hidrográficas são as do rio Amazonas, do rio Orinoco e do rio Paraná-Paraguai, juntas detêm cerca de 3.599 espécies, sendo que a bacia do rio Amazonas possui 111 gêneros e 1.089 espécies endêmicas (Reis *et al.*, 2016).

A diversidade dos peixes neotropicais não está distribuída de forma homogênea. Mais de 90% das espécies de peixes da Amazônia estão distribuídos em apenas quatro ordens: Siluriformes, Characiformes, Perciformes e Cyprinodontiformes (van der Sleen & Albert, 2018). Buckup, Menezes & Ghazzi (2007) catalogaram 2.587 espécies válidas de peixes exclusivamente de água doce presentes no Brasil, sendo que a maior parte está dentro da ordem Siluriformes.

Os Siluriformes são popularmente conhecidos como bagres, cascudos, mandis e peixe-gato, a ordem possui 39 famílias e cerca de 3.981 espécies válidas (Fricke, Eschmeyer & Fong, 2020). Morfologicamente fáceis de serem identificados pois possuem o corpo envolto por pele espessa e/ou coberta por placas ósseas (Britski *et al.*, 1988); nadadeiras raiadas sendo que o primeiro raio das nadadeiras dorsal e peitoral quase sempre apresenta um acúleo; nadadeira adiposa presente e, em geral, bem desenvolvida; e presença de três pares de barbilhões sensitivos (Mees, 1974).

Várias hipóteses tentam explicar o desenvolvimento de tamanha diversidade nos neotrópicos. Dentre as mais aceitas estão: a hipótese do museu (diferenciação alopátrica nos planaltos estáveis e posterior acumulação nas terras baixas; Fjeldså, 1994; Roy *et al.*, 1997; Nores, 1999), a hipótese paleogeográfica (diferenciação alopátrica através de paleoarcos provocada pela dinâmica dos Andes; Räsänen *et al.*, 1990, 1992; Patton *et al.*, 1994; Hoorn *et*

al., 1995; Patton & Da Silva, 1998) e a hipótese do rio (fragmentação das biotas subsequente ao estabelecimento final dos principais canais dos rios da América do Sul; Wallace, 1852; Patton et al., 1994; Bates et al., 1998; Hall & Harvey, 2002).

1.2 FAMÍLIA HEPTAPTERIDAE Gill, 1861

Uma das famílias contidas na ordem Siluriformes que vem sendo alvo de revisões recentes, é a família Heptapteridae, composta por 226 espécies válidas e 24 gêneros (Fricke, Eschmeyer & Fong, 2020). Muitas proposições acerca da origem dessa família foram feitas a partir de dados morfológicos. Inicialmente era apenas um clado não-nomeado, porém monofilético, dentro de Pimelodidae (Lundberg, 1986) composto pelos gêneros *Brachyglanis* Eigenmann, 1912, *Brachyrhamdia* Myers, 1927, *Cetopsorhamdia* Eigenmann & Fisher, 1916, *Goeldiella* Eigenmann & Norris, 1900, *Heptapterus* Bleeker, 1858, *Imparfinis* Eigenmann & Norris, 1900, *Myoglanis* Eigenmann, 1912, *Nannorhamdia*, *Pariolius* Cope, 1872, *Pimelodella* Eigenmann & Eigenmann, 1888, *Pimelodus* Lacépède, 1803, *Rhamdella* Eigenmann & Eigenmann, 1888, *Rhamdia* e *Typhlobagrus*.

Este clado foi nomeado posteriormente por Ferraris (1988) de “*Brachyrhamdia* clade” o qual também reconheceu o sub-clado “*Nemuroglanis*” cujas espécies incluídas não possuem a borda orbital livre e o primeiro raio das nadadeiras peitoral e dorsal mole. Lundberg *et al.*, (1991) propôs a divisão da família Pimelodidae nas subfamílias Pimelodinae, Pseudopimelodinae e Rhamdiinae (sendo que esta subfamília contém o clado *Brachyrhamdia* e ainda adicionou mais 13 gêneros). Porém, De Pinna (1998) eleva Rhamdiinae ao nível de família, Rhamdiidae, que em seguida foi estabelecido como família Heptapteridae (Bockmann & Guazzelli, 2003). Posteriormente, com base em dados moleculares que apoiaram a monofilia do clado ((Pimelodidae, Pseudopimelodidae) Heptapteridae), foi proposto o uso do nome Pimelodoidea como a superfamília que engloba este clado (Hardman, 2005; Sullivan *et al.*, 2006).

Os heptapterídeos podem ser diferenciados dos demais siluriformes por várias características (Mees, 1974; Britski et al., 1988; Bockmann & Guazzelli, 2003) como: pele nua; tamanho pequeno, geralmente 20 cm ou menos de comprimento padrão; narinas bem separadas e sem barbilhões; 3 pares de barbilhões: maxilar e mentonianos interior e exterior; nadadeira adiposa bem desenvolvida; nadadeira caudal extremamente bifurcada, recortada,

arredondada ou lanceolada; membranas branquiais livres, com as aberturas branquiais não restritas; margem orbital livre ou não; e o primeiro raio das nadadeiras dorsal e peitoral variando entre possuir espinhos até completamente flexíveis ou segmentados (Bockmann, 1998).

São organismos endêmicos da região Neotropical e um dos principais componentes da ordem Siluriformes nos rios da América do Sul e Central (Bockmann, 1998). Apresentam adaptações para a vida bentônica e possuem maior atividade durante o crepúsculo e a noite. Durante o dia, buscam refúgio em pedras, folhas e vegetação marginal ou até mesmo escondendo-se na areia. De forma geral são solitários e possuem o hábito alimentar considerado onívoro com tendência a insetivoria. Os membros da família habitam principalmente rios de pequeno porte, em locais com profundidade média ou baixa, quando presentes em rios de grande porte estão associados as margens (Bockmann, 1998).

A sistemática de Heptapteridae ainda permanece sem resoluções definitivas, tendo alguns gêneros com status taxonômico confuso ou não estabelecido. Dentre os gêneros da família apenas *Gladioglanis* (Lundberg *et al.*, 1991), *Mastiglanis* Bockmann, 1994, *Nemuroglanis* (Bockmann & Ferraris, 2005) e *Rhamdella* (Bockmann & Miquelarena, 2008) foram diagnosticados com base na metodologia de análise filogenética, enquanto os demais gêneros foram diagnosticados por uma combinação de caracteres imprecisos e sem características unicamente derivadas (Bockmann & Guazzelli, 2003). Além disso, algumas teses e dissertações abordando a sistemática da família ou de alguns gêneros ainda não foram publicadas (Bockmann, 1998; Guazzelli, 2003; Cunha, 2008; Garcia, 2009; Peixoto, 2011; Slobodian, 2013; Fuster, 2017; Almeida, 2019), dificultando ainda mais o esclarecimento das relações dentro da família, assim como na taxonomia ao nível de espécie.

1.3 GÊNERO *MASTIGLANIS* Bockmann, 1994

O gênero *Mastiglanis* foi descrito por Bockmann (1994), o qual pertence à família Heptapteridae e, até recentemente, era um gênero monotípico formado apenas por *Mastiglanis asopos* Bockmann, 1994. Atualmente, é composto por três espécies morfológicamente válidas, *M. asopos* (Fig. 1), *Mastiglanis durantoni* De Pinna & Keith, 2019 e *Mastiglanis yaguas* Faustino-Fuster & Ortega, 2020, porém possui outras cinco espécies em processo de descrição (Almeida, 2019).

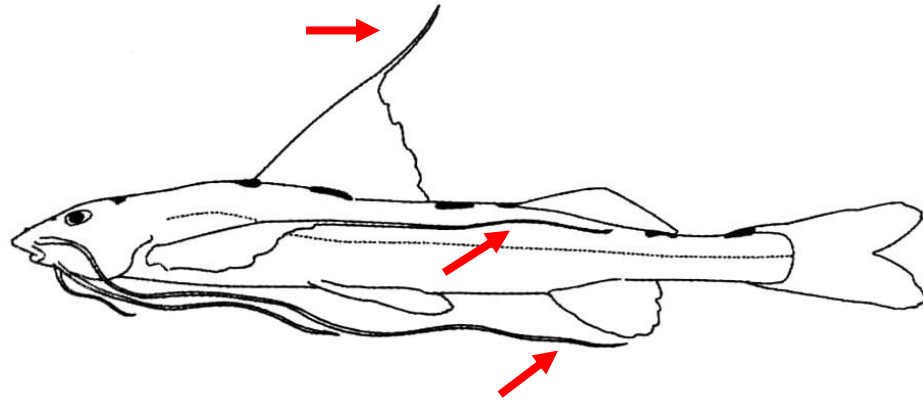


Figura 1. Ilustração do *M. asopos* ressaltando (setas vermelhas) as características externas que separam o grupo: primeiro elemento da nadadeira dorsal e peitoral prolongada em um longo filamento e barbilhões maxilares longos que ultrapassam a origem da nadadeira adiposa. Imagem retirada de Bockmann & Slobodian, 2018.

Os membros do gênero podem ser distinguido dos demais heptapterídeos pelas seguintes sinapomorfias (Bockmann, 1994; De Pinna & Keith, 2019): pigmentação do tegumento bem reduzida; primeiro elemento da nadadeira dorsal prolongada em um longo filamento; primeiro elemento da nadadeira peitoral prolongada em um longo filamento; largura internarinal anterior maior que a posterior; frontal estreito na porção supra-orbital; um processo tipo plataforma orientado anterodorsal na região symphysial da prémaxilla; mesetmoide abruptamente assumindo uma direção invertida no seu comprimento médio; um metapterigóide alongado; uma lâmina na margem anterodorsal do opérculo; porção traseira do osso opercular afilado e curvado ventralmente. Outras características plesiomórficas porém úteis para identificação são: barbilhões maxilares longos que ultrapassam a origem da nadadeira adiposa, boca ventral e nadadeiras peitorais triangulares.

Com a descoberta das novas espécies as autapomorfias de *M. asopos* tornam-se sinapomorfias do gênero. De Pinna & Keith (2019) sugeriram que *M. asopos* seria uma metaespécie (Donoghue, 1985; De Pinna, 1999). Almeida (2019) revisou os caracteres morfológicos que definiam a espécie *M. asopos* e propôs mais cinco novas espécies distintas (temporariamente nomeadas de “*Mastiglanis* sp. n. 1 a sp. n. 6”), sendo que nenhuma corresponde a *M. durantoni* e a espécie “*Mastiglanis* sp. n. 5” corresponde a *M. yaguas*. A autora também propôs uma chave de identificação para o gênero (sem incluir *M. durantoni* pois ambos os estudos foram publicados concomitantemente). Assim, Almeida (2019) observou que a presença de poucos melanóforos restritos a cabeça, a metade dorsal do tronco e a região terminal do pedúnculo caudal é a característica que distingue *M. asopos* de todas as outras espécies por ela proposta.

O gênero é constituído por organismos bentônicos de habitats psamófilos (ambientes aquáticos de fundo arenoso), de atividade noturna e passam o dia enterrados superficialmente na areia (Brejão *et al.*, 2013). Devido a semelhança na estrutura oral e na dentição de *M. asopos* e *M. durantoni*, De Pinna & Keith (2019) sugerem que o forrageio e a alimentação de ambas as espécies são similares. Segundo Zaunon *et al.* (2006), seu comportamento de forrageio é o de emboscada (conhecido como *sit-and-wait*), ele se equilibra na parte inferior e se sustenta por um tripé formado por suas barbatanas pélvicas e anal, espalha seus longos barbilhões e filamentos dorsais e peitorais, formando assim uma espécie de "armadilha de deriva" (Fig. 2), interceptada e lançada contra partículas de comida à deriva. Sua alimentação é composta por pequenas larvas de tricópteros (*Trichoptera* Kirby 1813) e efemerópteros (*Ephemeroptera* Hyatt & Arms, 1891).



Figura 2: Postura de *M. asopos* durante o comportamento de forrageio. Imagem retirada de Zaunon *et al.*, 2006.

