



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia
de Ambientes Aquáticos Continentais



**Diversidade, estrutura genética e variação morfológica
em *Cichlasoma portalegrense* (Cichliformes, Cichlidae)
da região da Costeira do Rio Grande do Sul**

Tamires Pereira Pintado

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Gava

Rio Grande, RS
2022



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia
de Ambientes Aquáticos Continentais



Diversidade, estrutura genética e variação morfológica em *Cichlasoma portalegrense* (Cichliformes, Cichlidae) da região Costeira do Rio Grande do Sul

Aluno: Tamires Pereira Pintado

Orientadora: Adriana Gava

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais

Rio Grande, RS
2022

Ficha Catalográfica

P659d Pintado, Tamires Pereira.

Diversidade, estrutura genética e variação morfológica em
Cichlasoma portalegrense (Cichliformes, Cichlidae) da região Costeira
do Rio Grande do Sul / Tamires Pereira Pintado. – 2022.
96 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande –
FURG, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais, Rio Grande/RS, 2022.

Orientadora: Dra. Adriana Gava.

1. Evolução Molecular 2. Genética de Populações 3. Bacias
Hidrográficas I. Gava, Adriana II. Título.

CDU 573(816.5)

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344



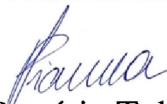
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES
AQUÁTICOS CONTINENTAIS

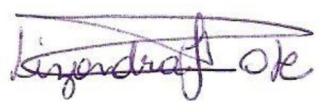


**ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES
AQUÁTICOS CONTINENTAIS – Nº 003/2022**

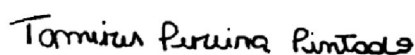
Às 09h00 (nove horas) do dia 08 (oito) do mês de abril de 2022 (dois mil e vinte e dois), via Webconferência no endereço eletrônico: (<https://conferenciaweb.rnp.br/webconf/adriana-adriana-gava>) reuniram-se docentes, discentes e comunidade em geral, para a Defesa Pública da Dissertação de Mestrado da acadêmica Tamires Pereira Pintado. A Dissertação intitulada “**Diversidade, estrutura genética e variação morfológica em Cichlasoma portalegrense (Cichliformes, Cichlidae) da região da Costeira do Rio Grande do Sul**” foi avaliada pela Banca Examinadora composta pela Orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Gava, Prof^o Dr. Rogério Tubino Vianna (FURG); Prof^a Dra Lizandra Jaqueline Robe (UFSM) e Dr. Fernando Marques Quintela (INPP-Emílio Goeldi). Após a defesa e arguição pública, a Banca Examinadora reuniu-se, para deliberação final, e considerou a acadêmica **APROVADA**. Desta forma, o acadêmico concluiu mais uma das etapas necessárias para a obtenção do grau de **MESTRE EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS**. Nada mais havendo a tratar, às 12h00h (doze horas) foi lavrada a presente ata, que lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Banca Examinadora, pela Acadêmica e pelo Coordenador do Curso.


Prof^a. Dra. Adriana Gava


Prof^o Dr. Rogério Tubino Vianna


Prof^a Dra Lizandra Jaqueline Robe


Dr. Fernando Marques Quintela


Tamires Pereira Pintado


Prof. Dr. Rogério Tubino Vianna
Coordenador do Curso

Dedico aos meus avós, Miguel Pereira Pintado e Marieta dos Santos Pintado.
(*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Ailton e Ana Maria, por todo apoio, amor, carinho, cuidado e paciência durante esse tempo.

Aos meus irmãos e irmãs, por tudo, principalmente por entender a minha ausência em momentos importantes da vida de vocês. Especialmente, gostaria de agradecer à minha irmã Elizangela e ao meu cunhado Ricardo por me motivarem a estudar e por me apoiarem por muito tempo, sou grata por tudo.

Ao meu marido, Shenon Sander, por me manter segura e saudável, cuidando da minha alimentação, saúde física e mental. Obrigada por tudo, por me apoiar, mimar, ser meu melhor amigo, estar comigo diariamente e por sempre aturar meus dramas. Amor, sua presença foi fundamental, e essa conquista é nossa.

Ao meu filho de quatro patas (Chico) que alegrou os meus dias mais difíceis e trouxe outro significado à minha vida.

À família do meu marido que sempre fizeram de tudo para me ajudar durante esses anos de mestrado.

À minha querida orientadora, Adriana Gava, por todo incentivo, por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava, por ser paciente e por partilhar seu conhecimento. Também pelo excelente trabalho, por toda a amizade, carinho e respeito. Nossas saídas de campo, conversas em laboratório, as caronas até a FURG/casa e os conselhos, são momentos que guardarei para a vida toda, pois foram especiais e agregaram muito no meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos e amigas que de alguma forma me apoiaram e me incentivaram a seguir em frente.

Ao Jean, por toda a ajuda no QGIS, por me auxiliar sempre quando necessário e por todas as conversas descontraídas.

Aos amigos e amigas da turma, principalmente ao Celomar que durante esses anos me apoiou nas crises de ansiedade e me incentivou a continuar.

Ao Fernando Quintela, por colaborar com o trabalho e campo.

À Gabriela, por todo apoio laboratorial. Especialmente pela dedicação, cuidado e paciência ao me ensinar a fazer as análises de reação em cadeia da polimerase (PCR).

À Crislaine Barbosa, por reservar um tempo de sua vida corrida para me auxiliar nas análises filogenéticas e para a sanar minhas dúvidas. Tens minha eterna gratidão, tu és um ser iluminado, tais sempre tão entusiasmada e disposta a ajudar o próximo, sorte a minha em ter a oportunidade de trabalhar contigo.

À Erika, por se deslocar até a FURG (meio a pandemia) para me auxiliar com a sexagem dos espécimes e também por me ajudar, via Meet, com as análises no programa R.

Às técnicas de laboratório, Loraine Moraes e Daiane por todo o suporte necessário.

À FURG, ICB e ao PPGBAC.

Ao financiamento em parte pelo Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES)—Código Financeiro 001, FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) FAPERGS/CNPq-PRONEX N° 16/0485-4.

RESUMO

Pertencente à família Cichlidae, à subfamília Cichlinae e à tribo Cichlasomatini, a espécie *Cichlasoma portalegrense* está distribuída na bacia hidrográfica do Rio Tramandaí e nas bacias associadas à Laguna dos Patos, localizadas no Estado do Rio Grande do Sul (RS). Dentro dessas bacias a espécie é encontrada em corpos d'água lênticos e lóticos. O objetivo deste estudo foi usar marcadores mitocondriais e morfometria geométrica para investigar os níveis de diversidade, estrutura genética e diferenças de forma entre as populações de *C. portalegrense*. Para isso, amplificamos fragmentos dos marcadores Citocromo b (Cyt-b), Citocromo C oxidase subunidade I (COI) e D-Loop para 101, 101 e 100 espécimes respectivamente, amostrados em nove localidades. Após, os amplicons foram sequenciados e foram realizadas as análises filogenéticas para os marcadores individualmente e para os três marcadores concatenados. As variações de forma foram analisadas para 114 espécimes (74 fêmeas) e (40 machos) coletados em 12 localidades por meio dos métodos morfométricos geométricos. Nossos resultados indicaram que 1) a amostra exibiu altos valores relativos de diversidade haplotípica com baixa divergência de nucleotídeos entre os haplótipos; 2) o padrão espaço temporal de diversidade é do tipo estrelado, com haplótipos únicos na maioria das populações (Cyt-B e COI, principalmente); 3) as populações são geneticamente similares, resultando em uma politomia sem exibição de monofilia recíproca; 4) a despeito da similaridade genética, detectamos estruturação significativa, tanto entre populações como entre bacias hidrográficas, principalmente no marcador D-loop que exibiu diferenças fixadas entre as populações ao norte do estuário da Laguna dos Patos e a população ao sul (Hermenegildo); 5) indícios de diferenciação na forma, mas sem agrupamento claro das populações do norte e do sul, como encontrado no cenário para os marcadores neutros. Embora não seja possível indicar relação direta entre a geocronologia da gênese da planície costeira do Rio Grande do Sul com as diferenças genéticas das populações analisadas, as populações mais diferenciadas são aquelas do norte e sul que ocupam os terrenos mais recentes da barreira pleistocênica III e da barreira holocênica IV.

Palavras chaves: evolução molecular; genética de populações; bacias hidrográficas.

ABSTRACT

Belonging to the Cichlidae family, the Cichlinae subfamily and the Cichlasomatini tribe, the species *Cichlasoma portalegrense* is distributed in the hydrographic basin of the Tramandaí River and in the basins associated with the Patos Lagoon, located in the state of Rio Grande do Sul (RS). Within these basins the species is found in both lentic and lotic water bodies. The objective of this study was to use mitochondrial markers and geometric morphometry to investigate the levels of diversity, genetic structure and shape differences among populations of *C. portalegrense*. To do this, we amplified fragments of the markers Cytochrome b (Cyt-b), Cytochrome C oxidase subunit I (COI) and D-Loop for 101, 101 and 100 specimens respectively, sampled from nine localities. Afterwards, the amplicons were sequenced and phylogenetic analyses were performed for the markers individually and for the three concatenated markers. Shape variations were analyzed for 114 specimens (74 females) and (40 males) collected from 12 localities using geometric morphometric methods. Our results indicated that 1) the sample exhibited high relative haplotype diversity values with low nucleotide divergence among haplotypes; 2) the spatio-temporal pattern of diversity is star-like, with unique haplotypes in most populations (Cyt-B and COI, mainly); 3) the populations are genetically similar, resulting in a polytomy without exhibiting reciprocal monophyly; 4) in spite of the genetic similarity, we detected significant structuring, both between populations and between watersheds, especially for the marker D-loop that exhibited fixed differences between the populations north of the Laguna dos Patos estuary and the population to the south (Hermenegildo); 5) evidence of differentiation in form, but no clear grouping of northern and southern populations, as found in the scenario for the neutral markers. Although it is not possible to indicate a direct relation between the geochronology of the genesis of the coastal plain of Rio Grande do Sul with the genetic differences of the populations analyzed, the most differentiated populations are those from the north and south that occupy the most recent terrains of the Pleistocene III barrier and the Holocene IV barrier.

Key words: molecular evolution; population genetics; hydrographic basin.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação segue o modelo proposto pelo Programa de Pós Graduação e está organizada em três partes. A primeira abrange uma introdução geral, contendo assuntos sobre diversidade genética, estrutura populacional, marcadores moleculares, morfometria geométrica, Planície Costeira do Rio Grande (PCRS), bacias hidrográficas litorâneas, família Cichlidae, subfamília Cichlinae, tribos da subfamília Cichlinae e sobre *Cichlasoma portalegrense*. A segunda parte apresenta o manuscrito em formato de artigo, com resumo, introdução, material e métodos, resultados, discussão e referências utilizadas. A terceira contém as considerações finais/perspectivas e anexos.

A escrita do manuscrito segue as normas de formatação da revista Hydrobiologia.

[<https://www.springer.com/journal/10750/submission-guidelines>]

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
APRESENTAÇÃO	X
SUMÁRIO	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
Introdução Geral	XIII
Manuscrito	XV
LISTA DE TABELAS	XVII
Introdução Geral	XVII
Manuscrito	XVII
INTRODUÇÃO GERAL	19
Diversidade genética, estrutura populacional e marcadores genéticos	19
Morfometria	23
Planície costeira do Rio Grande do Sul (PCRS) e bacias hidrográficas litorâneas	24
Família Cichlidae	28
Subfamília Cichlinae	31
<i>Cichlasoma portalegrense</i> (Hensel, 1870)	35
OBJETIVO GERAL	40
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
HIPÓTESE	40
REFERÊNCIAS	41
RESUMO	49
INTRODUÇÃO	50
MATERIAL E MÉTODOS	52
Área de estudo	52
Amostragem e identificação dos espécimes	54
Manipulação do DNA e análises	55
Análise de morfometria	57
RESULTADOS	58
Análises moleculares	58

Diversidade e estrutura genética.....	58
Dados Concatenados	60
Estimativas de diversidade para bacias hidrográficas	60
Análises morfométricas	61
DISCUSSÃO.....	62
REFERÊNCIAS	66
TABELAS	73
FIGURAS.....	78
MATERIAL SUPLEMENTAR	89
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	91
ANEXOS.....	92
PARECER DE AUTORIZAÇÃO DO CEUA – FURG	92
PARECER DE AUTORIZAÇÃO DO ICMBIO	93

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

Figura 1: DNA mitocondrial, com as localizações das regiões, Cyt-b, COI e D-Loop (Brown, 2008). (Retirado de Fish mitochondrial genomics: sequence, inheritance and functional variation).	22
Figura 2: Alterações que não modificam a forma: A) Translação. B) Rotação. C) Escala. (Zelditch et al., 2004). (Retirado de Geometric Morphometrics for Biologists: A primer).	24
Figura 3: A) Medidas morfométricas tradicionais da forma do corpo externo. B) Medidas morfométricas geométricas da forma do corpo, com 16 marcos anatômicos selecionados (Zelditch et al., 2004). (Retirado de Geometric Morphometrics for Biologists: A primer).	24
Figura 4: Formação dos sistemas deposicionais da Planície Costeira do Rio Grande do Sul (modificado de Tomazelli & Villwock, 2005). (Retirado de Mapeamento Geológico de Planícies Costeiras: o Exemplo da Costa do Rio Grande do Sul).	26
Figura 5: Mapa geológico da PCRS, mostrando as relações das bacias hidrográficas com os sistemas do tipo “Laguna-Barreira” adaptado de Tomazelli & Villwock (2005). (Retirado do Atlas Socioambiental: municípios de Mostardas, Tavares, São José do Norte e Santa Vitória do Palmar).	27
Figura 6: Cladograma demonstrando as relações filogenéticas das subfamílias da família Cichlidae (modificado de Sparks & Smith, 2004). (Retirado de Phylogeny and biogeography of cichlid fishes (Teleostei: Perciformes: Cichlidae)).	30
Figura 7: Características fenotípicas dos ciclídeos (adaptado de Malabarba et al., 2013). (Retirado do Guia de identificação dos peixes da bacia do Rio Tramandaí).	31
Figura 8: Cladograma com as relações filogenéticas das 7 tribos da subfamília Cichlinae (modificado de Smith et al., 2008). (Retirado de Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae)).	33
Figura 9: Cladograma com as relações filogenéticas das tribos da subfamília Cichlinae (modificado de Farias et al., 1999). (Retirado de Mitochondrial DNA Phylogeny of the Family Cichlidae: Monophyly and Fast Molecular Evolution of the Neotropical Assemblage).....	34
Figura 10: Cladograma demonstrando a posição de <i>Cichlasoma portalegrense</i> dentro das tribos (modificado de Říčan & Kullander, 2006). (Retirado de Character-and tree-based delimitation of	

species in the ‘ <i>Cichlasoma</i> ’ <i>facetum</i> group (Teleostei, Cichlidae) with the description of a new genus).	37
Figura 11: Espécime de <i>Cichlasoma portalegrense</i> , modificado de Malabarba et al., 2013. (Retirado do Guia de identificação dos peixes da bacia do Rio Tramandaí).	37
Figura 12: Tomografia computadorizada da mandíbula inferior de <i>Cichlasoma dimerus</i> , mostrando 18 dentes. O ponto amarelo superior marca a posição do dente número 1 (mandíbula inferior esquerda). O ponto amarelo inferior marca a posição do dente número 18, modificado de Robins et al., 2020. (Retirado de Identification of acara (Cichlidae: <i>Cichlasoma</i>) established in Florida, USA).....	38
Figura 13: Espécime de <i>Cichlasoma dimerus</i> , modificado de Robins et al., (2020). (Retirado de Identification of acara (Cichlidae: <i>Cichlasoma</i>) established in Florida, USA).....	39