M. asopos possui uma larga distribuição na América do Sul, estado presente na bacia do rio Amazonas, rio Orinoco e em drenagens do escudo das Guianas (Bockmann, 1994; Zaunon *et al.*, 2006; Bockmann & Slobodian, 2018). Já *M. durantoni* foi descrito como endêmico dos tributários do Rio Maroni, na Guiana Francesa (De Pinna & Keith, 2019) e *M. yaguas* é encontrada apenas na bacia do Alto Amazonas, no Peru. Apesar de ser um peixe bastante coletado para estudos com ênfase em comunidades aquáticas (Corrêa *et al.*, 2012; Le Bail *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2017), estudos sobre o comportamento reprodutivo, ciclo de vida, desenvolvimento e identificação larval, citogenética e outros aspectos da biologia de *Mastiglanis* ainda são desconhecidos. Além disso, seu reconhecimento taxonômico gera dúvidas sendo confundido com algumas espécies do gênero *Imparfinis* Eigenmann & Norris, 1900. Parte desse problema ocorre devido à falta de caracteres taxonômicos bem definidos

para as espécies de *Imparfinis* o que dificulta a identificação desse gênero, que mesmo com essas dificuldades de identificação, o gênero *Imparfinis* possui 21 espécies reconhecidas enquanto o gênero *Mastiglanis* ainda permanece com apenas três espécies descritas. Dessa forma, mais estudos são necessários para obter uma maior compreensão do gênero *Mastiglanis* e sua relação com os outros gêneros dentro de Heptapteridae.

Em alguns táxons é possível encontrar variações morfológicas dentro de uma população, porém de forma indistinguível entre populações, pois a diferença é menor entre populações do que dentro das populações. Este é um fator limitante para a identificação de novas espécies e, considerando o histórico de análises e problemas de identificação morfológica na família Heptapteridae, pode ser um dos pontos que dificulta a diagnose adequada do gênero *Mastiglanis*. Porém, estudos utilizando dados moleculares para outros gêneros de heptapterídeos já foram realizados e foram de extrema importância para o entendimento de certos gêneros (Ferreira *et al.*, 2014; Ribolli *et al.*, 2017; Usso *et al.*, 2018). Devido a isso, com o auxílio de métodos filogenéticos utilizando o gene ribossomal RNA 16S visamos melhorar o entendimento sobre a definição de espécies presentes no gênero *Mastiglanis* e no entendimento da diversidade, filogenia e biogeografia presentes na amostragem disponibilizada do gênero para esse estudo.

2. OBJETIVOS

Geral: Verificar a presença de linhagens crípticas dentro do gênero *Mastiglanis* bem como o status de linhagem evolutiva distinta em relação a *Imparfinis*. Adicionalmente, inferir se a distribuição das possíveis linhagens encontradas no presente estudo, foram influenciadas por eventos biogeográficos ao longo de sua área de distribuição.

Específicos:

- i) Realizar a primeira inferência molecular direcionada ao gênero *Mastiglanis*;
- ii) Verificar a monofilia do gênero *Mastiglanis* a partir de dados moleculares;
- iii) Determinar a relação entre as espécies presentes no gênero e entre outros membros da família Heptapteridae;
- iv) Verificar quais eventos biogeográficos que influenciaram na distribuição atual do gênero.

3. REFERÊNCIAS

- Albert, J. & Reis, R.E. (2011) Introduction to Neotropical Freshwaters. In: Albert, J. & Reis, R.E. (Eds), *Historical Biogeography on Neotropical Freshwaters Fishes*. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California, pp. 3–19. <http://dx.doi.org/10.1525/california/9780520268685.003.0001>
- BARRETT, Rowan DH; HEBERT, Paul DN. Identifying spiders through DNA barcodes. **Canadian Journal of Zoology**, v. 83, n. 3, p. 481-491, 2005.
- BATES, John M.; HACKETT, Shannon J.; CRACRAFT, Joel. Area-relationships in the Neotropical lowlands: an hypothesis based on raw distributions of Passerine birds. **Journal of biogeography**, v. 25, n. 4, p. 783-793, 1998.
- Bockmann FA, Guazzeli GM (2003) Family Heptapteridae (Heptapterids). In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJJr (Eds) *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Edipucrs, Porto Alegre, 406–431.
- BOCKMANN, Flavio A. PIMELODID CATFISH FROM NORTHERN BRAZIL, WITH COMMENTS ON PHYLOGENETIC-RELATIONSHIPS INSIDE THE SUBFAMILY RHAMDIINAE (SILURIFORMES, PIMELODIDAE). **Proc. Biol. Soc. Wash**, v. 107, n. 4, p. 160-111, 1994.
- BOCKMANN, Flávio Alicino. **Análise filogenética da família Heptapteridae (Teleostei, Ostariophysi, Siluriformes) e redefinição de seus gêneros**. 1998. Tese de Doutorado.
- BOCKMANN, Flávio A.; FERRARIS JR, Carl J. Systematics of the Neotropical catfish genera *Nemuroglanis* Eigenmann and Eigenmann 1889, *Imparales* Schultz 1944, and *Medemichthys* Dahl 1961 (Siluriformes: Heptapteridae). **Copeia**, p. 124-137, 2005.
- BOCKMANN, Flavio A.; MIQUELARENA, Amalia María. Anatomy and phylogenetic relationships of a new catfish species from northeastern Argentina with comments on the phylogenetic relationships of the genus *Rhamdella* Eigenmann and Eigenmann 1888 (Siluriformes, Heptapteridae). **Zootaxa**, v. 1780, 2008.
- BOCKMANN, F. A. & SLOBODIAN, V. 2018. Family Heptapteridae – Three-barbeled Catfishes. pp. 233-252. In: P. van der Sleen and J. Albert, eds. *A Field Guide to the Fishes of the Amazon – Fish Genera of the Amazon, Orinoco and Guianas*. Princeton University Press, Princeton.
- BUCKUP, Paulo Andreas; MENEZES, Naércio Aquino; GHAZZI, Miriam Sant'Anna. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007.
- BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias. 3a. edição. **Ministério da Irrigação, CODEVASF, Minas Gerais, Brasil**, 1988.
- BREJÃO, Gabriel Lourenço; GERHARD, Pedro; ZUANON, Jansen. Functional trophic composition of the ichthyofauna of forest streams in eastern Brazilian Amazon. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 361-373, 2013.
- CORRÊA, Jean Michel; GERHARD, Pedro; FIGUEIREDO, Ricardo de Oliveira. Ictiofauna de igarapés de pequenas bacias de drenagem em área agrícola do Nordeste Paraense, Amazônia Oriental. **Revista Ambiente & Água**, v. 7, n. 2, p. 214-230, 2012.

COSTA, Igor David; OHARA, Willian Massaharu; ALMEIDA, Missilene. Fishes from the Jaru Biological Reserve, Machado River drainage, Madeira River basin, Rondônia State, northern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 17, n. 1, 2017.

CUNHA, Janice Muriel Fernandes Lima da. **Biodiversidade e sistemática molecular de Phreatobiidae (Ostariophysi, Siluriformes) -com uma proposta sobre sua posição filogenética em Siluriformes e uma discussão sobre a evolução do hábito subterrâneo**. 2008. Tese de Doutorado não publicada. Universidade de São Paulo.

DARRIBA, Diego et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, v. 9, n. 8, p. 772-772, 2012.

EIGENMANN, C. H.; NORRIS, A. A. Sobre alguns peixes de S. Paulo, Brazil. **Revista do Museu Paulista**, v. 4, p. 349-362, 1900.

EIGENMANN, Carl H. **The freshwater fishes of British Guiana, including a study of the ecological grouping of species and the relation of the fauna of the plateau to that of the lowlands**. Carnegie Institute, 1912.

FELSENSTEIN, Joseph. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of molecular evolution**, v. 17, n. 6, p. 368-376, 1981.

FERRARIS JR, C. J. Relationships of the Neotropical catfish genus *Nemuroglanis*, with a description of a new species (Osteichthys: Siluriformes: Pimelodidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 101, n. 3, p. 509-516, 1988.

FERREIRA, Milena et al. Cryptic diversity between two *Imparfinis* species (Siluriformes, Heptapteridae) by cytogenetic analysis and DNA barcoding. **Zebrafish**, v. 11, n. 4, p. 306-317, 2014.

FJELDSÅ, Jon. Geographical patterns for relict and young species of birds in Africa and South America and implications for conservation priorities. **Biodiversity & Conservation**, v. 3, n. 3, p. 207-226, 1994.

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; VAN DER LAAN, R. SPECIES BY FAMILY/SUBFAMILY. **California Academy of Sciences, San Francisco, CA, USA** <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Electronic version accessed 16.06.2020., 2020.

GARCIA, Caroline. **Estudos cromossômicos e moleculares em *Rhamdia* (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae): análise de relações evolutivas**. 2009. Tese de Doutorado não publicada. Universidade de São Paulo.

GUAZZELLI, Gizelani Muller. **Relações filogenéticas do gênero *Pimelodella* Eigenmann & Eigenmann 1888 (Siluriformes, Pimelodidae)**. 2003. Tese de Doutorado não publicada. Universidade de São Paulo.

GUINDON, Stéphane et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic biology**, v. 59, n. 3, p. 307-321, 2010.

HALL, Jason PW; HARVEY, Donald J. The phylogeography of Amazonia revisited: new evidence from riodinid butterflies. **Evolution**, v. 56, n. 7, p. 1489-1497, 2002.

- HARDMAN, Michael. The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome b sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 37, n. 3, p. 700-720, 2005.
- HOORN, Carina et al. Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. **Geology**, v. 23, n. 3, p. 237-240, 1995.
- HUBERT, Nicolas; RENNO, Jean-François. Historical biogeography of South American freshwater fishes. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 8, p. 1414-1436, 2006.
- KRESS, W. John et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 23, p. 8369-8374, 2005.
- LE BAIL, Pierre-Yves et al. Updated checklist of the freshwater and estuarine fishes of French Guiana. **Cybium**, v. 36, n. 1, p. 293-319, 2012.
- LUNDBERG, John G. On the South American catfish *Brachyrhamdia imitator* Myers (Siluriformes, Pimelodidae) with phylogenetic evidence for a large intrafamilial lineage. 1986.
- LUNDBERG, John G.; BORNBUSCH, Alan H.; MAGO-LECCIA, Francisco. *Gladioglanis conquistador* n. sp. from Ecuador with diagnoses of the subfamilies Rhamdiinae Bleeker and Pseudopimelodinae n. subf.(Siluriformes: Pimelodidae). **Copeia**, p. 190-209, 1991.
- MEES, Gerlof Fokko. The Auchenipteridae and Pimelodidae of Suriname (Pisces, Nematognathi). 1974.
- NORES, Manuel. An alternative hypothesis for the origin of Amazonian bird diversity. **Journal of Biogeography**, v. 26, n. 3, p. 475-485, 1999.
- PATTON, James L.; DA SILVA, Maria Nazareth F.; MALCOLM, Jay R. Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (Rodentia: Echimyidae) of the Amazon basin: a test of the riverine barrier hypothesis. **Evolution**, v. 48, n. 4, p. 1314-1323, 1994.
- PATTON, J. L. Rivers, refuges and ridges. The geography of speciation of Amazonian mammals. **Endless forms. Species and speciation**, 1998.
- PEIXOTO, Marilena da Silva. **Estudos sobre as relações filogenéticas e biogeográficas das espécies do gênero *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae) Eigenmann & Eigenmann, 1888 do Alto Paraná**. Tese de Doutorado não publicada. Universidade de São Paulo.
- De Pinna MC (1998) Phylogenetic relationships of neotropical siluriforms (Teleostei: Ostariophysii): historical overview and synthesis of hypotheses. In: Malabarba LR, Vari RE, Lucena ZM, Lucena CA (Eds) *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, 279–330.
- RÄSÄNEN, Mati E. et al. Evolution of the western Amazon lowland relief: impact of Andean foreland dynamics. **Terra Nova**, v. 2, n. 4, p. 320-332, 1990.
- RÄSÄNEN, Matti et al. Recent and ancient fluvial deposition systems in the Amazonian foreland basin, Peru. **Geological Magazine**, v. 129, n. 3, p. 293-306, 1992. RIBOLLI, Josiane et al. DNA barcoding confirms the occurrence of *Rhamdia branneri* and *Rhamdia voulezi* (Siluriformes: Heptapteridae) in the Iguaçú River Basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. 1, 2017.
- RIBOLLI, Josiane et al. DNA barcoding confirms the occurrence of *Rhamdia branneri* and *Rhamdia voulezi* (Siluriformes: Heptapteridae) in the Iguaçú River Basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. 1, 2017.

ROY, MICHAEL S. et al. The speciation of South American and African birds in montane regions. In: **Avian molecular evolution and systematics**. Academic Press, 1997. p. 325-343.

REIS, Roberto E. et al. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016.

SULLIVAN, John P.; LUNDBERG, John G.; HARDMAN, Michael. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 41, n. 3, p. 636-662, 2006.

USSO, Mariana Campaner et al. Genetic and chromosomal differentiation of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) revealed by repetitive molecular markers and DNA barcoding. **Zebrafish**, v. 16, n. 1, p. 87-97, 2019.

VAN DER SLEEN, Peter; ALBERT, James S. (Ed.). Field Guide to the Fishes of the Amazon, Orinoco, and Guianas. Princeton University Press, 2018.

WALLACE, Alfred R. On the monkeys of the Amazon. **Annals and Magazine of Natural History**, v. 14, n. 84, p. 451-454, 1854.

ZUANON, Jansen; BOCKMANN, Flávio A.; SAZIMA, Ivan. A remarkable sand-dwelling fish assemblage from central Amazonia, with comments on the evolution of psammophily in South American freshwater fishes. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 1, p. 107-118, 2006.

1 **Capítulo I**

2 Formatado seguindo as normas da revista *Molecular Phylogenetics and Evolution*

3 **Sistemática Molecular e biogeografia do gênero *Mastiglanis* Bockmann,** 4 **1994 (Siluriformes: Heptapteridae)**

5 **RESUMO**

6 A família Heptapteridae, endêmica da região Neotropical, é composta por indivíduos de
7 tamanhos reduzidos, até espécies de médio porte, possuindo uma grande diversidade dentro
8 da ordem Siluriformes. A maioria dos heptapterídeos apresentam problemas taxonômicos e
9 sistemáticos devido à grande similaridade morfológica entre as espécies, o que em muitos
10 casos está associada a presença de espécies crípticas. O gênero *Mastiglanis*, até recentemente
11 monotípico, é frequentemente identificado de forma errônea em estudos de levantamento de
12 biota e de ecologia como *Imparfinis* por apresentarem características morfológicas
13 semelhantes como barbilhões maxilares longos, nadadeira caudal profundamente furcada e
14 corpo com pouca pigmentação. O presente estudo tem como objetivo realizar a primeira
15 inferência molecular direcionada ao gênero *Mastiglanis*, investigar a monofilia do gênero a
16 partir de dados moleculares, determinar a relação entre as espécies presentes no gênero e
17 entre outros membros da família Heptapteridae, bem como inferir quais eventos
18 biogeográficos possivelmente influenciaram na distribuição atual do gênero. As sequências
19 produzidas para os indivíduos morfológicamente identificáveis como *Mastiglanis asopos*
20 provem de diferentes bacias (Amazonas, Orinoco e Essequibo) da região Neotropical. Com o
21 auxílio das análises de delimitação de espécies (ABGD, GMYC, bPTP) e de filogeografia
22 utilizando o gene mitocondrial 16S, observamos que o gênero foi recuperado como
23 monofilético, porém, *M. asopos* não foi recuperado como uma linhagem monofilética, sendo
24 um complexo de espécies contendo 21 espécies putativas. Nossos dados indicam o provável
25 surgimento do gênero durante o Mioceno intermediário, habitando os tributários do Lago
26 Pebas. O primeiro evento de especiação do gênero ocorreu em ~12Ma, provavelmente,
27 devido as introgressões marinhas; as subsequentes diversificações das linhagens ocorreram
28 durante o Mioceno tardio e o Plioceno possivelmente influenciadas por eventos
29 paleogeográficos; e as linhagens mais recentes podem ter se diversificado sob a influência
30 das glaciações que ocorreram durante o Quaternário. O presente estudo é primeiro a abordar
31 os aspectos filogenéticos e biogeográficos do gênero *Mastiglanis*, apontando a presença de
32 linhagens crípticas não descritas ao longo de uma grande área de amostragem. Entretanto, sua
33 ampla área de dispersão no Continente Sul Americano reforça a necessidade de amostragem
34 adicional bem como revisões sistemáticas mais apuradas para a correta descrição e
35 delimitação das novas espécies putativas, o que levará a um aumento significativo na
36 diversidade desta espécie Neotropical.

37 **Palavras-chave:** especiação, peixes neotropicais, delimitação de espécies, glaciações,
38 América do Sul.

39

40 1. INTRODUÇÃO

41 A região Neotropical é conhecida por abrigar uma alta diversidade biológica e dentre
42 os grupos que se destacam, estão as espécies de peixes de água doce compreendendo
43 números estimados superiores a 7.000 espécies (Albert e Reis, 2011). Os principais processos
44 que podem ter promovido essa riqueza de espécies na região da Amazônia e em bacias
45 próximas foram as mudanças no nível do mar, os constantes movimentos tectônicos e vários
46 períodos de flutuações climáticas globais (Lundberg et al., 1998; Hoorn et al., 2010;
47 Wesselingh e Hoorn, 2011). Outros fatores que também atuam na especiação dos grupos de
48 peixes na região são aspectos ecológicos como as características físico-químicas da água
49 (Cooke et al., 2012), fragmentação de habitats (Dias et al., 2013) e temperatura (Hanly et al.,
50 2017).

51 Devido a diferenças nas respostas individuais específicas, a estes fatores, a
52 diversidade dos peixes neotropicais não apresenta uma divisão geográfica homogênea entre
53 os táxons. Mais de 90% das espécies de peixes da Amazônia estão distribuídos em apenas
54 quatro ordens: Siluriformes, Characiformes, Perciformes e Cyprinodontiformes (van der
55 Sleen e Albert, 2018). Destes, a ordem Siluriformes Cuvier, 1817, apresenta uma importância
56 biológica e econômica relevante para a região, sendo atualmente constituídos por 39 famílias
57 e aproximadamente 3.965 espécies válidas (Fricke et al., 2020).

58 Um dos principais clados dentro de Siluriformes é a superfamília Pimelodoidea, que
59 abrange as famílias Heptapteridae, Pimelodidae, Pseudopimelodidae e os gêneros
60 *Phreatobius* e *Conorhynchos*. Segundo Sullivan et al. (2013), as relações internas dentro da
61 superfamília estão dispostas da seguinte forma: ((*Conorhynchos*, Heptapteride),
62 (Pimelodidae, Pseudopimelodidae e *Phreatobius*)), com *Phreatobius* sendo considerado um
63 *incertae sedis*. Os heptapterídeos são o clado mais antigo entre os pimelodoides (Hardman e
64 Lundberg, 2006; Sullivan et al., 2013) e possuem uma grande diversidade de organismos,
65 sendo composto por ~226 espécies válidas e 24 gêneros (Bockmann e Slobodian, 2018;
66 Fricke et al., 2020).

67 Entretanto, a família Heptapteridae permanece sem resoluções internas definitivas e
68 com a presença de alguns gêneros com status taxonômico indeterminado ou não estabelecido,
69 devido à falta de caracteres morfológicos mais informativos (Bockmann e Guazzelli, 2003).
70 Estudos que visam auxiliar no entendimento dos gêneros através de dados moleculares são

71 escassos e restritos a alguns gêneros como *Heptapterus* Bleeker, 1858 (Faustino-Fuster et al.,
72 2019), *Imparfinis* Eigenmann e Norris, 1900 (Ferreira et al., 2014) e *Rhamdia* Bleeker, 1858
73 (Hernandez et al., 2015; Ribolli et al., 2017; Ríos et al., 2017; Angrizani e Malabarba, 2018;
74 Usso et al., 2019).

75 Dentre os gêneros que ainda precisam de uma revisão mais aprofundada, está o
76 gênero *Mastiglanis* proposto por Bockmann, 1994, que até recentemente era monotípico,
77 constituído pela espécie *Mastiglanis asopos* Bockmann, 1994. Originalmente, *M. asopos*
78 possuía uma grande área ocorrência nas bacias dos Rios Amazonas, Orinoco e Essequibo
79 (Bockmann e Slobodian, 2018), ocupando habitats que apresentam muita heterogeneidade
80 geográfica, fatores estes que normalmente provocam especiação em espécies com baixo
81 potencial de dispersão como os membros do gênero *Mastiglanis* (Albert e Reis, 2011).
82 Revisões morfológicas apontam que a diversidade de espécies que compõem o gênero seja
83 maior do que previamente reconhecida (De Pinna e Keith, 2019; Almeida, 2019), tendo estas
84 suspeitas em parte confirmadas recentemente com a descrição da segunda espécie válida para
85 o gênero, *Mastiglanis durantoni* De Pinna e Keith, 2019, espécie atualmente restrita aos
86 tributários do Rio Marouni, na Guiana Francesa. Mesmo com a descrição de *M. durantoni*,
87 De Pinna e Keith (2019) ressaltam que a falta de caracteres autapomórficos para o gênero
88 dificulta a identificação correta e que por meio de apenas diagnose genérica tradicional
89 provavelmente os indivíduos seriam identificados como *Imparfinis* (Bockmann, 1994).

90 De Pinna e Keith (2019) também destacam a necessidade de mais estudos serem
91 conduzidos com foco no gênero, principalmente porque pouco se sabe sobre suas relações
92 filogenéticas e seus padrões biogeográficos. Dessa forma, com o uso do gene ribossomal
93 RNA 16S, o presente estudo possui quatro objetivos: i) realizar a primeira inferência
94 molecular direcionada ao gênero *Mastiglanis*; ii) verificar a monofilia do gênero *Mastiglanis*
95 a partir de dados moleculares; iii) determinar a relação entre as espécies presentes no gênero
96 e entre outros membros da família Heptapteridae; iv) verificar quais eventos biogeográficos
97 que influenciaram na distribuição atual do gênero.

98 2. MATERIAIS E MÉTODOS

99 2.1 Amostragem

100 Um total de 28 novos espécimes de pequenos heptapterídeos foram coletados em
101 drenagens do Rio Guamá, Rio Marapanim, Rio Maracanã, Rio Quatipuru, Rio Caeté e

102 próximo a localidade tipo no Rio Trombetas (PA, Brasil; Figura 1). Com base nas
103 características externas primárias, estes espécimes foram previamente identificados como
104 espécimes de *Mastiglanis* ou *Imparfinis*, sendo atribuídos a estes números de tombo da
105 coleção ictiológica do GPLII, UFPA (Dados suplementares 1). Um pequeno pedaço de tecido
106 muscular foi retirado de cada indivíduo e acondicionado em tubos eppendorfs contendo
107 etanol absoluto, sendo, posteriormente, acondicionados em freezer a -4°C até o momento das
108 extrações de DNA. Adicionalmente aos indivíduos coletados, 66 amostras teciduais
109 identificadas como *M. asopos* representando outras drenagens na América do Sul foram
110 concedidas por diversas coleções (Figura 1; Dados Suplementares 1).

111 Sequências de membros da superfamília Pimelodoidea foram baixadas do portal
112 Genbank e implementadas no banco de dados do presente estudo para composição final do
113 banco de dado. Para a verificação do posicionamento interno de *Mastiglanis* dentro de
114 Heptapteridae, foram incluídos mais oito gêneros da família (*Cetopsorhamdia*,
115 *Chrasmocranus*, *Gladioglanis*, *Goeldiella*, *Heptapterus*, *Imparfinis*, *Myoglanis* *Pimelodella*).
116 Além de representantes das famílias Pimelodidae (*Batrochoglanis*, *Pimelodina* e *Pimelodus*)
117 e Pseudopimelodidae (*Cephalosilurus*, *Lophiosilurus* e *Pseudopimelodus*), incluindo
118 *Phreatobius* e *Conorhyncos*.

119 2.2 Extração, PCR e sequenciamento

120 O isolamento do DNA foi realizado por meio da extração CTAB (Doyle e Doyle,
121 1987), modificado para utilizar apenas clorofórmio e álcool isoamílico (CIAA) na proporção
122 de 1:1. Para amplificar o gene ribossomal RNA 16S foram utilizados os *primers* L1987: 5' -
123 GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC-3' e H2609: 5'-CGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'
124 retirados de Palumbi et al., (1991) nos volumes: H₂O 7,1 µl; dNTP 2,4 µl; Buffer 1,5 µl;
125 MgCl 1,0 µl; *primers* 0,5 µl; Taq 0,2 µl e DNA 2,0 µl, com o volume final de 15 µl. O
126 sequenciamento bidirecional foi realizado utilizando o kit de sequenciamento Big Dye
127 (Applied Biosystems) e as amostras foram sequenciadas no Applied Biosystems 3730XL 96-
128 capillary DNA Analyzer.

129 2.3 Análises filogenéticas

130 O banco de dados do presente estudo foi alinhado utilizando o software Geneious R9
131 (Kearse et al., 2012). Posteriormente, inspeções visuais foram feitas para verificar possíveis
132 erros do alinhamento automático como inserções de gaps em excesso entre os táxons. Para as

133 reconstruções filogenéticas duas inferências diferentes foram utilizadas. Árvores filogenéticas
134 de Máxima Verossimilhança (ML) e de Inferência Baeynsiana (BI) foram geradas nos
135 programas PhyML 3.0 (Guidon et al., 2010) e pelo Mr. Bayes v. 3.2 (Ronquist et al., 2012),
136 respectivamente. Os melhores modelos evolutivos que refletem as taxas de mutação do banco
137 de dados gerado no presente estudo, foram estimados no programa jModelTest 2 (Darriba et
138 al., 2012). O suporte nos ramos da árvore de máxima verossimilhança foi obtido através de
139 1000 pseudo-réplicas de *bootstrap* (Felsenstein, 1985).