Manuscrito

Figura 1: Localização dos pontos amostrados. 1: Balneário Yara= **Bya** (Barreira IV); 2: Lagoa da Pinguela= **LdP** (Barreira IV); 3: Balneário Jardim do Éden= **BJE** (Barreira IV); 4: Eldorado do Sul= **EdS** (Depressão Periférica); 5: Museu General Bento Gonçalves= **MGB** (Leques Aluviais); 6: Arroio Viúva Tereza= **AVT** (Leques Aluvias); 7: Arraial= **Arr** (Barreira IV); 8: Ilha dos Marinheiros= **IdM** (Barreira IV); 9: Arroio Bolaxa= **ArB** (Barreira IV); 10: Caiúba= **Cab** (Barreira III); 11: Arroio Grande= **ArG** (Sistema lagunar pleistocênico e holocênico); 12: Hermenegildo= **Hmg** (Barreira III)..... 78

Figura 2: Marcos Anatômicos (pontos azuis). 1: margem anterior do maxilar superior; 2: margem mais anterior dos olhos; 3: margem mais posterior dos olhos; 4: extremidade anterior da abertura branquial; 5: origem anterior da nadadeira dorsal; 6: margem posterior da base da nadadeira dorsal; 7: margem dorsal da base da barbatana caudal; 8: margem ventral da base da nadadeira caudal; 9: margem posterior da base da nadadeira anal; 10: origem anterior da nadadeira anal; 11: extremidade posterior da abertura branquial. 79

Figura 3: Rede de haplótipos das 101 sequências Cyt-b (881 pb) amostradas para a espécie *Cichlasoma portalegreense*. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo. Os traços correspondem às diferenças mutacionais entre haplótipos. As cores referem-se às localizações, indicadas na legenda à direita. 80

Figura 4: Rede de haplótipos das 101 sequências COI (599 pb) amostradas para a espécie *Cichlasoma portalegreense*. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo. Os traços correspondem às diferenças mutacionais entre haplótipos. As cores referem-se às localizações, indicadas na legenda à esquerda. 81

Figura 5: Rede de haplótipos das 100 sequências D-Loop (429 pb) amostradas para a espécie *Cichlasoma portalegreense*. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo. Os traços correspondem às diferenças mutacionais entre haplótipos. As cores referem-se às localizações, indicadas na legenda à direita. 82

Figura 6: Rede de haplótipos das 300 sequências concatenadas (1909 pb) amostradas para a espécie *Cichlasoma portalegreense*. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo. Os traços correspondem às diferenças mutacionais entre haplótipos. As cores referem-se às localizações, indicadas na legenda à direita. 83

Figura 7: Árvore filogenética obtida por Análise Bayesiana usando o marcador Cyt-b. Os valores acima dos nós indicam estimativas de tempo de divergência. Os valores abaixo representam

valores de suporte, dados por valores de probabilidades posteriores. As cores referem-se às localizações. Esta árvore foi enraizada com sequências Cyt-b de <i>Cichlasoma dimerus</i> (KR150876.1), <i>Cichlasoma orientale</i> (KF894814.1), <i>Cichlasoma bimaculatum</i> (AF145128.1) e <i>Cichlasoma amazonarum</i> (AF370669.1).	84
Figura 8: Árvore filogenética obtida por Análise Bayesiana usando o marcador COI. Os valores acima dos nós indicam estimativas de tempo de divergência. Os valores abaixo representam valores de suporte, dados por valores de probabilidades posteriores. As cores referem-se às localizações. Esta árvore foi enraizada com sequências COI de <i>Cichlasoma dimerus</i> (KR150876.1), <i>Cichlasoma paranaense</i> (JN988803.1), <i>Cichlasoma orientale</i> (KF938524.1), <i>Cichlasoma bimaculatum</i> (AY263863.1) e <i>Cichlasoma amazonarum</i> (MH973440.1).....	85
Figura 9: Árvore filogenética obtida por Análise Bayesiana usando o marcador D-Loop. Os valores acima dos nós indicam estimativas de tempo de divergência. Os valores abaixo representam valores de suporte, dados por valores de probabilidades posteriores. As cores referem-se às localizações. Esta árvore foi enraizada com a sequência D-Loop de <i>Cichlasoma dimerus</i> (KR150876.1).....	86
Figura 10: Árvore filogenética obtida por Análise Bayesiana utilizando sequências concatenadas de Cyt-b, COI e D-Loop. Os valores acima dos nós indicam o tempo de divergência. Os valores abaixo representam valores de suporte, dados por valores de probabilidade posteriores. As cores referem-se às localizações. Esta árvore foi enraizada com sequências Cyt-b, COI e D-Loop de <i>Cichlasoma dimerus</i> (KR150876.1).....	87
Figura 11: Análise dos componentes principais da forma corporal independente do sexo, mostrando PC1 versus PC2 versus PC3. Para cada PC, a mudança de forma dos valores extremos de PC da forma média é representada por meio dos gráficos de peixes distorcidos na grade de deformação.	88
Figura 1S: Frequência de machos e fêmeas de <i>Cichlasoma portalegrense</i> para cada local de coleta.	90
Figura 2S: Tamanho médio, desvio-padrão, máximo e mínimo para os espécimes de <i>Cichlasoma portalegrense</i> . Medidas em centímetros (cm).	90

LISTA DE TABELAS

Introdução Geral

Tabela 1 Gênero <i>Cichlasoma</i> , número de espécies e distribuição geográfica.....	36
--	----

Manuscrito

Tabela 1 Estimativas de diversidade genética e testes de neutralidade realizados para cada sítio usando os marcadores Cyt-b, COI e D-Loop.	73
Tabela 2 Índices de fixação par-a-par (FST) (acima da diagonal) e distâncias médias par-a-par (abaixo da diagonal) obtidos nas comparações entre os locais de coleta utilizando o marcador Cyt-b. Valores significativos ($p < 0,05$) são indicados por um “*”.	74
Tabela 3 Índices de fixação par-a-par (FST) (acima da diagonal) e distâncias médias par-a-par (abaixo da diagonal) obtidos nas comparações entre os locais de coleta utilizando o marcador COI. Valores significativos ($p < 0,05$) são indicados por um “*”.	74
Tabela 4 Índices de fixação par-a-par (FST) (acima da diagonal) e distâncias médias par-a-par (abaixo da diagonal) obtidos nas comparações entre os locais de coleta utilizando o marcador D-Loop. Valores significativos ($p < 0,05$) são indicados por um “*”.	75
Tabela 5 Estimativas de diversidade genética e testes de neutralidade realizados para cada bacia hidrográfica utilizando os marcadores Cyt-b, COI e D-Loop.	75
Tabela 6 Índices de fixação par-a-par (FST) (acima da diagonal) e distâncias médias par-a-par (abaixo da diagonal) obtidos nas comparações entre bacias hidrográficas usando o marcador Cyt-b. Valores significativos ($p < 0,05$) são indicados por um “*”.	76
Tabela 7 Índices de fixação par-a-par (FST) (acima da diagonal) e distâncias médias par-a-par (abaixo da diagonal) obtidos nas comparações entre bacias hidrográficas usando o marcador COI. Valores significativos ($p < 0,05$) são indicados por um “*”.	76
Tabela 8 Índices de fixação par-a-par (FST) (acima da diagonal) e distâncias médias par-a-par (abaixo da diagonal) obtidos nas comparações entre bacias hidrográficas usando o marcador D-Loop. Valores significativos ($p < 0,05$) são indicados por um “*”.	76
Tabela 9 Análise de variância molecular (AMOVA) realizada para os locais usando as sequências dos marcadores Cyt-b, COI, D-Loop e dados concatenados.....	77
Tabela 10 Análise de variância molecular (AMOVA) realizada para bacias hidrográficas usando as sequências dos marcadores Cyt-b, COI, D-Loop e dados concatenados.	77

Tabela 1S: Número de indivíduos utilizados para análise molecular (Mol) e morfométrica (Mor), apenas molecular ou apenas morfométrica. Número de indivíduos coletados para cada população da espécie *Cichlasoma portalegrense* (N = número de indivíduos).....89

INTRODUÇÃO GERAL

Diversidade genética, estrutura populacional e marcadores genéticos

Os estudos sobre a diversidade e a estruturação genética têm sido de extrema importância para a conservação e o entendimento dos processos evolutivos históricos ou recorrentes em diversos grupos animais, incluindo Actinopterygii (Ramos-Fregonezi et al., 2017). Isso é assim, porque a análise da diversidade genética pode fornecer informações sobre como as espécies vem evoluindo ao longo do tempo e sobre como as populações estão estruturadas (Allendorf et al., 2013; Turchetto-Zolet et al., 2013). Com o entendimento desses fatores é possível avaliar se as espécies estudadas correm algum risco de extinção; caso corram, as informações sobre sua diversidade genética e estrutura populacional são úteis no processo de tomada de decisão de quais áreas e ações são prioritárias para a conservação dessas espécies (Frankham, 2010; Beheregaray et al., 2017; Garcez et al., 2018).

A diversidade genética é a quantidade de variação existente entre sequências de DNA de diferentes indivíduos de uma espécie em particular (Turchetto-Zolet et al., 2013; Romiguier et al., 2014; Svardal et al., 2020). Existem inúmeros determinantes dessa diversidade, entre eles, mutação, recombinação, fluxo gênico, tamanho populacional efetivo, habitats específicos da espécie, hibridização, competição, história de vida, mudanças geológicas e climáticas (Romiguier et al., 2014; Manel et al., 2020; Svardal et al., 2020). A perda dessa diversidade pode ocorrer, por exemplo, através da redução no número de indivíduos de uma espécie que sucede de eventos naturais (por exemplo, morte natural e predação) e antrópicos (por exemplo, fragmentação e perda dos habitats naturais) (Frankham, 2005, 2010). Esses eventos isolados ou somados podem reduzir a capacidade de adaptação dos organismos ao meio em que vivem e afetar negativamente a sua sobrevivência (Frankham, 2005, 2010). Portanto, quanto maior for a população de uma espécie, maior será sua diversidade genética e chance de persistir ao longo do tempo. Isto ocorre devido ao fato de quanto mais numerosa é uma população de uma espécie, maior será a chance de certos indivíduos possuírem características morfológicas, fisiológicas ou moleculares que os tornam resistentes às mudanças que estão ocorrendo no ambiente (Frankham, 2005).

Por outro lado, a forma como a variabilidade genética está distribuída no espaço constitui a estrutura genética de uma espécie. Essa estrutura é moldada pela interação do organismo com o ambiente, pelos mecanismos de isolamento geográfico, fluxo gênico e união dos gametas. Com efeito, a estrutura da população compreende o sistema de acasalamentos e o tamanho da população, a quantidade e o padrão de troca genética com outra população, e as classes de idade dos indivíduos

na população (Templeton, 2006; Freeland et al., 2011; Allendorf et al., 2013). A estrutura genética da população pode também ser afetada pela heterogeneidade ambiental. Além disso, condicionantes físicas de compartimentação dos ambientes, como barreiras geográficas, cadeias de montanhas e descontinuidade de bacias hidrográficas, geram segmentações físicas que dividem as populações e influenciam na dispersão e no fluxo gênico dos indivíduos, processo conhecido como vicariância. A ausência do fluxo gênico entre as populações da mesma espécie, promovida pela existência das barreiras físicas, pode gerar a diferenciação genética (Stevens et al., 2006; Clark et al., 2008; Zhu et al., 2010). As diferenças causadas pela ausência da troca genética entre as populações, ao longo do tempo, podem se somar e produzir barreiras reprodutivas que acabam por impedir a reprodução entre indivíduos das populações divergentes (Wu & Ting, 2004; Ridley, 2006). As barreiras físicas, e as barreiras ecológicas (importantes na diferenciação da especiação simpátrica, como evidenciado para os ciclídeos africanos (Chakrabarty, 2004; Gavrillets & Losos, 2009; Ronco et al., 2021; Salzburger, 2018; Svardal et al., 2020)), não são as únicas causas de divergência genética entre as populações de uma espécie, a distância geográfica também é um fator que pode ser responsável por esse processo. Mesmo que o ambiente seja contínuo, as populações ainda podem se diferenciar espacialmente (Slatkin, 1993). A diferenciação genética pode ser causada pela redução do fluxo gênico, devido à distância em que as populações se encontram no habitat, e é contrabalanceada pela capacidade de dispersão dos indivíduos. Quando isso acontece, esse padrão é chamado de isolamento por distância. O fluxo gênico leva à homogeneização genética das populações geograficamente próximas, enquanto que as mais distantes vão se diferenciando progressivamente (Manel et al., 2003; Ridley, 2006).