140 As árvores de inferências bayesiana foram estimadas com base na amostragem de
141 MCMC (Markov Chain Monte Carlo), sendo realizadas quatro corridas simultâneas com 10
142 milhões de gerações, cada uma consistindo em quatro cadeias (uma fria e três aquecidas). As
143 probabilidades bayesianas *a posteriori* foram definidas utilizando 60% de regra de consenso,
144 sendo amostragem feitas a cada 1000 gerações e 10% das árvores iniciais foram descartadas
145 como *burn-in*. Os parâmetros das corridas foram avaliados no programa Tracer v.1.4
146 (Rambaut e Drummond, 2007) onde apenas corridas com valores de ESS superiores a 200
147 foram utilizados.

148 2.4 Delimitação de espécies

149 Para as análises de delimitação de espécies utilizamos três métodos: inicialmente
150 usamos o método de *threshold* implementado na ferramenta de delimitação de espécies
151 ABGD (*Automatic Barcoding Gap Discovery*) (Puillandre et al., 2012). Adicionalmente dois
152 métodos baseados em coalescência foram utilizados, o GMYC (*General Mixed Yule*
153 *Coalescent*) (Fujisawa e Barraclough, 2013) e por fim o método de bPTP (*Bayesian*
154 *implementation of PTP*) (Zhang et al., 2013). Os resultados de GMYC foram gerados
155 utilizando-se o pacote SPLITS (Ezard et al., 2009) implementado no programa R utilizando-se
156 tanto as opções de *threshold* individual e múltiplos. Para a análise de GMYC, uma árvore
157 ultramétrica sem grupos externos foi gerada no programa BEAST v.1.7.4 (Drummond e
158 Rambaut, 2007) como árvore de *input* para a análise. Uma árvore de ML foi gerada no
159 programa PhyML 3.0 para ser utilizada na análise de bPTP, a qual foi feita no servidor *on-*
160 *line* (<http://species.hits.org/>).

161 2.5 Tempo de divergência

162 Para estimar o tempo de divergência utilizamos o programa BEAST 2 (Bouckaert et
163 al., 2014) e um banco de dados contendo apenas as espécies putativas de *Mastiglanis* e os

164 pontos de calibração. O modelo evolutivo HKY+I+G foi previamente estimado no programa
165 jModelTest 2 para o banco de dados utilizado na estimativa de tempo de divergência. Para o
166 parâmetro *tree prior*, utilizamos Birth Death com relógio estrito (Drummond et al., 2006).
167 Devido à ausência de estudos prévios com especiação de membros da família Heptapteridae,
168 utilizamos como calibrações dois pontos mais gerais para Siluriformes, retirados do trabalho
169 de Sullivan et al. (2013): (i) a separação dos Pimelodidae em relação as outras famílias dentro
170 dos siluriformes (40-30 Ma); e surgimento dos Pseudopimelodidae (15,9-11,5 Ma).

171 Quatro corridas independentes de MCMC foram realizadas com 100 milhões de
172 gerações, com amostragem a cada 1.000 gerações. Apenas corridas com valores de ESS
173 superiores a 200 para todos os parâmetros marginais foram utilizadas, sendo visualizadas no
174 programa Tracer₅ v.1.4 (Rambaut e Drummond, 2007). A árvore de tempo de divergência foi
175 construída no programa TreeAnnotator 2, descartando-se as primeiras 10% das árvores como
176 *burn-in*.

177 3. RESULTADOS

178 3.1 Análises filogenéticas e delimitação de espécies

179 Um total de 612 pares de base do gene ribossomal RNA 16S foram obtidos para o
180 presente estudo. Deste total 108 pares de base foram deletados após o alinhamento final, onde
181 estes continham *indels*, o dificultam o alinhamento do banco de dados. Desta forma, apenas
182 504 pares de base foram utilizados no banco de dados finais. O modelo evolutivo estimado
183 para as reconstruções filogenéticas de ML e IB foi o TIM2ef+I+G para ambas as inferências
184 (-lnL: 2614.1428). As árvores filogenéticas recuperadas para o 16S resultam em topologias
185 similares por ambos os métodos, e assim representamos a síntese de informação de suporte na
186 árvore resultante da Inferência Baesiana (Figura 2).

187 As reconstruções filogenéticas confirmam a monofilia do gênero *Mastiglanis* e a
188 presença de várias linhagens mitocondriais representando unidades geográficas distintas
189 identificadas abaixo do nome de *Mastiglanis asopos* nas coleções ictiológicas. O gênero mais
190 correlacionado com *Mastiglanis* dentro da família é o gênero *Gladioglanis* (valor de suporte
191 acima de 95%), de acordo com o 16S rDNA. Contudo, nossas amostras das bacias dos rios
192 Maracanã, Quatipuru e Caeté estão mais relacionadas com *Imparfinis stictonotus* com um
193 alto valor de suporte (acima de 95%).

194 As análises de delimitação de espécie apresentaram resultados divergentes (Figura 2 -
195 barras verticais). A análise de GMYC separou as amostras em apenas dois grupos e não fez a
196 distinção entre as espécies válidas (*M. asopos*, *M. durantoni* e *M. yaguas*) além de incluí-las
197 no mesmo clado. Os resultados não estão representados em figuras porque houve o
198 agrupamento de somente 11 amostras (MXR38, MXR39, MXR40, MRR43, MRR44,
199 MNR45, MNR46, MIR47, MIR48, MNR49 e MTR97) de partes distintas da árvore
200 filogenética. A análise de bPTP também identificou apenas três grupos, separando *M.*
201 *durantoni* e uma linhagem do Rio Manapiare (Venezuela) das demais amostras.

202 Já a análise com o método ABGD empregando a divergência máxima prévia da
203 diversidade intraespecífica (*prior maximum divergence of intraespecific diversity, P*)
204 $P=0,0028$ (0,28%) apresentou cinco grupos distintos (Figura 2 – ABGD+) sendo que não
205 houve distinção entre as espécies válidas descritas. A análise ABGD utilizando o limiar de
206 partição $P=0.0017$ (0,17%) delimitou vinte e seis grupos (Figura 2 – ABGD-) havendo a
207 distinção das duas espécies válidas *M. asopos* e *M. durantoni*, porém *M. yaguas* apresentou
208 duas espécies distintas, além de alguns dos morfótipos descritos como espécies na dissertação
209 de Almeida (2019). Por ser a única análise de delimitação de espécies que é condizente com
210 as espécies válidas descritas anteriormente baseado em morfologia, seguimos utilizando os
211 resultados de ABGD- como linhagens que representam espécies putativas.

212 O primeiro clado que divergiu dos demais contém as espécies I e II, que também estão
213 identificadas como duas espécies nas análises ABGD+ e ABGD-. O próximo clado a separar
214 dos demais é representado por uma única espécie (III) do Rio Rupununi (Guiana) e é
215 diretamente equivalente a espécie “*Mastiglanis* sp. n. 6” de Almeida (2019). Em seguida, o
216 clado contendo as espécies putativas IV e V (ambas do Peru, mas de tributários distintos)
217 representa uma situação onde o ABGD+ não identificou esse clado como uma espécie e o
218 ABGD- delimitou duas espécies distintas, porém, foram consideradas como um único
219 morfótipo na análise morfológica de Almeida (2019) agrupados na espécie “*Mastiglanis* sp.
220 n. 5” e posteriormente descrita como *M. yaguas*.

221 Em seguida há quatro clados com uma única espécie putativa em cada (VI-IX). O
222 clado contendo a espécie putativa VI com distribuição no Rio Negro e cabeceiras do Rio
223 Orinoco (Manapiare e Ventuari), também foi apoiado como espécie na análise ABGD+. Os
224 clados contendo as espécies putativas VII-VIII (do Rio Madeira) e IX (dos rios Alto Negro e

225 Alto Tapajós) somente foram separados pela análise ABGD-, mas divergiram anteriormente
226 que a especiação do ancestral comum das espécies válidas *M. asopos* e *M. durantoni*.

227 O clado contendo as espécies X-XIII é composto pelas espécies já descritas para o
228 gênero e mais duas espécies (ambas do Rio Preto da Eva). As espécies putativas X e XII
229 formam um grupo monofilético recente, junto com a espécie putativa XI do Rio Trombetas,
230 PA (próximo a localidade tipo e considerada correspondente a espécie *M. asopos*), sendo as
231 únicas espécies que podem pertencer a *M. asopos*. A espécie putativa XIII do Rio Litanie,
232 divisa entre o Suriname e a Guiana Francesa, corresponde a espécie recentemente descrita
233 como *M. durantoni* (Mark H. Sabaj, comunicação pessoal).

234 As demais espécies putativas XIV-XXVI formam dois grandes clados. O primeiro
235 clado contém as espécies putativas XIV-XIX dos rios Xingu e Madeira, sendo que as
236 espécies do Rio Xingu são separadas geograficamente entre as porções superiores e
237 intermediárias do rio, além de um dos seus tributários (Rio Bacajá). O segundo clado com
238 espécies delimitadas pelo ABGD- são oriundas de drenagens do Rio Tocantins e rios
239 costeiros menores perto do lado sul do delta do Rio Amazonas (espécies putativas XXII-
240 XXVI) e um tributário do Rio Orinoco no leste da Venezuela que drena o escudo das guianas
241 (espécie XXI). As espécies putativas II, VI (considerando apenas as amostras dos rios
242 Manapiare e Ventuari), XIX e XX, que possuem o suporte de pelo menos um método de
243 delimitação de espécies, foram analisadas morfológicamente por Almeida (2019) e
244 consideradas como um único morfótipo, sendo descritas como “*Mastiglanis* sp. n. 4”.

245 3.2 Estimativa do tempo de divergência

246 A análise de tempo de divergência sugere que o ancestral do gênero *Mastiglanis*
247 surgiu aproximadamente no médio Mioceno. O primeiro evento cladogênico ocorreu a ~12
248 Ma (Tabela 1; Figura 3 – Nó A), separando o ancestral comum dos Rios Tapajós e Xingu
249 (espécies putativas I e II) com o ancestral das demais linhagens. O segundo evento de ~10 Ma
250 Tabela 1; Figura 3 – Nó B) separou o clado contendo as espécies putativas III (da Guiana), IV
251 e V (do Peru) das espécies VI-XXVI. Duas cladogêneses ocorreram há ~7 Ma, uma
252 separando a espécie putativa III das espécies putativas IV e V (Tabela 1; Figura 3 – Nó E), e
253 outra separando a espécie putativa VI (rios Orinoco e Negro) das espécies VII-XXVI (Tabela
254 2; Figura 3 – Nó D). Eventos do Plioceno, ~4Ma, foram responsáveis por três eventos
255 cladogênicos: o primeiro separou as espécies putativas I e II (Tabela 1; figura 3 – Nó C); o

256 segundo separou linhagens internas na espécie putativa VI (amostras do Rio Manapiare, do
257 leste da Bacia do Orinoco vs. amostras do Rio Ventuari no Alto Orinoco e do Rio Negro;
258 Tabela 1; Figura 3 – Nó G); e o terceiro separou os ancestrais das espécies putativas VII e
259 VIII (do Rio Madeira em Rondônia) e das espécies putativas IX-XXVI (Tabela 1; Figura 3 –
260 Nó F). No fim do Plioceno, ~2.96, houve a separação das espécies putativas XV-XIX (Tabela
261 1; Figura 3 – Nó H) e durante o Pleistoceno houve vários processos de especiação que
262 culminaram na diversificação das espécies putativas VII-XXVI.

263 4. DISCUSSÃO

264 4.1 Filogenia do gênero *Mastiglanis*

265 A família Heptapteridae possui um histórico bem longo de mudanças até ser
266 considerada como uma família de fato. Mesmo com a dificuldade de identificação dos
267 gêneros, Ferraris (1988) propôs a criação do sub-clado *Nemuroglanis*, que posteriormente foi
268 confirmado por Bockmann (1994), com base em caracteres morfológicos. Dentro desse sub-
269 clado estão *Imparfinis*, *Heptapterus*, *Cetopsorhamdia*, *Chasmochanus*, *Mastiglanis* e mais
270 outros sete gêneros. Contudo, nossos resultados mostram que *Mastiglanis* tem como gênero
271 irmão *Gladioglanis*, que não pertence ao sub-clado proposto por Ferraris (1988). Lundberg et
272 al. (1991) sugeriu que *Gladioglanis* compartilhava algumas características com o sub-clado,
273 sendo um possível integrante de *Nemuroglanis*. Com base nisso, nossos dados sugerem que
274 as subdivisões dentro de Heptapteridae necessitam de revisões mais aprofundadas e que
275 integrem dados morfológicos e moleculares.