Filogeografia é um termo proposto por John Avise et al. (1987). É uma disciplina que busca compreender como os processos históricos microevolutivos e macroevolutivos resultam em diferenciação intra e inter-específica, respectivamente, e contribuem para a atual distribuição espacial e temporal das espécies (Avise et al. 2000). Para isso, a filogeografia integra diferentes áreas do conhecimento, como história, geografia, filogenia, biogeografia e genética de populações. Todas essas áreas ajudam a compreender como tais processos evolutivos e históricos levaram à formação da biodiversidade atual. A maioria dos estudos filogeográficos utilizam informações presentes nas sequências de DNA das espécies para testar suas hipóteses (Avise et al. 2000). O uso do DNA para solucionar questões filogenéticas e demográficas só foi viável devido ao avanço de ferramentas de análise estatística e molecular (Schlötterer, 2004). O progresso nessas áreas nos possibilita usar distintos marcadores genéticos para avaliar a diversidade genética, estrutura populacional e história demográfica das espécies.

Os marcadores moleculares são trechos de DNA que indicam as diferenças entre as sequências de DNA dos indivíduos de uma espécie ou entre espécies. Eles são muito utilizados por biólogos evolucionistas que buscam compreender as similaridades, as relações filogenéticas e a distância genética entre as espécies (Schlötterer, 2000; Thuesen et al., 2008; Diamante et al., 2017). Os marcadores mitocondriais têm sido tradicionalmente utilizados em estudos evolutivos (Brown et al., 1979; Brown, 2008; Thuesen et al., 2008; Diamante et al., 2017). Essa utilização está relacionada, por exemplo, o menor tamanho efetivo do DNA mitocondrial com relação ao DNA nuclear ocasiona no menor tempo de coalescência, e justamente por ter esse menor tempo, eles são fixados mais rapidamente dentro das populações. Dessa forma, é atingido o equilíbrio deriva-migração de forma mais rápida. Além disso, o DNA mitocondrial contém uma grande quantidade de cópias de DNA mitocondrial (DNAm_t, Fig. 1) presente nas mitocôndrias das células eucarióticas em comparação com o DNA nuclear, apresenta herança considerada exclusivamente materna, ausência de recombinação, maior taxa de mutações em comparação com o DNA nuclear e estrutura e organização bem conservadas (Brown et al., 1979; Avise et al., 1984; Meyer, 1993; Lee et al., 1995; Hebert et al., 2003; Freeland, 2005; Brown, 2008).

Nesse contexto, o marcador mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI) é um marcador taxonômico por que apresenta a variabilidade intra-específica menor do que a inter-específica, isto é, uma lacuna entre espécies (Alves-Silva & Dergam, 2015). O DNA barcode é um método que faz uso de uma sequência padrão de aproximadamente 600 pares de bases da extremidade 5' do marcador COI para identificação e revelação de novas espécies (Hebert et al., 2003, 2004). Como consequência, o marcador é muito aplicado em estudos que envolvem análises filogenéticas e filogeográficas (León-Romero et al., 2012; Páiz-Medina & Huete-Pérez, 2012; Mejía et al., 2015; Souza et al., 2017). Atualmente, esse é um método que atua como complementar aos estudos morfológicos, pois muitos taxonomistas fazem uso do método tradicional de *Carl Linnaeus*, técnica conhecida por usar exclusivamente caracteres morfológicos para identificar uma nova espécie. No entanto, sabemos hoje, que esse método tradicional não pode ser aplicado para todas as entidades biológicas. Existem algumas limitações como, por exemplo, a plasticidade fenotípica, os diferentes estágios de desenvolvimento ontogenético e espécies morfológicamente idênticas e geneticamente distintas, conhecidas como espécies crípticas (Hebert et al., 2003; Ridley, 2006). Todos esses fatores quando não levados em consideração podem gerar equívocos na identificação de linhagens divergentes no nível específico (Ridley, 2006).

Por sua vez, o marcador mitocondrial citocromo b (Cyt-b) é usado como marcador genético para compreender as relações evolutivas em vários níveis taxonômicos, bem como dentro de

espécies (Farias et al., 2001). Portanto, esse marcador também tem auxiliado os taxonomistas na identificação e revelação de novas espécies (Cantatore et al., 1994; Lydeard & Roe, 1997). Outro marcador mitocondrial muito utilizado em estudos genéticos, principalmente em estudos de diversidade e estrutura genética de peixes, é o D-Loop (Thuesen et al., 2008; Diamante et al., 2017). Essa região do DNAm é conhecida como região controladora, é não-codificadora (Fig. 1) e contém uma maior taxa de substituição de bases quando comparada a outras regiões do DNAm (Meyer, 1993; Brown, 2008).

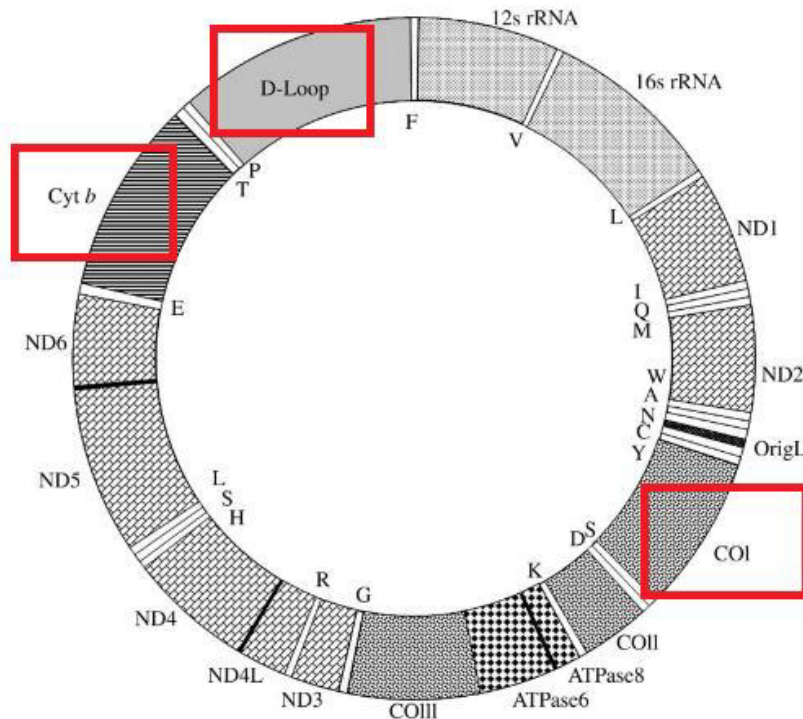


Figura 1: DNA mitocondrial, com as localizações das regiões, Cyt-b, COI e D-Loop (Brown, 2008). (Retirado de Fish mitochondrial genomics: sequence, inheritance and functional variation).

Portanto, marcadores genéticos são importantes para uma ampla gama de estudos, principalmente filogenéticos, filogeográficos e biogeográficos de diversas espécies de peixes, aves, roedores, entre outros (Schlötterer, 2004). Geralmente, esses estudos têm como objetivos, por exemplo, identificar novas espécies, avaliar a diversidade críptica das espécies, estabelecer meios para a conservação das espécies, estimar o tempo de divergência entre linhagens, determinar a história evolutiva, compreender a relação da paisagem com a estruturação e diversidade genética dentro e entre as populações das espécies (Beheregaray et al., 2002, 2017; Hebert et al., 2003, 2004; Frankham, 2010; Alves-Silva & Dergam, 2015; Ramos-Fregonezi et al., 2017; Garcez et al., 2018).

Morfometria

O estudo da forma das espécies surgiu muito antes do estudo molecular, muitos pesquisadores utilizavam da forma para descrever e para diferenciar as espécies. Nomes conhecidos na Biologia como Charles Robert Darwin e Jean Baptiste de Lamarck faziam uso das formas das espécies para compreender quais eram as suas relações com o ambiente e para descrever as suas teorias. Há muito tempo se discute sobre a forma das espécies, mas só no século XVIII o termo morfologia (referente ao estudo da forma orgânica) foi proposto por Johan Wolfgang von Goethe (1749-1832) (Kardong, 1995). A variação da forma dos organismos está relacionada a processos microevolutivos, que ocorrem abaixo do nível de espécie, como a seleção natural, deriva genética e surgimento de isolamento reprodutivo, bem como, a macroevolutivos, que acontecem no nível da espécie ou acima desse nível, sendo um conjunto de processos microevolutivos somados a milhares de anos (Ridley, 2006).

Em 1965 o termo Morfometria (Morfo = biologia + Metria = estatística/matemática) foi proposto por R. Blackith. Esse termo visa investigar a variação na forma e tamanho das espécies (Marcus et al., 1996; Monteiro e Reis, 1999). A definição de forma utilizada em morfometria foi proposta por Kendall (1997) como todas as informações geométricas que permanecem quando os efeitos de localização (translação), escala e rotação são filtradas de um objeto (Fig. 2). Hoje em dia muitos pesquisadores evolutivos buscam integrar seus estudos moleculares com os morfométricos (por exemplo, Berbel-Filho et al., 2016; Garcez et al., 2018). Essa união tem auxiliado os pesquisadores a compreender mais sobre os processos evolutivos das espécies.

Existem dois métodos de medida da variação morfológica mais difundidos na academia, a morfometria clássica ou tradicional e a morfometria geométrica ou análise estatística de formas. A morfometria clássica faz uso de medidas lineares (Fig. 3A), sendo que essas medidas são limitadas ao comprimento, profundidade e largura da estrutura ou parte de um organismo. Por não transmitir informações sobre a estrutura geométrica, as medidas lineares são úteis para analisar o tamanho das estruturas ou partes de um organismo, mas não são apropriadas para compreender a variação de sua forma. Por outro lado, a morfometria geométrica tem sido uma ferramenta analítica útil para obter as medidas de forma de um organismo. Essa ferramenta foi desenvolvida como uma alternativa ao método linear e faz uso de dados obtidos a partir das coordenadas cartesianas constituindo “Marcos anatômicos” (Fig. 3B) para descrever a forma de uma espécie (Zelditch et al., 2004).

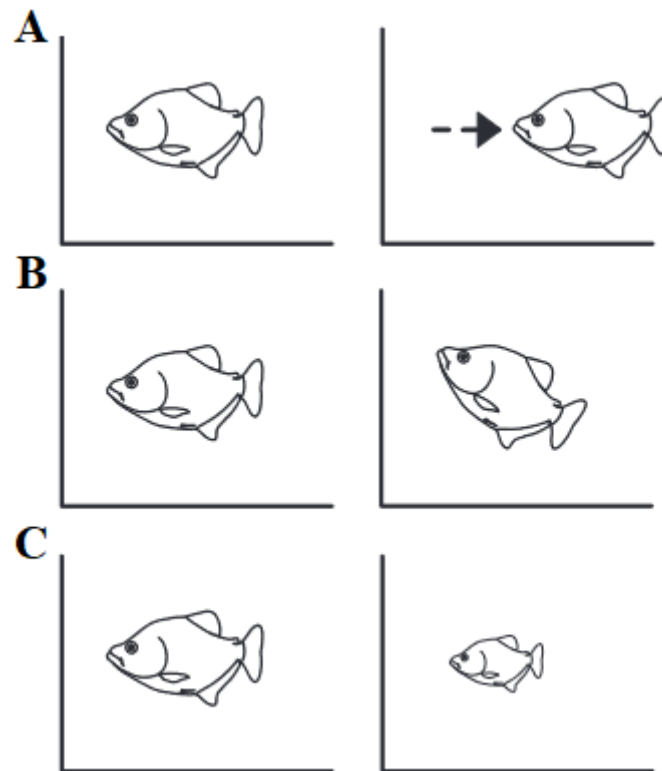


Figura 2: Alterações que não modificam a forma: A) Translação. B) Rotação. C) Escala. (Zelditch et al., 2004). (Retirado de Geometric Morphometrics for Biologists: A primer).

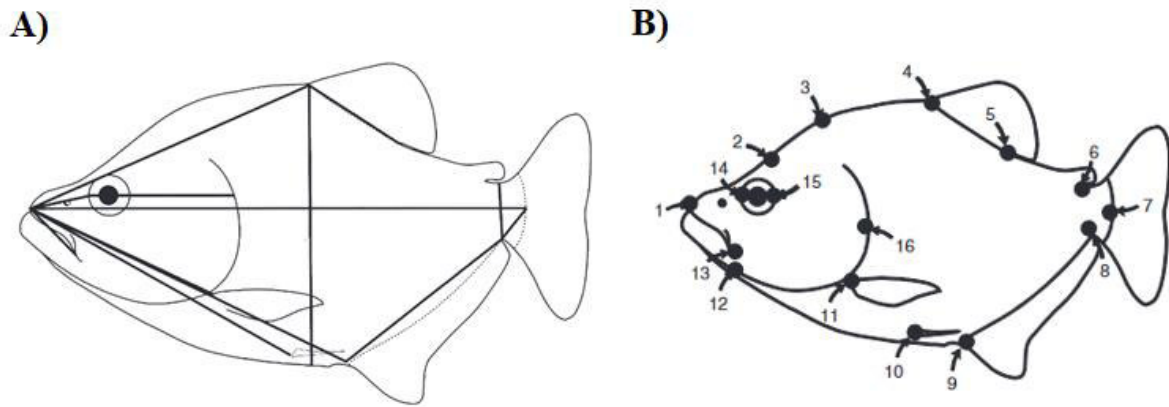


Figura 3: A) Medidas morfométricas tradicionais da forma do corpo externo. B) Medidas morfométricas geométricas da forma do corpo, com 16 marcos anatômicos selecionados (Zelditch et al., 2004). (Retirado de Geometric Morphometrics for Biologists: A primer).

Planície costeira do Rio Grande do Sul (PCRS) e bacias hidrográficas litorâneas

A planície costeira do Rio Grande do Sul (PCRS) é uma ampla área de 620 km de extensão e até, aproximadamente, 100 km de largura, que preservou parcialmente os processos de sua formação. No Brasil, representa a região mais vasta de planície contínua (Tomazelli & Villwock,

2000). A PCRS é formada por um sistema deposicional de Leques Aluviais e quatro sistemas deposicionais do tipo “Laguna-Barreira” (Fig. 4) (Tomazelli & Villwock, 2005).

A origem dos sistemas “Laguna-Barreira” está relacionada com as oscilações no nível do mar causadas pelas fases glaciais e interglaciais. Esses fenômenos foram responsáveis por formarem os depósitos de sedimentos que deram origem aos sistemas atuais (Tomazelli & Villwock, 2005). O sistema de Leques Aluviais se situa na parte mais interna da PCRS e provavelmente começou a ser implantado no fim do período Neogeno. Os sedimentos deste sistema se originaram das rochas do Escudo Sul-Riograndense (ESRG) do Período Pré-Cambriano e das rochas sedimentares e vulcânicas da bacia geológica do Paraná da Era Paleozoica e Mesozoica, sendo retrabalhados a partir dos processos de transgressão/regressão marinha (Tomazelli & Villwock, 2000, 2005). O sistema de Leques é dividido em dois subsistemas: (1) mantido por um sistema de rochas magmáticas e metamórficas do ESRG, compreendendo a acumulação dos sedimentos na margem oeste da PCRS e (2) mantido por um complexo de rochas sedimentares e magmáticas da bacia do Paraná, abrangendo a região norte da PCRS (Tomazelli & Villwock, 2000).

Por outro lado, os quatros sistemas deposicionais “Laguna-Barreira” se originaram no período Quaternário, possibilitando a expansão da PCRS em direção ao leste (Fig. 4) (Tomazelli & Villwock, 1991, 2000, 2005). Esses sistemas se originaram de quatro eventos de transgressão/regressão marinha. O primeiro episódio resultou no sistema deposicional Laguna-Barreira I, mais antigo, com cerca de 400 mil anos, a formação desse sistema encontra-se preservado próximo à Barra do Ribeiro e Tapes, sendo interrompida pela Laguna dos Patos, tendo continuidade da capital do estado do RS, Porto Alegre, até Osório (Fig. 5) (Tomazelli & Villwock, 2005).

A ocorrência de um segundo evento deu origem à formação do sistema deposicional Laguna-Barreira II, há aproximadamente 325 mil anos, correspondendo ao primeiro isolamento da Lagoa Mirim, sistema que permanece preservado desde o Chuí até Pelotas (Fig. 5). O terceiro evento gerou o sistema deposicional Laguna-Barreira III, sistema responsável por implantar definitivamente a Laguna dos Patos e por reforçar o isolamento da região sul da Lagoa Mirim do oceano Atlântico, ocorrido há cerca de 125 mil anos (Fig. 5). Dessa forma, os sistemas “Laguna-Barreira” (I-III) tiveram a sua gênese durante o Pleistoceno do período Quaternário. Por fim, temos o último processo de transgressão/regressão marinha que formou o sistema deposicional do tipo Laguna-Barreira IV, o mais recente, com cerca de 5 mil anos (Tomazelli & Villwock, 2005). A formação do sistema IV foi de suma importância para a origem dos ambientes aquáticos

continentais da PCRS, pois foi responsável por isolar a Lagoa Mirim (Tomazelli & Villwock, 2005) e os corpos lagunares do litoral norte do oceano Atlântico (Schwarzbold & Schäfer, 1984), além de formar a Lagoa do Peixe e a Lagoa Mangueira. A última é originada por dois sistemas deposicionais, ao oeste compreende o sistema tipo III e ao leste o sistema tipo IV (Fig. 5) (Tomazelli & Villwock, 1991, 2000, 2005).

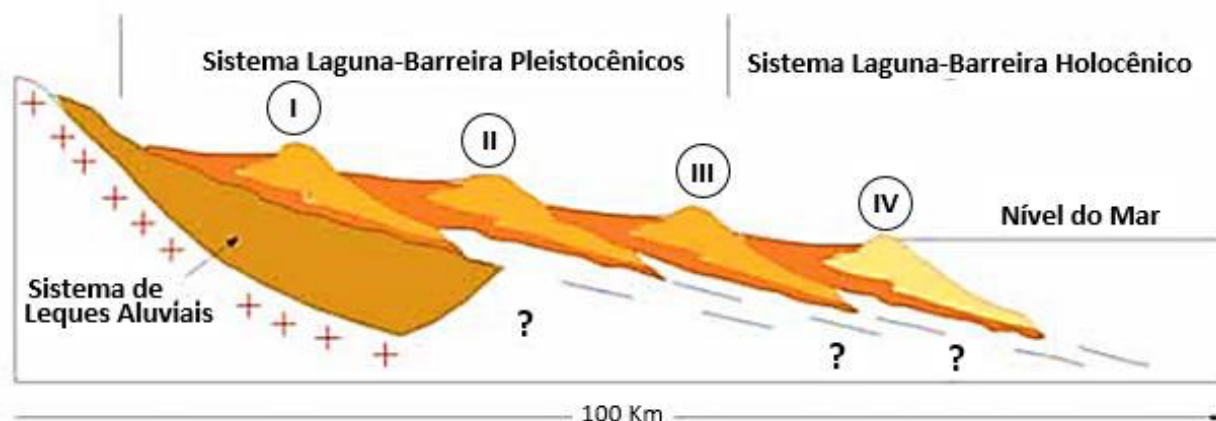


Figura 4: Formação dos sistemas deposicionais da Planície Costeira do Rio Grande do Sul (modificado de Tomazelli & Villwock, 2005). (Retirado de Mapeamento Geológico de Planícies Costeiras: o Exemplo da Costa do Rio Grande do Sul).

Portanto, as regressões e transgressões marinhas que deram origem às barreiras físicas da PCRS, também formaram e moldaram os principais corpos d'água que se encontram na PCRS, além de serem responsáveis por alterar as relações entre os ambientes, como as lagoas, estuários, lagoas, áreas úmidas e drenagens (Tomazelli & Villwock, 2005). A PCRS possui corpos d'água que fazem parte de seis bacias hidrográficas litorâneas localizadas na região leste e sul do estado do RS (FEPAM, 2020), a bacia hidrográfica do Rio Mampituba, a do Rio Tramandaí, a do Litoral Médio, a do Rio Camaquã, a do Rio Jaguarão e a do Rio Piratini-São Gonçalo-Mangueira (FEPAM, 2020). Dessa forma, os principais corpos d'água dessas bacias hidrográficas que se encontram na PCRS tiveram a sua gênese influenciada pela evolução e dinâmica das barreiras que constituem a PCRS (Tomazelli & Villwock, 1991, 2000, 2005).

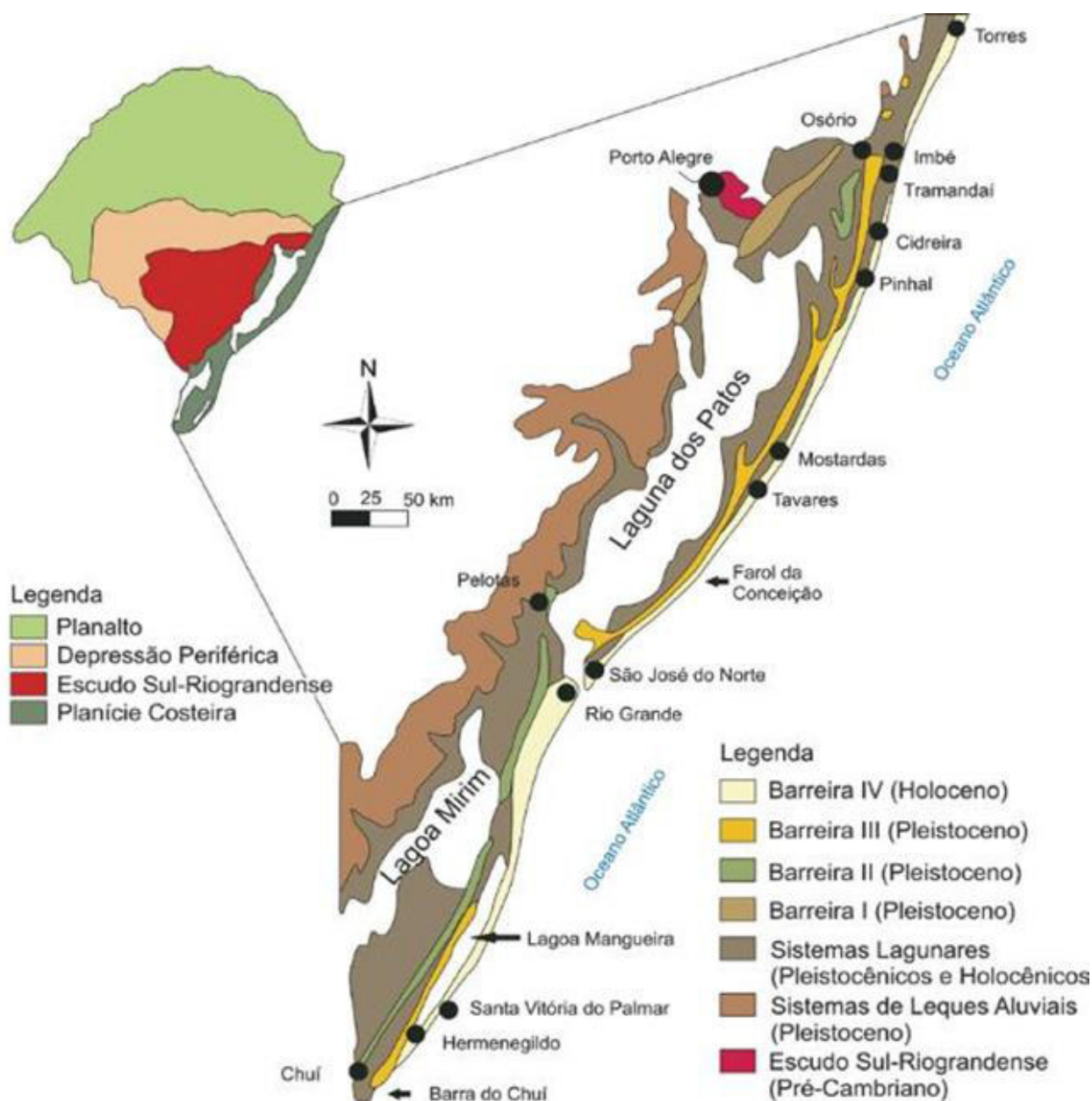


Figura 5: Mapa geológico da PCRS, mostrando as relações das bacias hidrográficas com os sistemas do tipo “Laguna-Barreira” adaptado de Tomazelli & Villwock (2005). (Retirado do Atlas Socioambiental: municípios de Mostardas, Tavares, São José do Norte e Santa Vitória do Palmar).

As bacias hidrográficas são importantes para a manutenção da diversidade de espécies aquáticas (Lévêque et al., 2008). Sendo isoladas umas das outras, bacias vizinhas podem apresentar conexões temporárias, visto que, devido a longos períodos de precipitação de chuva, pode haver um aumento nos níveis de água dos rios, gerando encontros entre os habitats (Ramos-Fregonezi et al. 2017). Esse contato passageiro atua sobre a distribuição dos peixes, que são capazes de se deslocar através de conexões diretas (ver também, Dagosta & Pinna, 2017). Contudo, para *Cnesterodon decemmaculatus*, esses ambientes foram aceitos como barreiras impedindo a

dispersão, visto que, as principais linhagens evolutivas de *C. decemmaculatus* estão estreitamente associadas às bacias hidrográficas (Ramos-Fregonezi et al., 2017).

Família Cichlidae

Os peixes Percomorpha da ordem Cichliformes compreendem duas espécies válidas da família Pholidichthyidae e 1.760 – 1.731 espécies válidas de Cichlidae (Nelson et al., 2016; Fricke et al., 2020). Os ciclídeos têm sido estudados por muitos pesquisadores que buscam, através de dados moleculares, morfológicos e ecológicos, compreender a história evolutiva do táxon, sua atual distribuição e diversificação (Farias et al., 1999, 2001; Kullander, 2003; Sparks, 2004; Sparks & Smith, 2004; Smith et al., 2008; López-fernández et al., 2010; McMahan et al., 2013; Burress, 2015; Svoldal et al., 2020).

Os ciclídeos são amplamente distribuídos, principalmente nos ambientes dulcícolas da África continental, das Américas, Madagascar, Seychelles, Índia, Sri Lanka e em poucos locais do Oriente Médio (Kullander, 2003; Sparks, 2004; Sparks & Smith, 2004; Smith et al., 2008). Os estudos moleculares e morfológicos de Sparks (2004), Sparks & Smith (2004) (Fig.6) e Smith et al. (2008) recuperaram quatro subfamílias de Cichlidae): Etroplinae, com dois gêneros apenas, *Paretroplus* de Madagascar e *Etroplus* da Índia e Sri Lanka. Essa subfamília é um grupo monofilético de 16 espécies e irmão de todas as outras subfamílias (Fricke et al., 2020); Ptychochrominae é monofilética e grupo irmão das subfamílias neotropicais e africanas, estando suas 16 espécies válidas distribuídas em Madagascar (Sparks & Smith 2004; Fricke et al., 2020); Pseudocrenilabrinae são ciclídeos da África e Oriente Médio possuindo 1.127 espécies; e, por último, com 567 espécies válidas, Cichlinae da América Central e do Sul, México, e Texas nos Estados Unidos (Farias et al., 1999; Sparks, 2004; Sparks & Smith, 2004; Fricke et al., 2020).

A origem e a distribuição atual dos ciclídeos é explicada por três hipóteses concorrentes: (1) origem gondwânica, com uma linhagem ancestral vivendo nas águas doces do supercontinente e que divergiu por vicariância devido à fragmentação das placas (2) uma dispersão oceânica de longa distância mais recente ou (3) múltiplas invasões independentes a partir de um ancestral marinho desconhecido (Chakrabarty, 2004; Sparks & Smith, 2005; Matschiner et al., 2020). Independentemente de sua origem, colonizaram na sua área de distribuição ambientes tão diferentes como rios e lagos, tanto pequenos quanto grandes, águas doces até salobras, corredeiras, pequenos riachos, crateras e lagos alcalinos (Barlow, 2008; Svoldal et al., 2020).

São considerados modelos evolutivos chave nos estudos de radiação adaptativa, isto é, a evolução relativamente rápida de uma multitude de espécies a partir de uma ou poucas linhagens

ancestrais; essas linhagens divergiram fenotipicamente ao se adaptarem a nichos ecológicos distintos (Gavrilets & Losos, 2009; Ronco et al., 2021). A variabilidade excepcional dos ciclídeos se expressa no número de espécies descritas até o momento e, principalmente, no número estimado de 3.000 a 4.000 (ver a revisão de Salzburger, 2018). Essas espécies podem ser identificadas por uma combinação de caracteres morfológicos únicos (Fig. 7) como, por exemplo, apenas uma única narina de cada lado do focinho, linha lateral interrompida, nadadeira dorsal e anal com espinhos (7—25 e 3—15, respectivamente) e raios moles (3—15 e 4—30, respectivamente); eles também possuem um aparato mandibular peculiar, que inclui uma mandíbula faríngea que é independente da mandíbula oral (Nelson et al., 2016; Salzburger, 2018).