276 Nossos resultados também revelam uma alta diversidade genética dentro do gênero
277 *Mastiglanis*. A espécie *M. asopos*, espécie tipo para o gênero, não foi recuperada como uma
278 linhagem monofilética e forma um complexo de espécies, como já havia sido hipotetizado
279 durante a descrição de *M. durantoni* (De Pinna e Keith, 2019). As amostras estudadas
280 apresentam estruturação geográfica por drenagem de ocorrência, sugerindo não somente a
281 presença de diversas espécies crípticas dentro da nossa amostragem, mas também a presença
282 de outras espécies crípticas adicionais indisponíveis para este estudo (ou por falta de
283 amostragem, ou porque não foram acessíveis ou identificadas como *Mastiglanis* em
284 coleções).

285 As análises de delimitação de espécies apresentaram cenários diferentes. As análises
286 de GMYC e bPTP, apresentaram poucos grupos distintos e não foram informativos

287 considerando a diversidade morfológica conhecida. Segundo Luo et al. (2018), quando a
288 quantidade de populações presente em um banco é alta e o tempo de divergência entre elas é
289 baixo, como os nossos dados, ambos os métodos se mostram não informativos, além de
290 dependerem circunstancialmente do balanceamento e tamanho da amostragem. Entretanto,
291 análises baseadas em distância, como o ABGD, não apresentam tal tipo de limitação
292 (Dellicour e Flot, 2018) e foi o único método de delimitação de espécies que diferenciou
293 ambas as espécies válidas (ABGD-). Entretanto, no ABGD observamos a discrepância entre a
294 quantidade de grupos em relação ao valor de P , isso ocorre porque, segundo Puillandre et al.
295 (2012), os grupos formados considerando um valor de P maior (ABGD+) derivam de eventos
296 cladogenéticos antigos que são facilmente detectados, enquanto os grupos formados
297 considerando um valor de P menor (ABGD-) derivam de eventos de especiação muito
298 recentes.

299 Algumas das espécies sendo descritas por Almeida (2019) apresentam uma alta
300 variabilidade genética e a adição de novas populações a elas mostra que a resolução
301 taxonômica do gênero ainda está distante. Por exemplo, o caso de “*Mastiglanis* sp. n. 4” de
302 Almeida (2019), foi recuperada como polifilética, com espécies putativas distintas (II, VI,
303 XIX e XX) dentro da sua ampla área de distribuição geográfica; entretanto, a espécie
304 identificada como “*Mastiglanis* sp. n. 5” por Almeida (2019) foi recentemente descrita como
305 *M. yaguas*, apesar de ser monofilética, apresenta linhagens distintas entre os rios Nanay e
306 Itaya (espécies putativas IV e V neste estudo). Por outro lado, a espécie “*Mastiglanis* sp. n. 6”
307 de Almeida (2019) do Rio Rupununi foi recuperada tanto nas análises filogenéticas como no
308 ABGD em ambos os limiares de partição (aqui identificada como espécie putativa III), como
309 grupo monofilético com alto valor de suporte.

310 Esse fenômeno de complexo de espécies crípticas já tem sido evidenciado para outros
311 membros da família Heptapteridae, como em *Rhamdia quelen* (Ríos et al., 2017) e, mais
312 recentemente, em *Heptapterus mustelinus* (Faustino-Fuster et al., 2019). A espécie *R. quelen*
313 também possui uma larga distribuição na América do Sul e devido as dificuldades em
314 identificar os limites que definem a espécie, muitos nomes foram sinonimizados (Silfvergrip,
315 1996; Bockmann e Guazelli, 2003). Porém, com o auxílio da sistemática integrativa, várias
316 espécies já foram removidas do complexo (Hernandez et al., 2015; Ríos et al., 2017;
317 Angrizani e Malabarba, 2018) e a redescrição de *R. quelen* foi recentemente proposta
318 (Angrizani e Malabarba, 2020).

319 Baseado no material disponível e uma interpretação que integra o conhecimento de
320 descrições morfológicas publicadas e análises filogenéticas (incluindo delimitação de
321 espécies), propomos que o gênero consiste de no mínimo as três espécies válidas já descritas,
322 cinco espécies em processo de descrição (Almeida, 2019) e mais 21 espécies putativas
323 adicionais (baseadas no resultado da análise ABGD-).

324 4.2 História biogeográfica do gênero

325 Estudos afirmam que a origem da superfamília Pimelodoidea ocorreu na América do
326 Sul entre 110 e 95 milhões de anos durante o Cretáceo, quando os continentes africano e sul-
327 americano ainda não haviam sido separados completamente (Lundberg et al., 1998; Maysei,
328 2000; Sullivan et al., 2006; Sullivan et al., 2013). Entre 99-78 Ma, houve uma rápida
329 diversificação dos pimelodoides e o primeiro clado a divergir do ancestral foram os
330 heptapiterídeos no final do Cretáceo (Sullivan et al., 2006; Sullivan et al., 2013; Kappas et
331 al., 2016).

332 Nossos dados mostram que a divergência do ancestral do gênero *Mastiglanis* foi bem
333 mais recente, durante o Mioceno. Supomos que esse ancestral habitou tributários nas áreas de
334 conexão entre a bacia de Llanos e o “Lago Pebas”, conforme sugerido por Lundberg et al.
335 (1998). A primeira diversificação das linhagens ocorreu a ~12 Ma (Figura 3 – Nó A),
336 possivelmente um reflexo de uma segunda introgressão marinha que ocorreu na região entre
337 16-12 Ma (Jaramillo et al., 2017) que pode ter isolado populações de tributários distintos.
338 Esse evento pode ter separado populações do sul da distribuição ancestral das demais
339 populações resultando no ancestral das espécies putativas I e II. Não podemos aprofundar
340 sobre a biogeografia desse ramo devido à falta de informação/amostragem dos ancestrais
341 desse clado.

342 Durante o Mioceno inferior houveram vários eventos como: o soerguimento da
343 Cordilheira dos Andes no Noroeste e o soerguimento do Mérida Andes, bloqueando o canal
344 entre o Lago Pebas e o Caribe; a elevação do Arco de Vaupes, que separou a bacia do Rio
345 Amazonas das bacias do Rio Llanos e do Rio Orinoco; a diminuição do nível global do mar;
346 bem como o esfriamento global; o aumento da deposição de sedimentos do Andes; e a
347 formação do Sistema Acre (Lundberg et al., 1998; Figueiredo et al., 2009; Hoorn et al., 2010;
348 Bloom & Lovejoy, 2011; Albert et al., 2018). Esses processos de mudança de ambiente

349 podem ter culminado na especiação do ancestral das espécies putativas III, IV e V, do
350 ancestral das demais espécies a ~10 Ma (Figura 3 – Nó B).

351 Ainda no Mioceno inferior, entre 9.4 Ma e 9 Ma, houve o rompimento do Arco do
352 Purus, levando ao estabelecimento do fluxo transcontinental do Rio Amazonas (Hoorn et al.,
353 2017; Albert et al., 2018). Entre ~8-6 Ma houve o eventual desaparecimento das grandes
354 áreas alagadas na Amazônia ocidental, levando ao declínio do Sistema Acre, e, devido a
355 principal fonte de sedimentos do Rio Amazonas serem advindos da erosão dos Andes, houve
356 uma mudança de componentes do substrato (Hoorn et al., 1993; Figueiredo et al., 2009;
357 Hoorn et al., 2010) e o padrão de distribuição de muitos pequenos tributários na planície de
358 inundação. Esses eventos podem ter influenciado na especiação dos ancestrais das espécies
359 putativas III (isolado nas drenagens do norte), IV e V nas cabeceiras no oeste do novo Rio
360 Amazonas (Figura 3 – Nó E), assim como pode ter influenciado na separação do ancestral da
361 espécie putativa VI (drenagens do norte) do ancestral das demais espécies válidas e putativas
362 (VII-XXVI) no Rio Amazonas (Figura 3 – Nó D). Porém, algumas amostras potencialmente
363 representam colonização cruzada posterior entre essas bacias (amostra MNR103 pode ter
364 colonizado do Norte para o Sul e MMR54 do Sul para o Norte).

365 Segundo Aalto et al. (2006), o fluxo de sedimentos advindos dos Andes em direção a
366 Amazônia não era contínuo, resultando em pulsos de deposição em direção ao leste. Durante
367 o Plioceno (~4 Ma) houve a elevação do Arco Fitzcarrald gerando a compartimentalização da
368 Amazônia ocidental, separando o Rio Madeira do Rio Amazonas (Espurt et al. 2007). Com o
369 isolamento de rio Amazonas pelos Arcos de Vaupes e Fitzcarrald, a entrada de sedimentos no
370 rio aumentou (Espurt et al., 2010). Esse evento pode ter influenciado a diversificação do
371 ancestral das espécies VII e VIII, no atual Rio Madeira (Figura 3 – Nó F). Nesse mesmo
372 período (~4 Ma), houve a diferenciação entre as localidades que fazem parte da espécie VI
373 (Figura 3 – Nó G), porém, sem maior amostragem não podemos discutir a história desse
374 grupo. Uma análise aprofundada de *Mastiglanis* das cabeceiras do Orinoco e Negro pode ser
375 uma valiosa para ajudar a definir datação da formação do canal Casiquiare, que até então não
376 tem datação estabelecida (Winemiller et al., 2008). Durante a transição entre o Plioceno para
377 o Pleistoceno foi uma fase de consolidação do Rio Amazonas transcontinental e de flutuações
378 climáticas devido aos períodos glaciais-interglaciais. Ao longo desse período houve uma
379 rápida diversificação do gênero (Figura 3 – Nó G), onde também podemos observar uma
380 estruturação genética em pontos próximos do mesmo rio. Segundo Ochoa et al. (2015), as

381 glaciações promoveram o isolamento de drenagens e fragmentação de habitats o que
382 influenciou na estruturação genética das populações de peixes com baixa capacidade de
383 dispersão.

384 5. CONCLUSÃO

385 O presente estudo é o primeiro a abordar os aspectos filogeográficos do gênero
386 *Mastiglanis*, a inferir possíveis eventos que levaram a diversificação desses heptapterídeos
387 que estão distribuídos amplamente pela região Neotropical e a definir, por meios
388 filogenéticos, *Mastiglanis asopos* como complexo de espécies. Diferente do que foi proposto
389 por meios morfológicos, o gênero irmão de *Mastiglanis* deve ser o gênero *Gladioglanis*,
390 sendo que o *Imparfinis* foi recuperado como irmão de ambos. Além das três espécies válidas,
391 cinco espécies em processo de descrição, propomos mais 21 espécies putativas adicionais
392 para o gênero. Com base nos nossos dados, o ancestral de *Mastiglanis* surgiu no Mioceno
393 intermediário nos tributários ao redor da região do Lago Pebas. Diversos eventos
394 paleogeográficos que podem ter levado a especiação dentro do gênero incluindo as incursões
395 marinhas, os pulsos de deposição de sedimentos advindos dos Andes durante a transição entre
396 o Mioceno inferior e o Plioceno, e as glaciações que ocorreram durante o Pleistoceno. Ainda
397 assim, o estudo demonstra que a diversidade desse grupo ainda é muito subestimada e mais
398 esforço amostral, bem como a integração de dados morfológicos e genéticos, são necessários
399 para esclarecer os componentes e suas relações dentro do gênero.