Contudo, a diversidade dos ciclídeos não se expressa somente em termos taxonômicos. Ela se estende à forma (com corpos indo de alongados até discoides), ao tamanho (de poucos centímetros até 3 m de comprimento) e às nadadeiras, que podem ser tanto baixas como altas. Muito da diversidade ecológica dos ciclídeos também está relacionada às modificações do aparato mandibular oral, especializado para captação de recursos, enquanto a morfologia da mandíbula faríngea se especializou no processamento do alimento. Essa inovação chave aparentemente aumentou o repertório trófico possível, contribuindo com a diversificação e especialização, resultando em diferentes dietas interespecíficas (Conith & Albertson, 2021; Ronco & Salzburger, 2021). Por causa de seus padrões de coloração muitas vezes conspicuos e variados, eles são muito populares entre os aquaristas. São conhecidos também por apresentar mimetismo e camuflagem (Maan & Sefc, 2013; Boileau et al., 2015).

Aspectos da história de vida dos ciclídeos também se relacionam com a sua diversidade. Existem desde espécies territoriais até aquelas que formam cardume, sendo que todos os ciclídeos apresentam algum tipo de cuidado parental com ou sem incubação de ovos e/ou larvas (Barlow, 2008; Alonso et al., 2011). Quando há incubação na cavidade oral, os ovos fertilizados e os recém-nascidos são carregados pela fêmea e, nesse caso, os peixes são geralmente polígamos (Fishelson, 2003; Kocher, 2004; Nelson et al., 2016). Quando a incubação é no substrato, os ovos fertilizados são depositados no substrato (Fishelson, 2003; Nelson, 2016) e o cuidado é feito pelos pais, geralmente monogâmicos (Nelson, 2016). No entanto, existem espécies de ciclídeos que combinam os dois tipos de cuidado, ou seja, os ovos fertilizados são depositados em substrato, mas assim que os ovos eclodem os recém-nascidos são incubados na boca dos pais. O tipo de cuidado parental com incubação bucal ou oral surgiu de forma independente em vários grupos de linhagens africanas, mas não é muito conhecido entre as linhagens de ciclídeos neotropicals (Nelson, 2016).

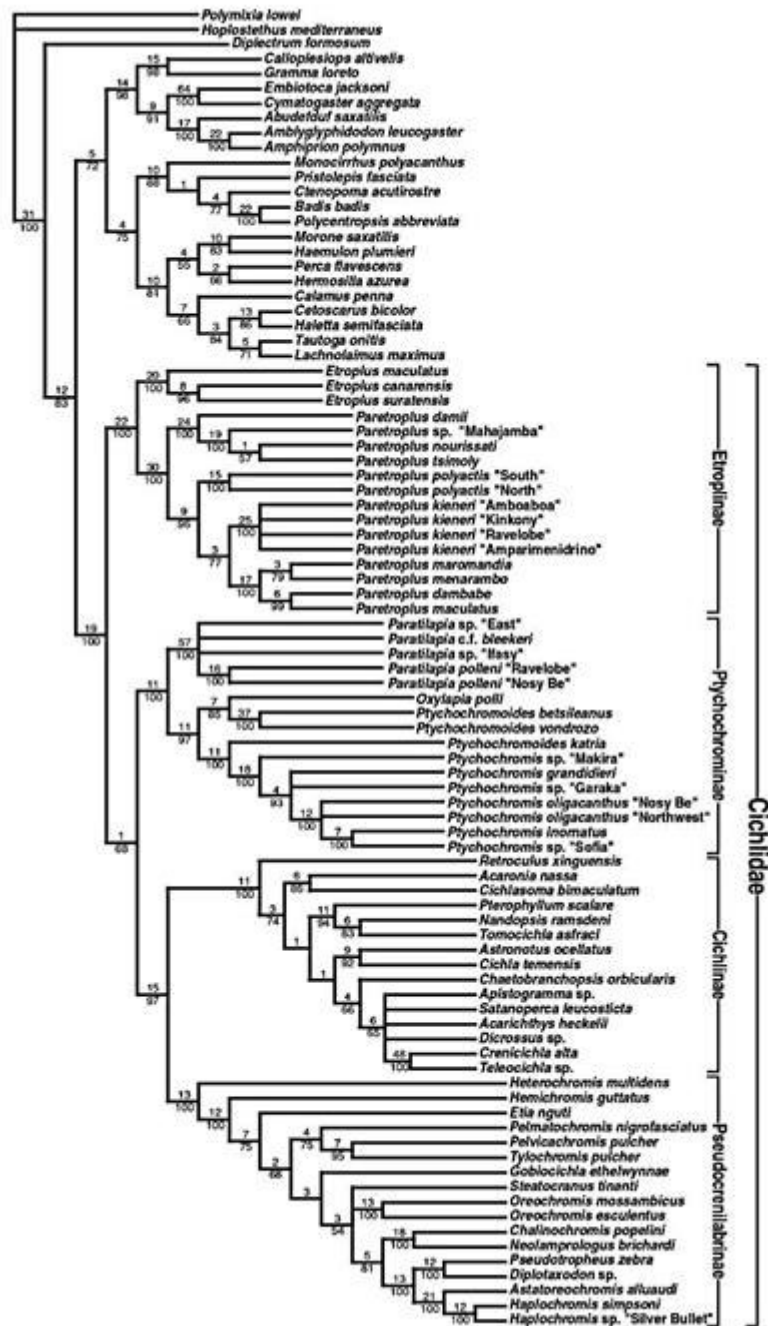


Figura 6: Cladograma demonstrando as relações filogenéticas das subfamílias da família Cichlidae (modificado de Sparks & Smith, 2004). (Retirado de Phylogeny and biogeography of cichlid fishes (Teleostei: Perciformes: Cichlidae)).

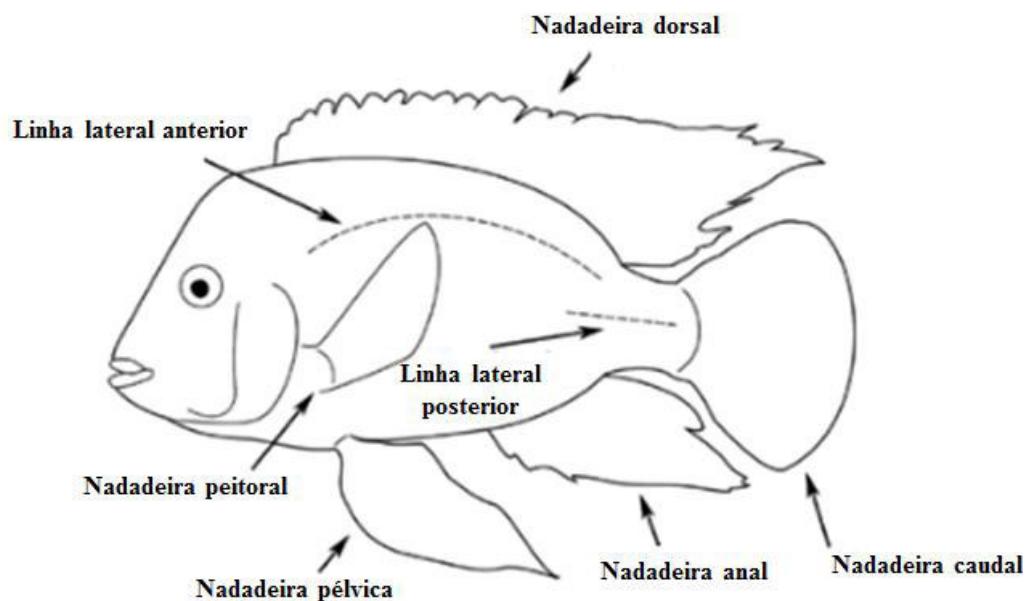


Figura 7: Características fenotípicas dos ciclídeos (adaptado de Malabarba et al., 2013). (Retirado do Guia de identificação dos peixes da bacia do Rio Tramandaí).

Subfamília Cichlinae

Segundo os estudos de Sparks & Smith, (2004) e Smith et al. (2008), a subfamília Cichlinae é monofilética. Cichlinae possui 79 gêneros descritos e 567 espécies distribuídas em 7 tribos (Fig. 8), Cichlini, Retroculini, Astronotini, Chaetobranchinini, Geophagini, Cichlasomatini e Heroini. As três últimas são as mais diversas, com 18 gêneros e 250 espécies, 11 gêneros e 70 espécies, e 30 gêneros e 150 espécies, respectivamente (López-Fernández et al., 2005a, 2005b, 2010; Smith et al., 2008; Fricke et al., 2020). Portanto, as principais tribos da subfamília Cichlinae (Smith et al., 2008) estão distribuídas em vários ecossistemas dulcícolas da América do Sul e sul do Panamá (Geophagini e Cichlasomatini) e da América do Sul, América Central e do Norte (Heroini) (López-fernández et al., 2010; Steele & López-Fernández, 2014). Alguns estudos demonstraram as relações filogenéticas entre as tribos de Cichlinae. Smith et al. (2008), usando marcadores mitocondriais (16s, COI, Cyt-b, ND4) e nucleares (4C4, H3, M27, S7, RAG2), encontraram Cichlini e Retroculini como o grupo irmão das outras cinco tribos (Fig. 8). Farias et al. (1999) usando o marcador mitocondrial (16S) recuperaram a tribo Retroculini como grupo irmão das demais tribos (Fig. 9). Ainda em Smith et al. (2008) a tribo Astronotini foi recuperada como grupo irmão das quatro tribos (Chaetobranchini, Cichlasomatini, Geophagini e Heroini) e as tribos Geophagini e Chaetobranchini constituem o grupo irmão de Cichlasomatini e Heroini (Fig. 9).

Os ciclíneos neotropicais apresentam inúmeras variações em suas características,

morfológicas (Smith et al., 2008; Steele & López-Fernández, 2014) e ecológicas (Burrell, 2015). Com cuidado parental, seus ovos são depositados em um substrato, e protegidos pelos pais por durante dias ou semanas (Kullander, 2003). Além disso, os pais protegem seus filhotes mesmo depois dos ovos eclodirem, ou seja, os recém-nascidos que nadam livremente continuam sendo vigiados por algum tempo (Kullander, 2003). Com relação aos sexos, a maioria das espécies de ciclídeo que vivem nas regiões neotropicais possui dimorfismo sexual (Kullander, 2003). Com isso, os sexos podem diferir quanto à coloração e ao tamanho, com desvio de tamanho em favor dos machos. No entanto, a ecologia, a distribuição e a história de vida são fatores que influenciam no tamanho e formato do corpo das espécies (Steele & López-Fernández, 2014). Por causa disso, os ciclídeos neotropicais apresentam uma grande variedade de tamanhos do corpo (Steele & López-Fernández, 2014) com a média em torno de 10 a 20 cm (Kullander, 2003).

Segundo Kullander (2003) o cuidado parental e a forma corporal, somados a outros caracteres morfológicos, são usados para identificar a subfamília. Conter apenas uma única narina em cada lado da cabeça, com a linha lateral frequentemente dividida em duas, uma superior anterior que termina abaixo do final da base da nadadeira dorsal e uma inferior posterior que corre ao longo do meio do pedúnculo caudal, são caracteres utilizados para identificar os Cichlinae. Além disso, nos ciclídeos neotropicais encontramos cerca de 7 a 24 espinhos na nadadeira dorsal (normalmente com 13 a 16), na nadadeira anal são encontrados em torno de 2 a 12 espinhos (em geral com 3 e raramente com 5) (Kullander, 2003). Em sua área de distribuição ocuparam nichos tróficos especializados sendo insetívoros, piscívoros, detritívoros, peneiradores de substrato e frugívoros (Kullander, 2003; López-Fernández et al., 2013). Essas diferentes adaptações evolutivas permitem que os Cichlinae neotropicais sejam muito diversificados (Steele & López-Fernández, 2014) e ocupem vários ecossistemas de águas doces, sendo encontrados em ambientes lênticos, como lagunas, lagoas, e áreas úmidas e ambientes lóticos, como rios e riachos (Kullander, 2003; Sparks & Smith, 2004; López-Fernández et al., 2010; McMahan et al., 2013). Portanto, essas características tornam a subfamília Cichlinae (Sparks & Smith, 2004), assim como sua família, um modelo ideal para estudos evolutivos (Sparks & Smith, 2004; Smith et al., 2008; López-Fernández, 2010).

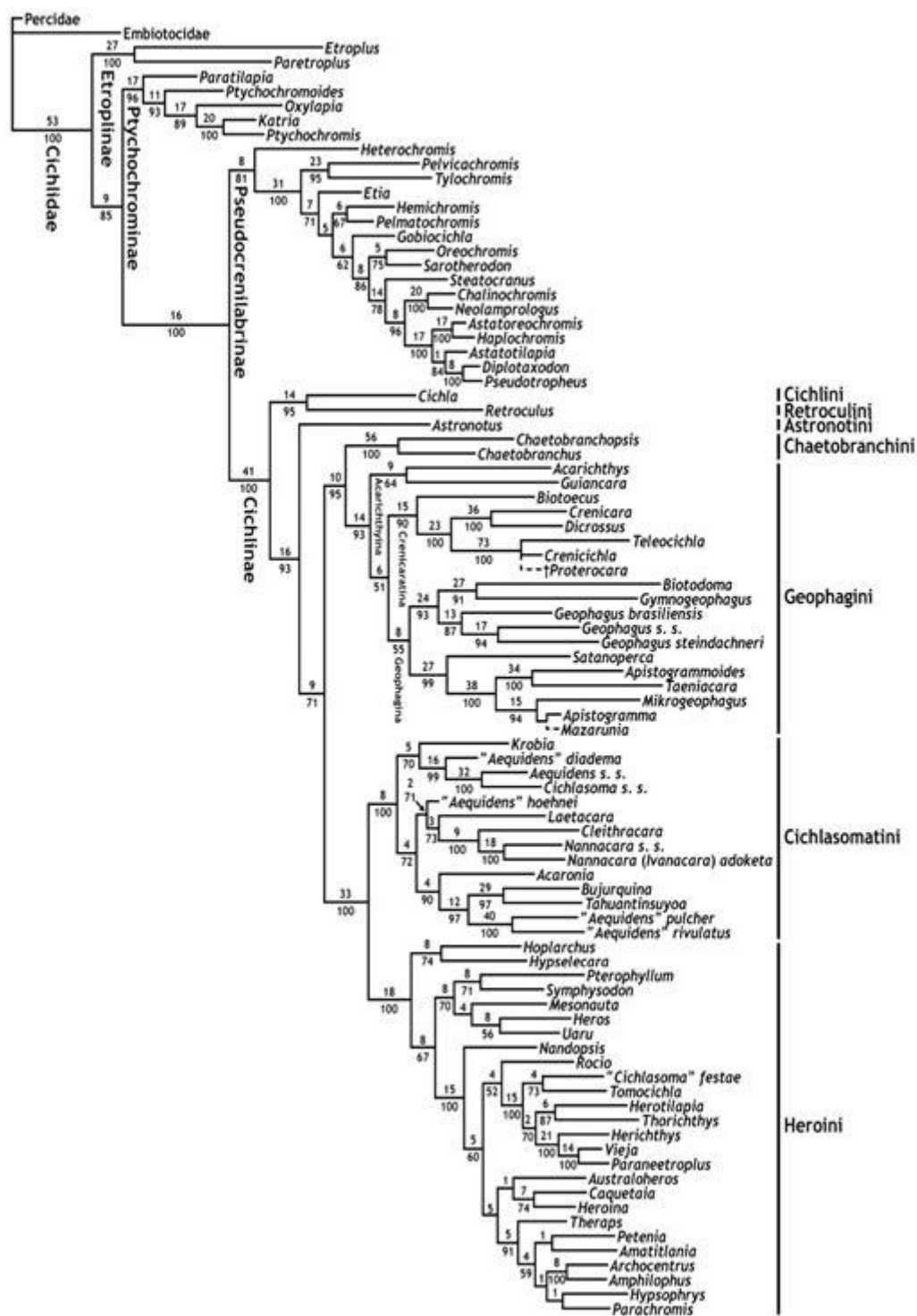


Figura 8: Cladograma com as relações filogenéticas das 7 tribos da subfamília Cichlinae (modificado de Smith et al., 2008). (Retirado de Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae)).

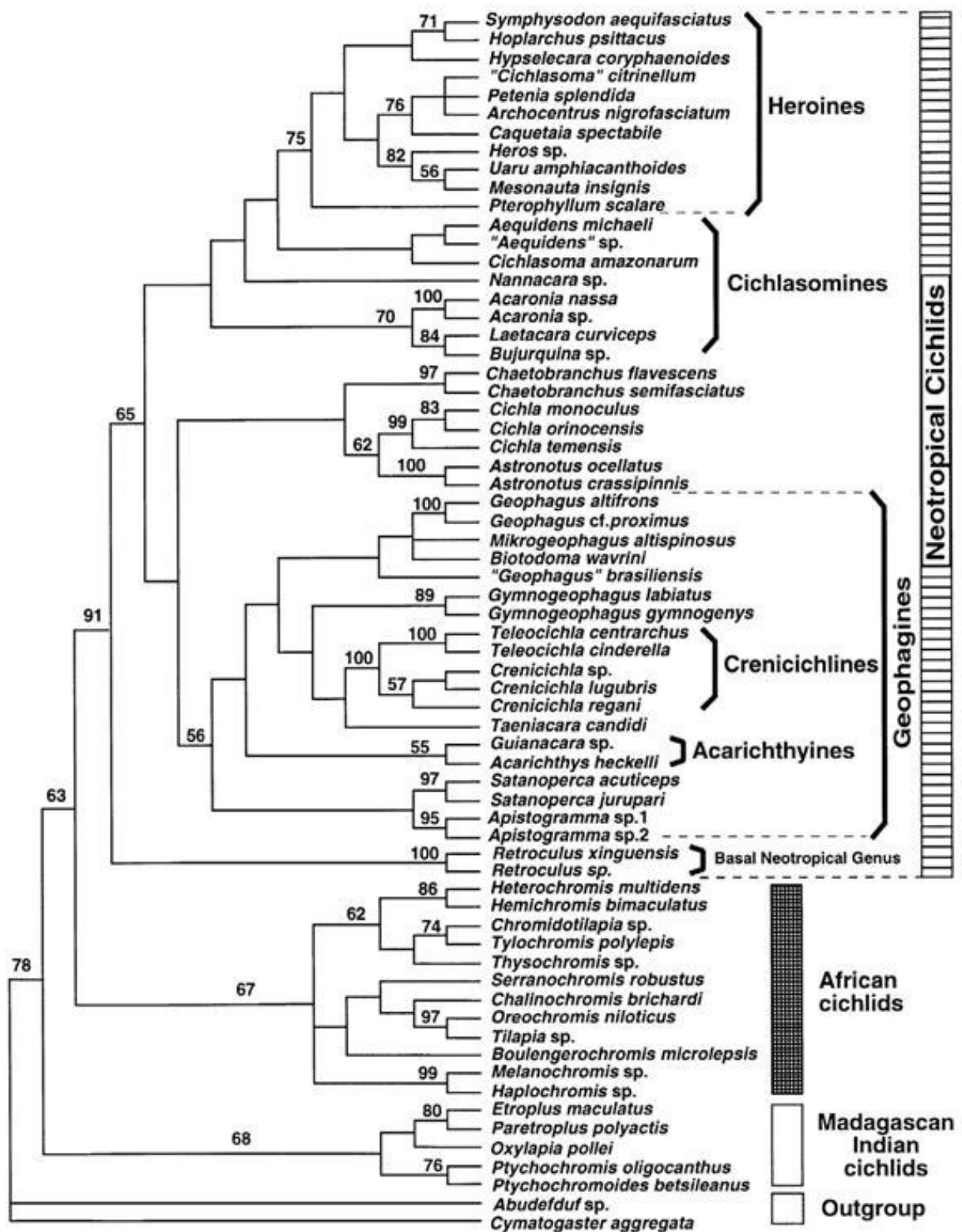


Figura 9: Cladograma com as relações filogenéticas das tribos da subfamília Cichlinae (modificado de Farias et al., 1999). (Retirado de Mitochondrial DNA Phylogeny of the Family Cichlidae: Monophyly and Fast Molecular Evolution of the Neotropical Assemblage).

***Cichlasoma portalegreense* (Hensel, 1870)**

Cichlasoma foi remodelado pela exclusão de várias espécies e realocação dessas em gêneros da tribo Heroini (Říčan & Kullander, 2006; McMahan et al., 2013). Atualmente *Cichlasoma* é restrito à 16 espécies de tamanho pequeno a médio, exclusivas da América do Sul e de distribuição aparentemente alopátrica (ver alguns exemplos na Tabela 1). Pertencente à subfamília Cichlinae e à tribo Cichlasomatini (Fig. 10) (Říčan & Kullander, 2006), *C. portalegreense* é popularmente conhecido como Acará (Kullander, 2003), Acará-do-lodo ou Cará (Fishbase, 2020). Algumas características são usadas para o reconhecimento da espécie em campo, como a presença de três espinhos na nadadeira anal, uma mancha escura logo abaixo da linha lateral e faixas verticais escuras nas laterais do corpo. Adicionalmente, na nadadeira caudal e na parte posterior das nadadeiras dorsal e anal apresenta pequenas manchas claras circulares ou alongadas e mancha escura na parte final e superior no pedúnculo caudal (Malabarba et al., 2013) (Fig. 11). Consequentemente, essas características são úteis também para distinguir a espécie de *Australoheros acaroides* (Schindler et al., 2010), espécie coletada sintopicamente com *C. portalegreense* em muitos corpos d'água. Embora as espécies de *Cichlasoma* apresentem distribuições não sobrepostas, o que torna a sua classificação inicial facilitada, a introdução de espécies em locais que não correspondem à sua distribuição nativa é comum. Por exemplo, pelo menos oito espécies alóctones foram registradas no Rio Una, afluente do Rio Paraíba do Sul na região do Vale do Paraíba do Sul Paulista, entre elas *C. portalegreense* (Honorio & Martins, 2018).

Tabela 1: Gênero *Cichlasoma*, número de espécies e distribuição geográfica.

Gênero <i>Cichlasoma</i> (Swainson, 1839)	
Espécie	Distribuição geográfica/América do Sul
<i>Cichlasoma portalegrense</i> (Hensel, 1870)	Bacias hidrográficas associadas à Laguna dos Patos e bacia hidrográfica do rio Tramandaí no Rio Grande do Sul, Brasil.
<i>Cichlasoma paranaense</i> (Kullander, 1983)	Bacia hidrográfica do Rio Paraná, drenagem do alto Rio Paraná acima de Guaíra, Brasil.
<i>Cichlasoma araguaense</i> (Kullander, 1983)	Bacia hidrográfica do Rio Amazonas, nas bacias hidrográficas do Rio Tocantins e alto Xingu, Brasil.
<i>Cichlasoma boliviense</i> (Kullander, 1983)	Bacia hidrográfica do Rio Amazonas, na drenagem Madre de Dios, no Peru, e bacias hidrográficas dos rios Mamoré e Guaporé.
<i>Cichlasoma pusillum</i> (Kullander, 1983)	Bacia hidrográfica dos rios Paraná e Acaray, Paraguai.
<i>Cichlasoma sanctifranciscense</i> (Kullander, 1983)	Bacias hidrográfica dos rios São Francisco, Parnaíba e Capivara, Brasil.
<i>Cichlasoma orientale</i> (Kullander, 1983)	Rios da costa atlântica do Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Paraíba, Brasil.
<i>Cichlasoma taenia</i> (Bennett, 1831)	Trinidad e nordeste da Venezuela.
<i>Cichlasoma dimerus</i> (Heckel, 1840)	Bacias hidrográficas do Rio Paraná, do Rio Paraguai no Brasil, Bolívia e Paraguai, e do Rio Paraná da Argentina.
<i>Cichlasoma zarskei</i> (Ottoni, 2011)	Bacia hidrográfica do Rio Maranhão, norte do Brasil.
<i>Cichlasoma bimaculatum</i> (Linnaeus, 1758)	Bacia hidrográfica do Rio Orinoco, no Caroni no Rio Venezuela; Guianas, do Rio Essequibo ao Rio Sinnamary; bacia do Rio Amazonas, na bacia do alto Rio Branco.
<i>Cichlasoma orinocense</i> (Kullander, 1983)	Bacia hidrográfica do Rio Orinoco, em afluentes da margem esquerda do Rio Orinoco, desde o Rio Meta na Colômbia até cerca de Ciudad Bolívar na Venezuela.
<i>Cichlasoma amazonarum</i> (Kullander, 1983)	Bacia hidrográfica do Rio Amazonas, desde as drenagens dos rios Ucayali, Huallaga, Amazonas e Yavarí no Peru, ao longo do Rio Amazonas-Solimões na Colômbia e Brasil até a foz; também na Guiana Francesa e no Amapá, Brasil.

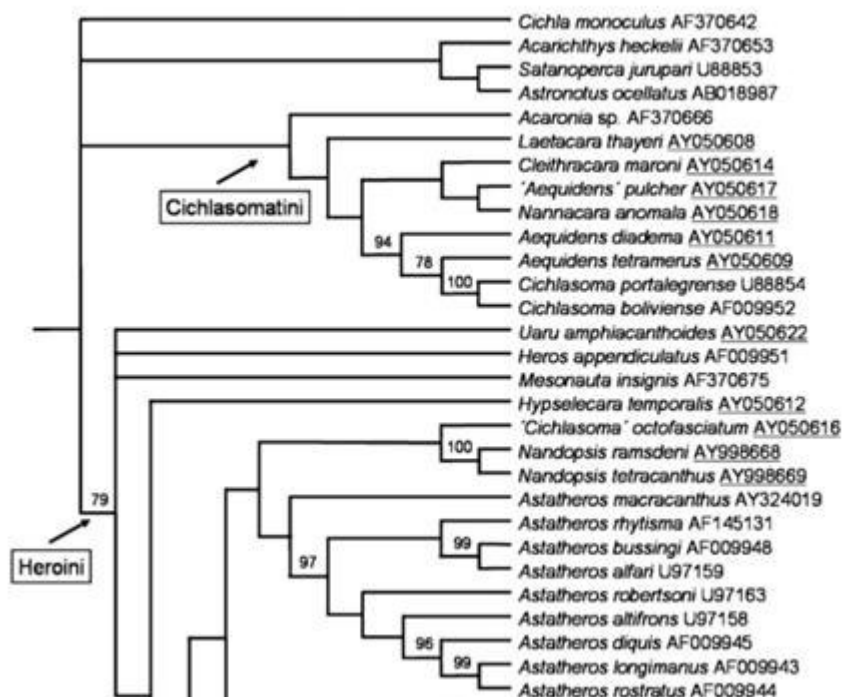


Figura 10: Cladograma demonstrando a posição de *Cichlasoma portalegrense* dentro das tribos (modificado de Řičan & Kullander, 2006). (Retirado de Character-and tree-based delimitation of species in the ‘*Cichlasoma*’ *facetum* group (Teleostei, Cichlidae) with the description of a new genus).



Figura 11: Espécime de *Cichlasoma portalegrense*, modificado de Malabarba et al., 2013. (Retirado do Guia de identificação dos peixes da bacia do Rio Tramandaí).

Durante 20 anos, um peixe ciclídeo invasor das águas da Florida, América do Norte, foi mal identificado como sendo *C. bimaculatus*. Depois da sua introdução nos anos 1960, o *C. bimaculatus*, estabelecido ao sul, expandiu sua distribuição para a região oeste e central da Florida ou essa expansão foi uma segunda introdução, da mesma ou outra espécie de ciclídeo. A identidade do ciclídeo da Florida central e do oeste foi disputada por três espécies: *C. portalegrense*, *C. bimaculatum* e *C. dimerus* (Robins et al., 2020). Embora filogeneticamente relacionadas e

morfologicamente semelhantes, diferenças no número de dentes na mandíbula inferior (*C. portalegrense* contém cerca de 11-15 e *C. dimerus* 16-24 (Fig. 12)) e diferenças no padrão de coloração na nadadeira caudal foram determinantes na identificação dos espécimes como sendo *C. dimerus* (Robins et al., 2020). *Cichlassoma bimaculatum* é nativo da Venezuela, Guiana, Suriname, oeste da Guiana Francesa, e norte do Brasil, e a espécie já se distribui por toda a Península do sul da Flórida. Por sua vez, *C. dimerus* (Fig. 13), encontrando-se distribuída na América do Sul, nas bacias hidrográficas do Rio Paraná, do Rio Paraguai no Brasil, Bolívia e Paraguai, e do Rio Paraná da Argentina (Fishbase, 2020).