400 6. AGRADECIMENTOS

401 Agradecemos imensamente a todos que nos ajudaram a obter as amostras presentes nesse
402 estudo, especialmente ao Professor Marcelo Costa Andrade (UFPA-Campus Belém, Brasil)
403 por fornecer espécimes de *M. asopos* provenientes de localidades que não tínhamos acesso. O
404 presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
405 Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

406

407

408

409

410 7. REFERÊNCIAS

- 411 Aalto, R., Dunne, T., Guyot, J. L. 2006. Geomorphic controls on Andean denudation
412 rates. *The Journal of Geology*, 114(1), 85-99.
- 413 Albert, J. S., & Reis, R. (Eds.). 2011. Historical biogeography of Neotropical freshwater
414 fishes. Univ of California Press.
- 415 Albert, J. S., Val, P., Hoorn, C. 2018. The changing course of the Amazon River in the
416 Neogene: center stage for Neotropical diversification. *Neotropical Ichthyology*, 16(3).
- 417 Almeida, M. A. 2019. Revisão taxonômica e descrição da musculatura cefálica do gênero
418 *Mastiglanis* Bockmann, 1994 (Siluriformes: Heptapteridae) (Dissertação de Mestrado não
419 publicada, Universidade de São Paulo).
- 420 Angrizani, R. C., Malabarba, L. R. 2018. Morphology and molecular data reveal the presence
421 of two new species under *Rhamdia quelen* (Quoy Gaimard, 1824) (Siluriformes:
422 Heptapteridae) species complex. *Zootaxa*, 4388(1), 44-60.
- 423 Angrizani, R. C., Malabarba, L. R. 2020. Genetic diversity and species delimitation in
424 *Rhamdia* (Siluriformes: Heptapteridae) in South America, with a redescription of *R. quelen*
425 (Quoy & Gaimard, 1824). *Zootaxa*, 4801(1), 85-104.
- 426 Bockmann, F. A. 1994. PIMELODID CATFISH FROM NORTHERN BRAZIL, WITH
427 COMMENTS ON PHYLOGENETIC. *Proc. Biol. Soc. Wash*, 107(4), 160-111.
- 428 Bockmann, F. A., Guazzelli, G. M. 2003. Family Heptapteridae (pp. 406–431). Checklist of
429 the freshwater fishes of South and Central America. Editora da Pontifícia Universidade
430 Católica do Rio Grande do Sul–EDIPUCRS, Porto Alegre.
- 431 Bockmann, F. A., Slobodian, V. 2017. Family Heptapteridae – Three-barbeled Catfishes. pp.
432 233-252. In: P. van der Sleen and J. Albert, eds. *A Field Guide to the Fishes of the Amazon –*
433 *Fish Genera of the Amazon, Orinoco and Guianas*. Princeton University Press, Princeton.
- 434 Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C. H., Xie, D., Suchard, M. A.,
435 Rambaut, A., Drummond, A. J., 2014. BEAST 2: a software platform for Bayesian
436 evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*, 10(4), e1003537.

- 437 Bloom, D. D., Lovejoy, N. R. 2011. The biogeography of marine incursions in South
438 America. *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes*, 137-144.
- 439 Cooke, G. M., Chao, N. L., Beheregaray, L. B. 2012. Marine incursions, cryptic species and
440 ecological diversification in Amazonia: the biogeographic history of the croaker genus
441 *Plagioscion* (Sciaenidae). *Journal of Biogeography*, 39(4), 724-738.
- 442 Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new
443 heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772-772.
- 444 De Pinna, M., Keith, P. 2019. *Mastiglanis durantoni* from French Guyana, a second species in
445 the genus (Siluriformes: Heptapteridae), with a CT scan survey of phylogenetically-relevant
446 characters. *Cybiuim: Revue Internationale d'Ichtyologie*, 43, 125-135.
- 447 Dellicour, S., Flot, J. F. 2018. The hitchhiker's guide to single-locus species delimitation.
448 *Molecular Ecology Resources*, 18(6), 1234-1246.
- 449 Dias, M. S., Cornu, J. F., Oberdorff, T., Lasso, C. A., Tedesco, P. A. 2013. Natural
450 fragmentation in river networks as a driver of speciation for freshwater fishes. *Ecography*,
451 36(6), 683-689.
- 452 Doyle, J. J., Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh
453 leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- 454 Drummond, A. J., Ho, S. Y., Phillips, M. J., Rambaut A., 2006. Relaxed phylogenetics and
455 dating with confidence. *PLoS Biology*, 4(5), e88.
- 456 Drummond, A. J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling
457 trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 214.
- 458 Espurt, N., Baby, P., Brusset, S., Roddaz, M., Hermoza, W., Regard, V., Antoine, P. O.,
459 Salas-Gismondi, R., Bolaños, R. 2007. How does the Nazca Ridge subduction influence the
460 modern Amazonian foreland basin?. *Geology*, 35(6), 515-518.
- 461 Espurt, N., Baby, P., Brusset, S., Roddaz, M., Hermoza, W., Barbarand, J. 2010. The Nazca
462 Ridge and uplift of the Fitzcarrald Arch: implications for regional geology in northern South
463 America. *Amazonia: Landscape and Species Evolution: A Look into the Past*. Wiley-
464 Blackwell, 89-100.

- 465 Ezard, T., Fujisawa, T., Barraclough, T. G. 2009. splits: SPecies' Limits by Threshold
466 Statistics. R package version 1.0-14/r31.
- 467 Faustino-Fuster, D. R., Bockmann, F. A., Malabarba, L. R. 2019. Two new species of
468 Heptapterus (Siluriformes: Heptapteridae) from the Uruguay River basin, Brazil. *Journal of*
469 *Fish Biology*, 94(3), 352-373.
- 470 Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood
471 approach. *Journal of molecular evolution*, 17(6), 368-376.
- 472 Ferraris Jr, C. J. 1988. Relationships of the Neotropical catfish genus *Nemuroglanis*, with a
473 description of a new species (Osteichthys: Siluriformes: Pimelodidae). *Proceedings of the*
474 *Biological Society of Washington*, 101(3), 509-516.
- 475 Ferreira, M., Kavalco, K. F., de Almeida-Toledo, L. F., Garcia, C. 2014. Cryptic diversity
476 between two *Imparfinis* species (Siluriformes, Heptapteridae) by cytogenetic analysis and
477 DNA barcoding. *Zebrafish*, 11(4), 306-317.
- 478 Figueiredo, J., Hoorn, C., Van der Ven, P., Soares, E. 2009. Late Miocene onset of the
479 Amazon River and the Amazon deep-sea fan: Evidence from the Foz do Amazonas Basin.
480 *Geology*, 37(7), 619-622.
- 481 Fujisawa T., Barraclough T. G. 2013. Delimiting species using single-locus data and the
482 Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated
483 data sets. *Systematic Biology*, 62(5), 707-724.
- 484 Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O. 2010. New
485 algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the
486 performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307-321.
- 487 Hanly, P. J., Mittelbach, G. G., Schemske, D. W. 2017. Speciation and the latitudinal
488 diversity gradient: Insights from the global distribution of endemic fish. *The American*
489 *Naturalist*, 189(6), 604-615.
- 490 Hernández, C. L., Ortega-Lara, A., Sánchez-Garcés, G. C., Alford, M. H. 2015. Genetic and
491 morphometric evidence for the recognition of several recently synonymized species of trans-
492 Andean *Rhamdia* (Pisces: Siluriformes: Heptapteridae). *Copeia*, 103(3), 563-579.

- 493 Hoorn, Carina. 1993. Marine incursions and the influence of Andean tectonics on the
494 Miocene depositional history of northwestern Amazonia: results of a palynostratigraphic
495 study. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, v. 105, n. 3-4, p. 267-309.
- 496 Hoorn, C., Wesselingh, F. P., Ter Steege, H., Bermudez, M. A., Mora, A., Sevink, J.,
497 Sanmartín, I., Sanchez-Meseguer, A., Anderson, C. L., Figueiredo, J. P., Jaramillo, C., Riff,
498 D., Negri, F. R., Hooghiemstra, H., Lundberg, J. Stadler, T., Särkinen, T., Antonelli, A. 2010.
499 Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and
500 biodiversity. *Science*, 330(6006), 927-931.
- 501 Hoorn, C., Bogotá-A, G. R., Romero-Baez, M., Lammertsma, E. I., Flantua, S. G., Dantas, E.
502 L., Dino, R., do Carmo, D. A., Chemale Jr, F. 2017. The Amazon at sea: Onset and stages of
503 the Amazon River from a marine record, with special reference to Neogene plant turnover in
504 the drainage basin. *Global and Planetary Change*, 153, 51-65.
- 505 Jaramillo, C., Romero, I., D'Apolito, C., Bayona, G., Duarte, E., Louwye, S., Escobar, J.,
506 Luque, J., Carrilo-Briceño, J. D., Zapata, V., Mora, A., Schouten, S., Zavada, M., Harrington,
507 G., Ortiz, J. Wesselingh, F. P. 2017. Miocene flooding events of western Amazonia. *Science*
508 *advances*, 3(5), e1601693.
- 509 Kappas, I., Vittas, S., Pantzartzi, C. N., Drosopoulou, E., Scouras, Z. G. 2016. A time-
510 calibrated mitogenome phylogeny of catfish (Teleostei: Siluriformes). *PLoS One*, 11(12),
511 e0166988.
- 512 Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S.,
513 Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A.
514 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the
515 organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- 516 Lundberg, J. G., Bornbusch, A. H., Mago-Leccia, F. 1991. *Gladioglanis conquistador* n. sp.
517 from Ecuador with diagnoses of the subfamilies Rhamdiinae Bleeker and Pseudopimelodinae
518 n. subf.(Siluriformes: Pimelodidae). *Copeia*, 190-209.
- 519 Lundberg, J. G., Marshall, L. G., Guerrero, J., Horton, B., Malabarba, M. C. S. L.,
520 Wesselingh, F. 1998. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical
521 South American rivers. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, 27, 13-48.

- 522 Luo, A., Ling, C., Ho, S. Y., Zhu, C. D. 2018. Comparison of methods for molecular species
523 delimitation across a range of speciation scenarios. *Systematic Biology*, 67(5), 830-846.
- 524 Ochoa, L. E., Pereira, L. H. G., Costa-Silva, G. J., Roxo, F. F., Batista, J. S., Formiga, K.,
525 Foresti, F., Oliveira, C. 2015. Genetic structure and historical diversification of catfish
526 *Brachyplatystoma platynemum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Amazon basin with
527 implications for its conservation. *Ecology and Evolution*, 5(10), 2005-2020.
- 528 Palumbi, S., Martin, A., Romano, S. 1991. 16s RNA primers. The simple fool's guide to
529 PCR, version, 2, 28.
- 530 Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., Achaz, G., 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap
531 Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1864-1877.
- 532 Rambaut, A., Drummond, A. J. 2007. Tracer v1. 4: MCMC trace analyses tool.
- 533 Ribolli, J., Scaranto, B. M., Shibatta, O. A., Bombardelli, R. A., Zaniboni-Filho, E. 2017.
534 DNA barcoding confirms the occurrence of *Rhamdia branneri* and *Rhamdia voulezi*
535 (Siluriformes: Heptapteridae) in the Iguaçu River Basin. *Neotropical Ichthyology*, 15(1).
- 536 Ríos, N., Bouza, C., Gutiérrez, V., García, G. 2017. Species complex delimitation and
537 patterns of population structure at different geographic scales in Neotropical silver catfish
538 (*Rhamdia*: Heptapteridae). *Environmental Biology of Fishes*, 100(9), 1047-1067.
- 539 Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Hohn, S., Larget, B.,
540 Liu, L., Suchard, M., Huelsenbeck, J. P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic
541 inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 22, 539-542,
542 doi: 10.1093/sysbio/sys029.
- 543 Silfvergrip, A. 1996. A systematic revision of the Neotropical catfish genus *Rhamdia*
544 (Teleostei, Pimelodidae). (Tese de Doutorado não publicada, Universidade de Stockholm).
- 545 Sullivan, J. P., Lundberg, J. G., Hardman, M. 2006. A phylogenetic analysis of the major
546 groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences.
547 *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(3), 636-662.
- 548 Sullivan, J. P., Muriel-Cunha, J., Lundberg, J. G. 2013. Phylogenetic relationships and
549 molecular dating of the major groups of catfishes of the Neotropical superfamily

- 550 Pimelodoidea (Teleostei, Siluriformes). Proceedings of the Academy of Natural Sciences of
551 Philadelphia, 89-110.
- 552 Usso, M. C., Santos, A. R. D., Gouveia, J. G., Frantine-Silva, W., Araya-Jaime, C., Oliveira,
553 M. L. M. D., Foresti, F., Giuliano-Caetano, L., Dias, A. L. 2019. Genetic and chromosomal
554 differentiation of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) revealed by repetitive
555 molecular markers and DNA barcoding. *Zebrafish*, 16(1), 87-97.
- 556 van der Sleen, P., Albert, J. S. (Eds.). 2017. Field guide to the fishes of the Amazon, Orinoco,
557 and Guianas (Vol. 115). Princeton University Press.
- 558 Wesselingh, F. P., Hoorn, C. 2011. Geological development of Amazon and Orinoco basins.
- 559 Winemiller, K. O., López-Fernández, H., Taphorn, D. C., Nico, L. G., Duque, A. B. 2008.
560 Fish assemblages of the Casiquiare River, a corridor and zoogeographical filter for dispersal
561 between the Orinoco and Amazon basins. *Journal of Biogeography*, 35(9), 1551-1563.
- 562 Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., Stamatakis, A., 2013. A general species delimitation method
563 with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869-2876.