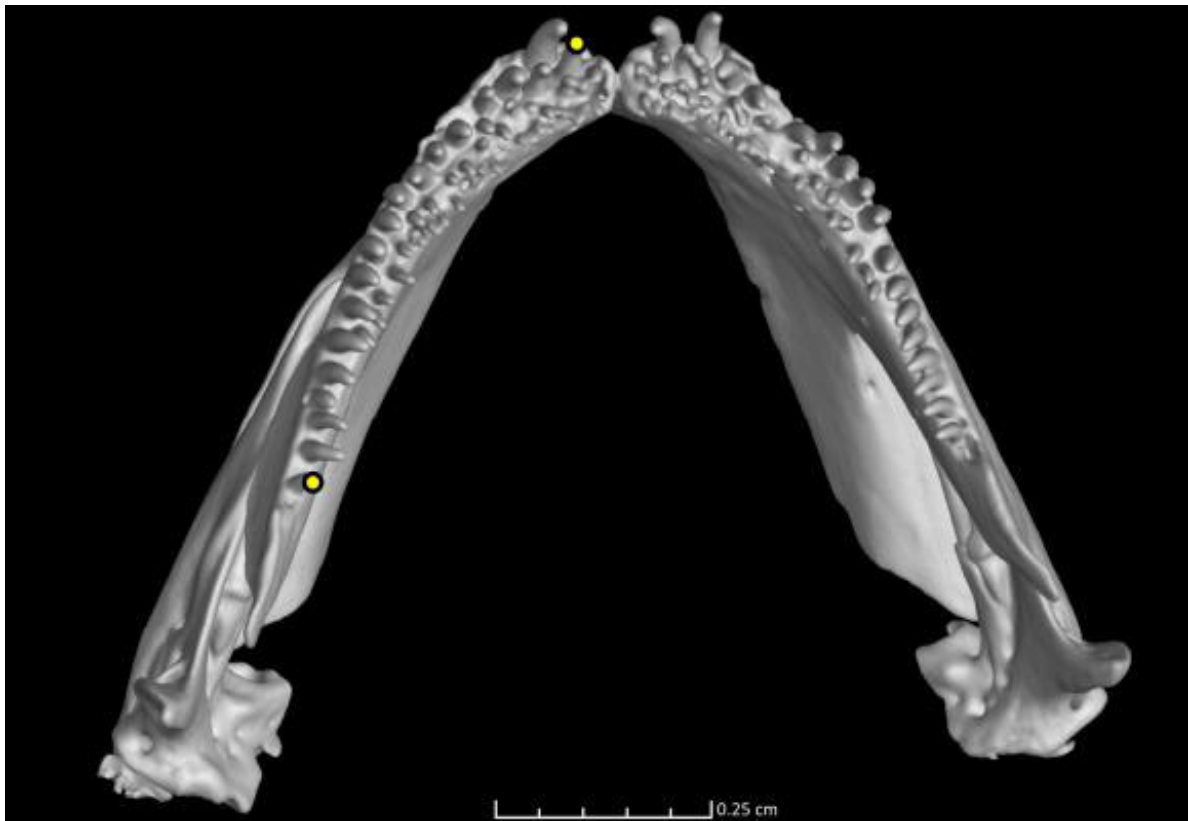


Figura 12: Tomografia computadorizada da mandíbula inferior de *Cichlasoma dimerus*, mostrando 18 dentes. O ponto amarelo superior marca a posição do dente número 1 (mandíbula inferior esquerda). O ponto amarelo inferior marca a posição do dente número 18, modificado de Robins et al. (2020). (Retirado de Identification of acara (Cichlidae: *Cichlasoma*) established in Florida, USA).



Figura 13: Espécime de *Cichlasoma dimerus*, modificado de Robins et al., 2020. (Retirado de Identification of acara (Cichlidae: *Cichlasoma*) established in Florida, USA).

Cichlasoma portalegrense está distribuída em ambientes límnicos da bacia hidrográfica do Rio Tramandaí e das bacias hidrográficas associadas à Laguna dos Patos (também conhecidas como bacias litorâneas), localizadas no extremo sul do Brasil (Kullander, 2003; Malabarba et al., 2013; FEPAM 2020). Dentro dessas bacias hidrográficas, a espécie tem sido encontrada na região geomorfológica da PCRS, tanto em ambientes lênticos, com vegetação densa, em áreas alagadas permanentemente e áreas úmidas, em que são abundantes (Maltchik et al., 2010), como em ambientes lóticos, geralmente em regiões arenosas ou lodosas (Malabarba et al., 2013). Típica dos lagos rasos da cidade de Porto Alegre (Malabarba et al., 2013), é uma espécie de água doce que suporta intervalo de pH de 6,5 a 7,0 e tem alcance de 3 a 10 metros de profundidade, com uma faixa de distribuição ecológica tropical de 16° C a 24°C e com tamanho máximo de 10,3 cm de comprimento padrão (CP) (Kullander, 2003; Malabarba et al., 2013). Seus ovos são colocados em substratos sólidos e fertilizados externamente pelos machos. É uma espécie onívora bentônica, ingerindo insetos e peixes em sua alimentação (Hartz, 1997; Malabarba et al., 2013; de Souza Santos et al., 2020).

Cichlasoma portalegrense é pouco estudada e mesmo sendo uma espécie de ampla distribuição nos corpos d'água da PCRS (Kullander, 2003; Malabarba et al., 2013), informações sobre a sua história de vida, diversidade e estrutura genética são inexistentes. Neste sentido, a caracterização genética de populações dessa espécie é inédita, e representa um primeiro esforço de compreender a história evolutiva, a distribuição geográfica, e a estruturação genética, além de elucidar questões taxonômicas, demográficas e conservacionistas relacionadas à *C. portalegrense* ao longo da quase totalidade da sua distribuição.

OBJETIVO GERAL

Investigar as variações morfológicas e os níveis de diversidade e estrutura genética dentro e entre populações de *C. portalegrense* provenientes da região geomorfológica da Planície Costeira das bacias hidrográficas do Rio Tramandaí, do Rio Camaquã, Piratini - São Gonçalo – Mangueira e do Baixo Jacuí, procurando reconstruir a história evolutiva dessa espécie.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Determinar os níveis de diversidade genética dentro das populações;
- II. Determinar se existem diferenças nos níveis de diversidade genética das populações da Planície Costeira do RS de diferentes bacias hidrográficas;
- III. Detectar a presença de diversidade críptica;
- IV. Analisar a estruturação genética dessa espécie entre bacias hidrográficas;
- V. Analisar a variação morfológica entre as populações;
- VI. Analisar se a diversificação genética e morfométrica desta espécie está relacionada com um possível histórico de colonização da PCRS.

HIPÓTESE

A distribuição espacial da diversidade (estruturação) genética desta espécie foi moldada pelos processos históricos geoclimáticos responsáveis pela formação dos sistemas deposicionais da PCRS.

REFERÊNCIAS

- Alonso, F., M. Cánepa, R. G. Moreira, & M. Pandolfi, 2011. Social and reproductive physiology and behavior of the Neotropical cichlid fish *Cichlasoma dimerus* under laboratory conditions. *Neotropical Ichthyology* 9: 559–570.
- Alves-Silva, A. P., & J. A. Dergam, 2015. Cryptic speciation within the neotropical cichlid *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Teleostei Cichlidae): A new paradigm in karyotypical and molecular evolution. *Zebrafish* 12: 91–101.
- Avise, J. C., 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb, & N. C. Saunders, 1987. Intraspecific Phylogeography: The mitochondrial dna bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489–522.
- Avise, J. C., J. E. Neigel, & J. Arnold, 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution* 20: 99–105.
- Allendorf, F. W., G. Luikart, & S. N. Aitken, 2013. *Conservation and the Genetics of Populations*. John Wiley & Sons, Oxford.
- Beheregaray, L. B., L. V. Pfeiffer, C. R. M. Attard, J. Sandoval-Castillo, F. M. C. B. Domingos, L. K. Faulks, D. M. Gilligan, & P. J. Unmack, 2017. Genome-wide data delimits multiple climate-determined species ranges in a widespread Australian fish, the golden perch (*Macquaria ambigua*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 111: 65–75.
- Beheregaray, L. B., P. Sunnucks, & D. A. Briscoe, 2002. A rapid fish radiation associated with the last sea-level changes in southern Brazil: The silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 269: 65–73.
- Berbel-Filho, W. M., P. A. Martinez, T. P. A. Ramos, R. A. Torres, & S. M. Q. Lima, 2016. Inter- and intra-basin phenotypic variation in two riverine cichlids from northeastern Brazil: potential eco-evolutionary damages of São Francisco interbasin water transfer. *Hydrobiologia* 766: 43–56.
- Barlow G., 2008. *The Cichlid fishes: nature's grand experiment in evolution*. Basic Books, New York.
- Boileau, N., F. Cortesi, B. Egger, M. Muschick, A. Indermaur, A. Theis, H. H. Büscher, & W. Salzburger, 2015. A complex mode of aggressive mimicry in a scale-eating cichlid fish. *Biology Letters* 11: 0–3.

- Brown, K. H., 2008. Fish mitochondrial genomics: Sequence, inheritance and functional variation. *Journal of Fish Biology* 72: 355–374.
- Brown, W. M., M. George, & A. C. Wilson, 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 1967–1971
- Burruss, E. D., 2015. Cichlid fishes as models of ecological diversification: patterns, mechanisms, and consequences. *Hydrobiologia* 748: 7–27.
- Cantatore, P., M. Roberti, G. Pesole, A. Ludovico, F. Milella, M. N. Gadaleta, & C. I. Saccone, 1994. Evolutionary analysis of Cytochrome b Sequences in some Perciformes: Evidence for a slower rate of evolution than in Mammals. *Journal of Molecular Evolution* 39: 589–597.
- Chakrabarty, P., 2004. Cichlid biogeography: comment and review. *Fish and Fisheries* 5: 97–119.
- Clark, R. W., W. S. Brown, R. Stechert, & K. R. Zamudio, 2008. Integrating individual behaviour and landscape genetics: The population structure of timber rattlesnake hibernacula. *Molecular Ecology* 17: 719–730.
- Conith, A. J., & R. C. Albertson, 2021. The cichlid oral and pharyngeal jaws are evolutionarily and genetically coupled. *Nature Communications Springer US* 12: 1–11.
- Dagosta, F. C. P., & M. de Pinna, 2017. Biogeography of Amazonian fishes: deconstructing river basins as biogeographic units. *Neotropical Ichthyology* 15: 1–24.
- de Souza Santos, A. A., L. W. Cavaleiro, & C. B. Fialho, 2020. Interactions between diet, pharyngeal jaw and ontogeny in *Cichlasoma portalegrense* (Cichliformes: Cichlidae). *Environmental Biology of Fishes* 103: 1045–1059.
- Diamante, N. A., A. V. de Oliveira, A. C. Petry, P. A. Catelani, F. M. Pelicice, S. M. A. P. Prioli, & A. J. Prioli, 2017. Molecular analysis of invasive *Cichla* (Perciformes: Cichlidae) populations from neotropical ecosystems. *Biochemical Systematics and Ecology* 72: 15–22.
- Farias, I. P., G. Ortí, I. Sampaio, H. Schneider, & A. Meyer, 2001. The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: The limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of Molecular Evolution* 53: 89–103.
- Farias, I. P., G. Ortí, I. Sampaio, H. Schneider, & A. Meyer, 1999. Mitochondrial DNA phylogeny of the family Cichlidae: Monophyly and fast molecular evolution of the neotropical assemblage. *Journal of Molecular Evolution* 48: 703–711.
- Fishelson, L., 2003. Comparison of Testes Structure, Spermatogenesis, and Spermatocytogenesis in Young, Aging, and Hybrid Cichlid Fish (Cichlidae, Teleostei). *Journal of Morphology*: 285–300.

- Frankham, R., 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation Elsevier* 126: 131–140.
- Frankham, R., 2010. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation Elsevier* 143: 1919–1927.
- Freeland, J. R., 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley e Sons, Chichester.
- Freeland, J. R., H. Kirk, & S. Petersen, 2011. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Chichester.
- FEPAM, 2020. Região hidrográfica do litoral. [http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/bacias_hidro.asp]. Acessado em 18 de abr de 2020.
- Fishbase, 2020. *Cichlasoma portalegrense*. [<https://www.fishbase.se/summary/Cichlasoma-portalegrense>]. Acessado em 10 de jul de 2020.
- Fricke, R., W. N. Eschmeyer, & J.D. Frong, 2020. Species by family/ subfamily in the Catalog of Fishes Catalog of Fishes. [versão eletrônica]. [<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>]. Acessado em 20 de mai de 2020.
- Garcez, D. K., C. Barbosa, M. Loureiro, M. V. Volcan, D. Loebmann, F. M. Quintela, & L. J. Robe, 2018. Phylogeography of the critically endangered neotropical annual fish, *Austrolebias wolterstorffi* (Cyprinodontiformes: Aplocheilidae): genetic and morphometric evidence of a new species complex. *Environmental Biology of Fishes* 101: 1503–1515.
- Gavrilets, S., & J. B. Losos, 2009. Adaptive Radiation: Contrasting Theory with Data. *Science* 323: 732–737.
- Hartz, S. M., 1997. Alimentação e estrutura da comunidade de peixes da lagoa Caconde, litoral norte do Rio Grande do Sul. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, & R. Jeremy, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *The Royal Society* 270: 313–321.
- Hebert, P. D. N., E. H. Penton, J. M. Burns, D. H. Janzen, & W. Hallwachs, 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 14812–14817.
- Honorio, J. R., & I. A. Martins, 2018. Ichthyofauna of the una river in the paraíba do sul paulista river valley, southeastern of Brazil. *Biota Neotropica* 18: 1–8.
- Kardong, K.V., 1995. *Vertebrates: comparative anatomy, function, evolution*: Oxford. W.C. Brown.
- Kendall, D. G., 1977. The Diffusion of Shape. *Advances in Applied Probability* 9: 428–430.
- Kocher, T. D., 2004. Adaptive evolution and explosive speciation: The cichlid fish model. *Nature*