8. LISTA DE IMAGENS E TABELAS

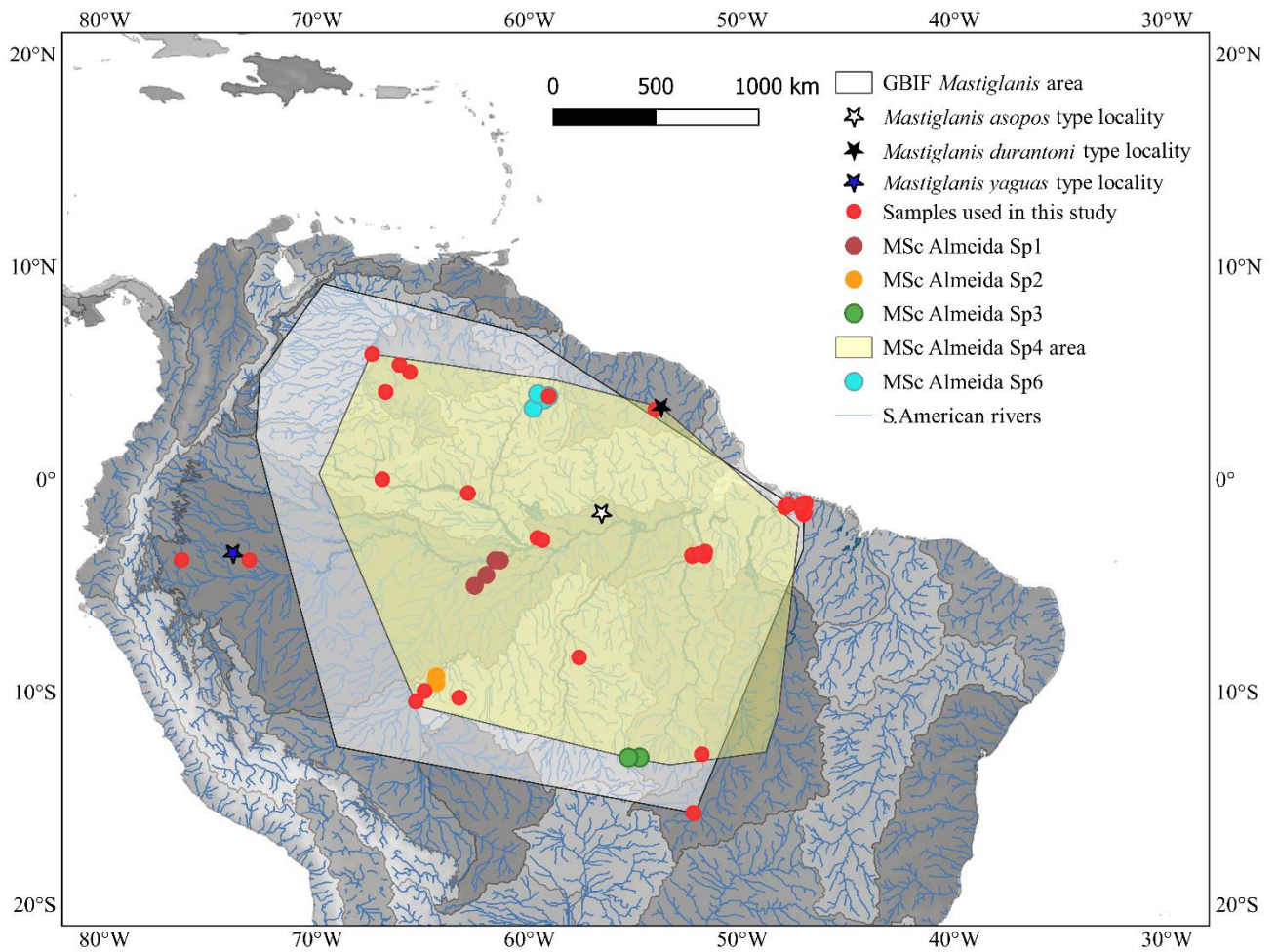


Figura 1. Mapa mostrando: a distribuição de *Mastiglanis* segundo o GBIF (<https://www.gbif.org/>; área branca); pontos de amostragem ou distribuição das cinco espécies propostas por Almeida (2019); pontos de amostragem do presente estudo (círculos vermelhos); e localidades tipo de *M. asopos* (estrela branca), de *M. durantoni* (estrela preta) e de *M. yaguas* (estrela azul).

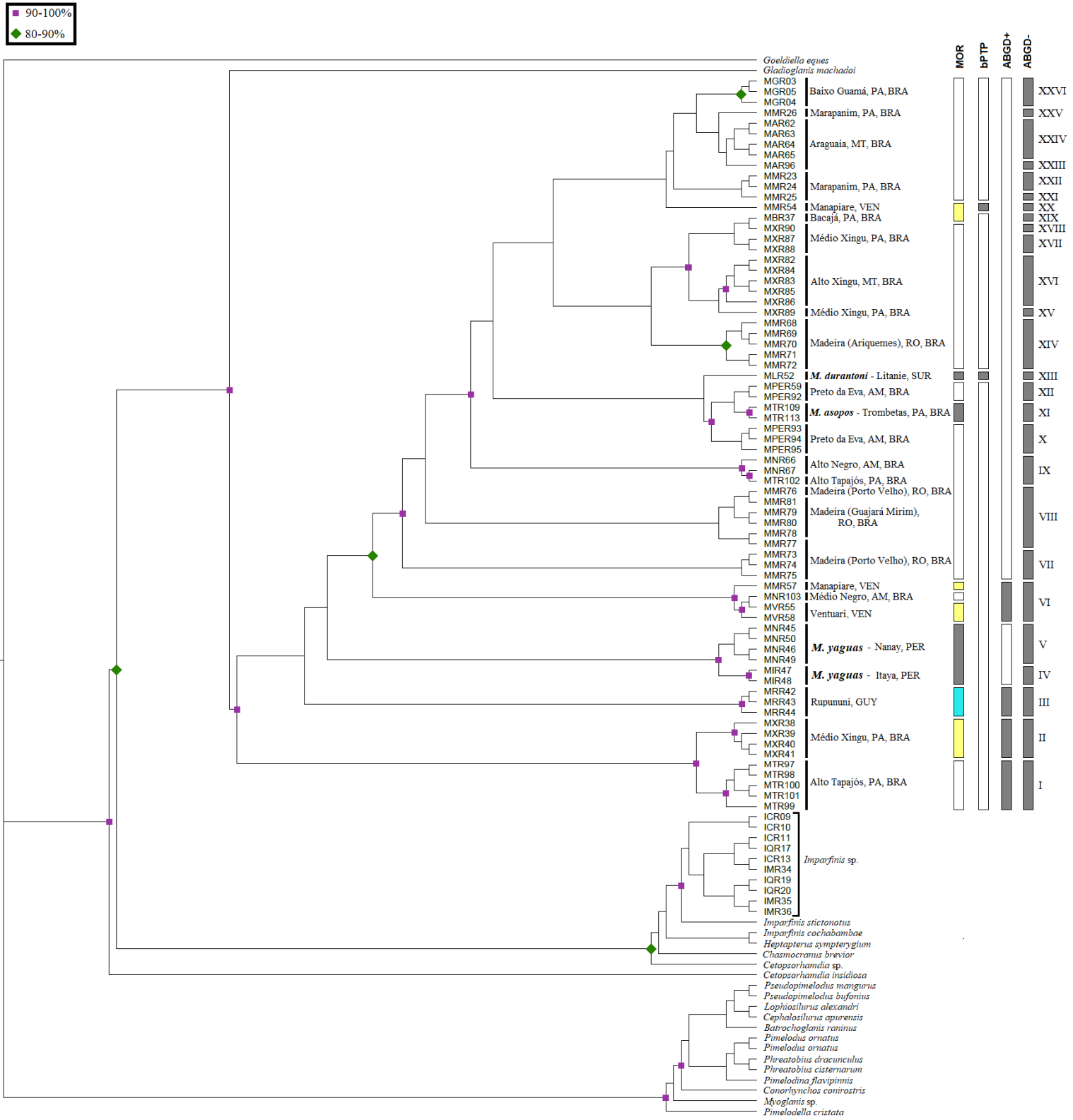


Figura 2. Árvore Bayesiana mostrando a relação entre as espécies putativas do gênero *Mastiglanis*. Apenas os suportes acima de 80% (*bayesian posterior probability* >0.8) são mostrados. Linhas pretas perto dos códigos representam amostras da mesma localidade. Barras

preenchidas (coloridas ou em cinza) representam espécies (válidas e putativas) distintas identificadas pelos métodos e barras não preenchidas (brancas) representam amostras com falta de resolução específica pelo método de análise. A barra representando análises morfológicas (MORF) segue os resultados de Almeida (2019) e as espécies válidas descritas. As amostras que foram utilizadas tanto neste estudo quanto por Almeida (2019) estão em colorido, as quais são: “*Mastiglanis* sp. n. 4” (barra amarela) e “*Mastiglanis* sp. n. 6” (barra azul claro). As cores destas barras estão correlacionadas com as cores na Figura 1. Demais barras representam espécies putativas delimitadas pelos métodos bPTP e ABGD (ABGD+ *threshold* igual a 0.0028; ABGD- *threshold* igual a 0.0017). Espécies putativas estão nomeadas com números romanos para evitar confusão com os algarismos arábicos usado para nomear as espécies de Almeida (2019).

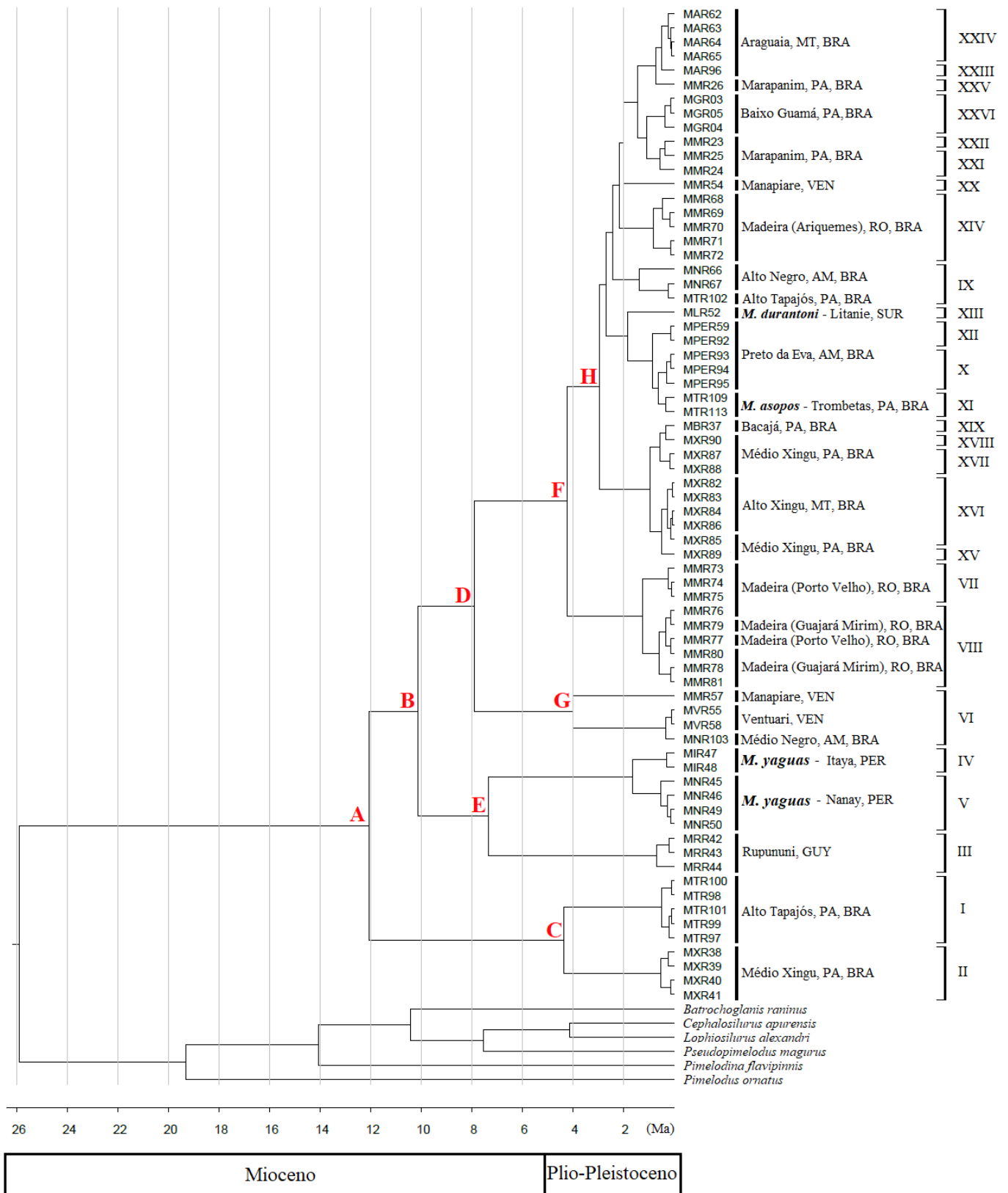


Figura 3. Tempo de divergência molecular obtida para o gênero *Mastiglanis*. Árvore gerada no programa BEAST 2 utilizando o relógio estrito. Letras nos nós correspondem aos tempos

de divergência estimados no presente estudo e sumarizados na Tabela 1. Números romanos representam as espécies putativas definidas com base na análise de delimitação ABGD-.

Tabela 1. Tempo de divergência estimado, com seus respectivos intervalos de confiança e probabilidades *a posteriori* para as espécies de *Mastiglanis* analisadas no presente estudo.

Nó	Tempo (Ma)	95% HPD (Ma)	Posterior
A	12.06	4.218-21.902	1
B	10.13	3.643-18.376	0.62
C	4.36	1.141-8.530	1
D	7.89	2.5-14.299	0.68
E	7.34	2.318-13.645	0.73
F	4.23	1.35-7.936	1
G	4.01	1.060-7.907	1
H	2.96	0.925-5.441	0.98

Dados Suplementares 1. Espécies, códigos, localidades das amostras, número de tombamento e sequências retiradas do GenBank utilizadas nesse estudo. Linhas em negrito mostram as amostras utilizadas tanto neste estudo quanto por Almeida (2019).

Espécie	Sp.* / ABGD-	Código	Local de coleta	Voucher	Genbank
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XXVI	MGR03	Baixo Rio Guamá/Castanhal-PA, Brasil	CEABIO 18M003	
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XXVI	MGR04	Baixo Rio Guamá /Castanhal-PA, Brasil	CEABIO 18M004	
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XXVI	MGR05	Baixo Rio Guamá /Castanhal-PA, Brasil	CEABIO 18M005	
<i>Imparfinis</i> sp.	- / -	ICR09	Rio Caeté/Bonito-PA, Brasil	CEABIO 18M009	
<i>Imparfinis</i> sp.	- / -	ICR10	Rio Caeté /Bonito-PA, Brasil	CEABIO 18M010	
<i>Imparfinis</i> sp.	- / -	ICR11	Rio Caeté /Bonito-PA, Brasil	CEABIO 18M011	
<i>Imparfinis</i> sp.	- / -	ICR13	Rio Caeté /Bonito-PA, Brasil	CEABIO 18M013	
<i>Imparfinis</i> sp.	- / -	ICR14	Rio Caeté /Bonito-PA, Brasil	CEABIO 18M014	
<i>Imparfinis</i> sp.	- / -	ICR15	Rio Caeté /Bonito-PA, Brasil	CEABIO 18M015	
<i>Imparfinis</i> sp.	- / -	IQR17	Rio Quatipuru/Tracuateua-PA, Brasil	CEABIO 18M017	
<i>Imparfinis</i> sp.	- / -	IQR18	Rio Quatipuru /Tracuateua-PA, Brasil	CEABIO 18M018	
<i>Imparfinis</i> sp.	- / -	IQR19	Rio Quatipuru /Tracuateua-PA, Brasil	CEABIO 18M019	
<i>Imparfinis</i> sp.	- / -	IQR20	Rio Quatipuru /Tracuateua-PA, Brasil	CEABIO 18M020	
<i>Imparfinis</i> sp.	- / -	IQR21	Rio Quatipuru /Tracuateua-PA, Brasil	CEABIO 18M021	
<i>Imparfinis</i> sp.	- / -	IQR22	Rio Quatipuru /Tracuateua-PA, Brasil	CEABIO 18M022	
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XXII	MMR23	Rio Marapanim/São Francisco do Pará-PA, Brasil	CEABIO 18M023	
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XXI	MMR24	Rio Marapanim /São Francisco do Pará-PA, Brasil	CEABIO 18M024	
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XXI	MMR25	Rio Marapanim /São Francisco do Pará-PA, Brasil	CEABIO 18M025	
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XXV	MMR26	Rio Marapanim /São Francisco do Pará-PA, Brasil	CEABIO 18M026	
<i>Imparfinis</i> sp.	- / -	IMR34	Rio Maracanã/Capanema-PA, Brasil	CEABIO 18M034	
<i>Imparfinis</i> sp.	- / -	IMR35	Rio Maracanã /Capanema-PA, Brasil	CEABIO 18M035	

<i>Imparfinis</i> sp.	- / -	IMR36	Rio Maracanã /Capanema-PA, Brasil	CEABIO 18M036
<i>Mastiglanis</i> sp.	4 / XIX	MBR37	Rio Bacajá-PA, Brasil	ANSP 194592
<i>Mastiglanis</i> sp.	4 / II	MXR38	Rio Xingu-PA, Brasil	ANSP 198692
<i>Mastiglanis</i> sp.	4 / II	MXR39	Rio Xingu -PA, Brasil	INPA 40246
<i>Mastiglanis</i> sp.	4 / II	MXR40	Rio Xingu -PA, Brasil	ANSP 199569
<i>Mastiglanis</i> sp.	4 / II	MXR41	Rio Xingu-PA, Brasil	ANSP 198692
<i>Mastiglanis</i> sp.	6 / III	MRR42	Rio Rupununi-Guiana	ANSP 179732
<i>Mastiglanis</i> sp.	6 / III	MRR43	Rio Rupununi -Guiana	ANSP 179732
<i>Mastiglanis</i> sp.	6 / III	MRR44	Rio Rupununi -Guiana	ANSP 179732
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / V	MNR45	Rio Nanay-Peru	ANSP 53736
<i>Mastiglanis yaguas</i>	Válida / V	MNR46	Rio Nanay-Peru	ANSP 182750
<i>Mastiglanis yaguas</i>	Válida / IV	MIR47	Rio Itaya-Peru	ANSP 179014
<i>Mastiglanis yaguas</i>	Válida / IV	MIR48	Rio Itaya -Peru	ANSP 179014
<i>Mastiglanis yaguas</i>	Válida / V	MNR49	Rio Nanay-Peru	ANSP 180407
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / V	MNR50	Rio Nanay -Peru	SIUC 23030
<i>Mastiglanis durantoni</i>	Valida / XIII	MLR52	Rio Litanie-Suriname	ANSP 189106
<i>Mastiglanis</i> sp.	4 / XX	MMR54	Rio Manapiare-Venezuela	ANSP 182789
<i>Mastiglanis</i> sp.	4 / VI	MMR57	Rio Manapiare -Venezuela	ANSP 182789
<i>Mastiglanis</i> sp.	4 / VI	MVR55	Rio Ventuari-Venezuela	ANSP 191332
<i>Mastiglanis</i> sp.	4 / VI	MMR58	Rio Ventuari -Venezuela	ANSP 182259
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XII	MPER59	Rio Preto da Eva-AM, Brasil	LBP 19323
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / X	MPER60	Rio Preto da Eva-AM, Brasil	LBP 19324
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / X	MPER61	Rio Preto da Eva-AM, Brasil	LBP 19326
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XXIV	MAR62	Rio Araguaia/Barra das Garças-MT, Brasil	LBP 27651
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XXIV	MAR63	Rio Araguaia /Barra das Garças-MT, Brasil	LBP 27652
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XXIV	MAR64	Rio Araguaia /Barra das Garças-MT, Brasil	LBP 27653
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XXIV	MAR65	Rio Araguaia /Barra das Garças-MT, Brasil	LBP 27654

<i>Mastiglanis</i> sp.	- / IX	MNR66	Alto Rio Negro/São Gabriel da Cachoeira-AM, Brasil	LBP 33371
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / IX	MNR67	Alto Rio Negro /São Gabriel da Cachoeira-AM, Brasil	LBP 33372
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XIV	MMR68	Rio Madeira/Ariquemes-RO, Brasil	LBP 50050
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XIV	MMR69	Rio Madeira /Ariquemes-RO, Brasil	LBP 50051
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XIV	MMR70	Rio Madeira /Ariquemes-RO, Brasil	LBP 50052
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XIV	MMR71	Rio Madeira /Ariquemes-RO, Brasil	LBP 50053
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XIV	MMR72	Rio Madeira /Ariquemes-RO, Brasil	LBP 50054
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / VII	MMR73	Rio Madeira /Porto Velho-RO, Brasil	LBP 50351
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / VII	MMR74	Rio Madeira /Porto Velho-RO, Brasil	LBP 50352
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / VII	MMR75	Rio Madeira /Porto Velho-RO, Brasil	LBP 50353
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / VIII	MMR76	Rio Madeira /Porto Velho-RO, Brasil	LBP 50354
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / VIII	MMR77	Rio Madeira /Porto Velho-RO, Brasil	LBP 50355
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / VIII	MMR78	Rio Madeira /Guajará Mirim-RO, Brasil	LBP 50450
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / VIII	MMR79	Rio Madeira /Guajará Mirim-RO, Brasil	LBP 50451
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / VIII	MMR80	Rio Madeira /Guajará Mirim-RO, Brasil	LBP 50452
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / VIII	MMR81	Rio Madeira /Guajará Mirim-RO, Brasil	LBP 50453
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XVI	MXR82	Rio Xingu/Ribeirão Cascalheira-MT, Brasil	LBP 64706
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XVI	MXR83	Rio Xingu/Ribeirão Cascalheira-MT, Brasil	LBP 64707
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XVI	MXR84	Rio Xingu/Ribeirão Cascalheira-MT, Brasil	LBP 64708
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XVI	MXR85	Rio Xingu/Ribeirão Cascalheira-MT, Brasil	LBP 64709
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XVI	MXR86	Rio Xingu/Ribeirão Cascalheira-MT, Brasil	LBP 64710
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XVII	MXR87	Rio Xingu/Altamira-PA, Brasil	LBP 67717
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XVII	MXR88	Rio Xingu/Altamira-PA, Brasil	LBP 67718
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XV	MXR89	Rio Xingu/Altamira-PA, Brasil	LBP 67719
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XVIII	MXR90	Rio Xingu/Altamira-PA, Brasil	LBP 67720
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / X	MPER91	Rio Preto da Eva-AM, Brasil	LBP 72431

<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XII	MPER92	Rio Preto da Eva-AM, Brasil	LBP 72432
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / X	MPER93	Rio Preto da Eva-AM, Brasil	LBP 72433
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / X	MPER94	Rio Preto da Eva-AM, Brasil	LBP 72434
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / X	MPER95	Rio Preto da Eva-AM, Brasil	LBP 72435
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / XXIII	MAR96	Rio Araguaia/Barra do Garça-MT, Brasil	LBP 817651
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / I	MTR97	Alto Rio Tapajós/Teles Pires-PA, Brasil	LBP 92798
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / I	MTR98	Alto Rio Tapajós/Teles Pires-PA, Brasil	LBP 92799
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / I	MTR99	Alto Rio Tapajós/Teles Pires-PA, Brasil	LBP 92800
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / I	MTR100	Alto Rio Tapajós/Teles Pires-PA, Brasil	LBP 92801
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / I	MTR101	Alto Rio Tapajós/Teles Pires-PA, Brasil	LBP 92802
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / IX	MTR102	Alto Rio Tapajós/Teles Pires-PA, Brasil	LBP 92865
<i>Mastiglanis</i> sp.	- / VI	MNR103	Médio Rio Negro/Barcelos-AM, Brasil	LBP 97389
<i>Mastiglanis asopos</i>	Valida / XII	MTR109	Rio Trombetas-PA, Brasil	CEABIO 18M109
<i>Mastiglanis asopos</i>	Valida / XII	MTR111	Rio Trombetas-PA, Brasil	CEABIO 18M111
<i>Batrochoglanis raninus</i>				JX899730
<i>Cephalosilurus apurensis</i>				JX899729
<i>Cetopsorhamdia insidiosa</i>				JX899735
<i>Cetopsorhamdia</i> sp.				DQ990579
<i>Chasmocranus brevior</i>				JX899736
<i>Conorhynchos conirostris</i>				JX899737
<i>Gladioglanis machadoi</i>				JX899744
<i>Goeldiella eques</i>				JF898719
<i>Heptapterus sympterygium</i>				JX899734
<i>Imparfinis cochabambae</i>				JX899732
<i>Imparfinis stictonotus</i>				JX899733
<i>Lophiosilurus alexandri</i>				JX899728
<i>Myoglanis</i> sp.				JX899738

<i>Phreatobius cisternarum</i>	JX899741
<i>Phreatobius dracunculus</i>	JX899740
<i>Pimelodella cristata</i>	MH286809
<i>Pimelodina flavipinnis</i>	JF898681
<i>Pimelodus ornatus</i>	JF898678
<i>Pimelodus ornaus</i>	JF898680
<i>Pseudopimelodus bufonius</i>	JX899727
<i>Pseudopimelodus mangurus</i>	JF898718