- Reviews Genetics 5: 288–298.
- Kullander, S.O., 2003. Cichlidae (Cichlids). In Reis, R. E., S.O. Kullander & C.J. Ferraris, Jr. Checklist of the freshwater fishes of south and central america, EDIPUCRS, Porto Alegre.
- Lee, W. J., J. Conroy, W. H. Howell, & T. D. Kocher, 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *Journal of Molecular Evolution* 41: 54–66.
- León-Romero, Y., O. Mejía, & E. Soto-Galera, 2012. DNA barcoding reveals taxonomic conflicts in the *Herichthys bartoni* species group (Pisces: Cichlidae). *Molecular Ecology Resources* 12: 1021–1026
- Lévêque, C., T. Oberdorff, D. Paugy, M. L. J. Stiassny, & P. A. Tedesco, 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 545–567.
- López-Fernández, H., J. H. Arbour, K. O. Winemiller, & R. L. Honeycutt, 2013. Testing for ancient adaptive radiations in neotropical cichlid fishes. *Evolution* 67: 1321–1337.
- López-Fernández, H., R. L. Honeycutt, M. L. J. Stiassny, & K. O. Winemiller, 2005a. Morphology, molecules, and character congruence in the phylogeny of South American geophagine cichlids (Perciformes, Labroidei). *Zoologica Scripta* 34: 627–651.
- López-Fernández, H., R. L. Honeycutt, & K. O. Winemiller, 2005b. Molecular phylogeny and evidence for an adaptive radiation of geophagine cichlids from South America (Perciformes: Labroidei). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 227–244.
- López-fernández, H., K. O. Winemiller, & R. L. Honeycutt, 2010. Multilocus phylogeny and rapid radiations in Neotropical cichlid fishes (Perciformes: Cichlidae: Cichlinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 1070–1086.
- Lydeard, C., & K. J. Roe, 1997. The Phylogenetic Utility of the Mitochondrial Cytochrome b gene for inferring relationships among actinopterygian fishes. *Molecular Systematics of Fishes* 285–303.
- Maan, M. E., & K. M. Sefc, 2013. Colour variation in cichlid fish: Developmental mechanisms, selective pressures and evolutionary consequences. *Seminars in Cell and Developmental Biology Elsevier Ltd* 24: 516–528.
- Marcus, L. F., M. Corti, A. Loy, G. J. P. Naylor, & D. E. Slice, 1996. Advances in morphometrics. NATO ASI series A. Life Sciences Plenum Press, New York.
- Malabarba, L. R., P. C. Neto, V. de A. Bertaco, T. P. Carvalho, J. F. dos Santos, & L. G. S. Artioli, 2013. Guia de identificação dos peixes da bacia do Rio Tramandaí. Via Sapiens, Porto Alegre.
- Maltchik, L., L. Esteban, K. Lanés, C. Stenert, & E. S. F. Medeiros, 2010. Species-area relationship

- and environmental predictors of fish communities in coastal freshwater wetlands of southern Brazil. *Environ Biol Fish* 25–35.
- Manel, S., P. E. Guerin, D. Mouillot, S. Blanchet, L. Velez, C. Albouy, & L. Pellissier, 2020. Global determinants of freshwater and marine fish genetic diversity. *Nature Communications Springer US* 11: 1–9.
- Manel, S., M. K. Schwartz, G. Luikart, & P. Taberlet, 2003. Landscape genetics: Combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 189–197.
- Matschiner, M., A. Böhne, F. Ronco, & W. Salzburger, 2020. The genomic timeline of cichlid fish diversification across continents. *Nature Communications* 11: 1–8.
- McMahan, C. D., P. Chakrabarty, J. S. Sparks, W. L. Smith, & M. P. Davis, 2013. Temporal patterns of diversification across global cichlid biodiversity (Acanthomorpha: Cichlidae). *Plos One* 8: 1–9.
- Mejía, O., F. Pérez-Miranda, Y. León-Romero, E. Soto-galera, & E. de Luna, 2015. Morphometric variation of the *Herichthys bartoni* (Bean, 1892) species group (Teleostei: Cichlidae): How many species comprise *H. labridens* (Pellegrin, 1903)? *Neotropical Ichthyology* 13: 61–76.
- Meyer, A., 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and molecular biology of fishes* 2: 1–38.
- Monteiro, L.R., & S.F. REIS, 1999. Princípios de morfometria geométrica. Holos, Ribeirão Preto.
- Nelson, J. S., T. C. Grande, & M. V. H. Wilson, 2016. *Fishes of the World*. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Páiz-Medina, L., & J. A. Huete-Pérez, 2012. Filogenética Molecular de Peces del Complejo Midas Cichlidae que habitan lagos y lagunas de Nicaragua , utilizando el gen COI. *Encuentro* 93: 101–116.
- Ramos-Fregonezi, A. M.C., L.R. Malabarba, & N.J.R. Fagundes, 2017. Population genetic structure of *Cnesterodon decemmaculatus* (Poeciliidae): A freshwater look at the Pampa biome in southern south america. *Frontiers in Genetics* 8: 1–10.
- Robins, R. H., M. E. Brown, & R. A. Crutchfield, 2020. Identification of acara (Cichlidae: *Cichlasoma*) established in Florida, USA. *BioInvasions Records* 9: 133–145.
- Říčan, O., & S. O. Kullander, 2006. Character- and tree-based delimitation of species in the “*Cichlasoma*” *facetum* group (Teleostei, Cichlidae) with the description of a new genus. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 44: 136–152.
- Ridley, M., 2006. *Evolução*. Artmed, Porto Alegre.
- Romiguier, J., P. Gayral, M. Ballenghien, A. Bernard, V. Cahais, A. Chenuil, Y. Chiari, R. Derrat,

- L. Duret, N. Faivre, E. Loire, J. M. Lourenco, B. Nabholz, C. Roux, G. Tsagkogeorga, A. A. T. Weber, L. A. Weinert, K. Belkhir, N. Bierne, S. Glémin, & N. Galtier, 2014. Comparative population genomics in animals uncovers the determinants of genetic diversity. *Nature* 515: 261–263.
- Ronco, F., M. Matschiner, A. Böhne, A. Boila, H. H. Büscher, A. El Taher, A. Indermaur, M. Malinsky, V. Ricci, A. Kahmen, S. Jentoft, & W. Salzburger, 2021. Drivers and dynamics of a massive adaptive radiation in cichlid fishes. *Nature* 589: 76–81.
- Ronco, F., & W. Salzburger, 2021. Tracing evolutionary decoupling of oral and pharyngeal jaws in cichlid fishes. *Evolution Letters* 5: 625–635.
- Salzburger, W., 2018. Understanding explosive diversification through cichlid fish genomics. *Nature Reviews Genetics* 19: 705–717.
- Schindler, I., F. P. Ottoni, & M. M. Cheffe, 2010. *Heros acaroides* Hensel, 1870 – a valid species of *Australoheros* (Teleostei: Perciformes: Cichlidae) from the Patos-Mirim lagoon system, south Brazil. *Vertebrate Zoology* 60: 139–146.
- Schlötterer, C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365–371.
- Schlötterer, C., 2004. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion?. *Nature Reviews Genetics* 5: 63–69.
- Schwarzbald, A., & A. Schäfer, 1984. Gênese e morfologia das Lagoas costeiras do Rio Grande do sul - Brasil. *Amazoniana* 1: 87–104.
- Slatkin, M., 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47: 264–279.
- Smith, W.L., P. Chakrabarty, & J.S. Sparks, 2008. Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). *Cladistics* 24: 625–641.
- Souza, C. R., P. R. A. de M. Affonso, J. de A. Bitencourt, I. Sampaio, & P. L. S. Carneiro, 2017. Species validation and cryptic diversity in the *Geophagus brasiliensis* Quoy & Gaimard, 1824 complex (Teleostei, Cichlidae) from Brazilian coastal basins as revealed by DNA analyses. *Hydrobiologia* 809: 309–321.
- Sparks, J. S., 2004. Molecular phylogeny and biogeography of the Malagasy and South Asian cichlids (Teleostei : Perciformes : Cichlidae). *30*: 599–614.
- Sparks, J. S., & W.L. Smith, 2004. Phylogenyandbiogeographyofcichlidfishes (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *Cladistics* 205: 501–517.
- Sparks, J. S., & W. L. Smith, 2005. Freshwater fishes, dispersal ability, and nonevidence: “Gondwana life rafts” to the rescue. *Systematic Biology* 54: 158–165.

- Steele, S. E., & H. López-Fernández, 2014. Body Size Diversity and Frequency Distributions of Neotropical Cichlid Fishes (Cichliformes: Cichlidae: Cichlinae). *Plos One* 9: 1–11.
- Stevens, V. M., C. Verkenne, S. Vandewoestijne, R. A. Wesselingh, & M. Baguette, 2006. Gene flow and functional connectivity in the natterjack toad. *Molecular Ecology* 15: 2333–2344.
- Svardal, H., W. Salzburger, & M. Malinsky, 2020. Genetic variation and hybridization in evolutionary radiations of cichlid fishes. *Annual Review of Animal Biosciences* 9: 55–79.
- Templeton, A.R., 2006. *Population Genetics and microevolutionary theory*. John Wiley & Sons. New Jersey.
- Tomazelli, L. J., & J. Villwock, 2000. O Cenozóico costeiro do Rio Grande Do Sul. *Geologia do Rio Grande do Sul* 375–406.
- Tomazelli, L. J., & J. A. Villwock, 2005. Mapeamento geológico de planícies costeiras: o exemplo da costa do Rio Grande do Sul. *Gravel* 3: 109–105.
- Tomazelli, L., & J. Villwock, 1991. Geologia do sistema lagunar holocênico do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisa em Geociências* 18: 13–24.
- Thuesen, P. A., B. J. Pusey, D. R. Peck, R. Pearson, & B. C. Congdon, 2008. Genetic differentiation over small spatial scales in the absence of physical barriers in an Australian rainforest stream fish. *Journal of Fish Biology* 72: 1174–1187.
- Turchetto-zolet, A. C., A. L. Anversa Segatto, C. Turchetto, C. Palma-Silva, & L. Brandão de Freitas, 2013. *Guia prático para estudos filogeográficos*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto.
- Wu, C. I., & C. T. Ting, 2004. Genes and speciation. *Nature Reviews Genetics* 5: 114–122.
- Zelditch, M. L., D. L. Swiderski, H. D. Sheets, & W. L. Fink, 2004. *Geometric morphometrics for biologists: A Primer*. Elsevier, London.
- Zhu, L., X. Zhan, T. Meng, S. Zhang, & F. Wei, 2010. Landscape features influence gene flow as measured by cost-distance and genetic analyses: A case study for giant pandas in the Daxiangling and Xiaoxiangling Mountains. *BMC Genetics* 11: 2–11.

CAPÍTULO 1

Filogeografia e variação morfológica em *Cichlasoma portalegreense* (Cichliformes, Cichlidae)

**Tamires Pereira Pintado · Fernando Marques Quintela · Gabriela Pasqualim · Crislaine
Barbosa · Erika Belarmino · Giselle Xavier Perazzo · Adriana Gava**

T.P. Pintado (✉) · C. Barbosa · A. Gava

Instituto de Ciências Biológicas, PPG Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais,
Universidade Federal do Rio Grande, Avenida Itália: km 8, Campus Carreiros, Rio Grande, RS,
Brasil

e-mail: tamires.pintado.rg@gmail.com

F. M. Quintela

Instituto Nacional de Pesquisa do Pantanal (INPP), Av. Fernando Corrêa da Costa, nº2367-
Campus da UFMT-Boa Esperança, Cuiabá-MT, Brasil

G. Pasqualim

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Avenida Itália: km 8,
Campus Carreiros, Rio Grande, RS, Brasil

E. Belarmino

Instituto de Oceanologia, Universidade Federal do Rio Grande, Avenida Itália: km 8, Campus
Carreiros, Rio Grande, RS, Brasil

G. X. Perazzo

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Avenida Itália: km 8,
Campus Carreiros, Rio Grande, RS, Brasil

Manuscrito a ser submetido para a revista Hydrobiologia

Resumo *Cichlasoma portalegreense* (Cichliformes: Cichlidae) é um peixe neotropical das bacias hidrográficas do Rio Tramandaí e bacias associadas à Laguna dos Patos, extremo sul do Brasil. Aqui, nós investigamos os níveis de diversidade, estrutura genética, história demográfica e diferenciação morfométrica de *C. portalegreense* da quase totalidade da sua distribuição. Para tanto, utilizamos os locos mitocondriais Cyt-b, COI e D-Loop de espécimes de nove localidades. Testamos, também, se existe diferenciação da forma capturada por 11 marcos anatômicos de espécimes de 12 localidades através de morfometria geométrica. 1) a amostra exibiu altos valores relativos de diversidade haplotípica com baixa divergência de nucleotídeos entre os haplótipos; 2) o padrão espaço temporal de diversidade é do tipo estrelado, com haplótipos únicos na maioria das populações (Cyt-B e COI, principalmente); 3) as populações são geneticamente similares, resultando em uma politomia sem exibição de monofilia recíproca; 4) apesar da similaridade genética, detectamos estruturação significativa, tanto entre populações como entre bacias hidrográficas, principalmente no marcador D-loop que exibiu diferenças fixadas entre as populações ao norte do estuário da Laguna dos Patos e a população ao sul (Hermenegildo); 5) indícios de diferenciação na forma, mas sem agrupamento claro das populações do norte e do sul, como encontrado no cenário para os marcadores neutros. Essas observações favorecem a hipótese da colonização recente desses corpos d'água, corroborando com a ideia de que estas populações, podem estar a pouco tempo se diferenciando. Embora não seja possível indicar relação direta entre a geocronologia da gênese da planície costeira do Rio Grande do Sul com as diferenças genéticas das populações analisadas, as populações mais diferenciadas são aquelas do norte e sul que ocupam os terrenos mais recentes da barreira pleistocênica III e da barreira holocênica IV.

Palavras chaves: Região Neotropical. Cichlasomatini. Filogenia molecular. Marcadores mitocondriais. Morfometria geométrica. Bacias hidrográficas.

Introdução

Pertencente à ordem Cichliformes, a família Cichlidae contém 1.731 espécies válidas (Fricke et al., 2021) que estão amplamente distribuídas em uma variedade de ambientes aquáticos, principalmente nas águas doces da África continental, Américas, Madagascar, Seychelles, Índia, Sri Lanka e em poucos locais do Oriente Médio (Kullander, 2003; Sparks, 2004; Sparks & Smith, 2004; Smith et al., 2008; McMahan et al., 2013; Svoldal et al., 2020). Os ciclídeos são uma das mais diversas famílias de vertebrados e muitos traços fenotípicos que contribuem com essa variabilidade são adaptativos. Essa miríade de formas dos ciclídeos contrasta com os baixos valores de diversidade genética estimados para a família e o alto grau de compartilhamento dessa diversidade pelas espécies (Kullander, 2003; Kocher, 2004; López-Fernández et al., 2013; Steele & López-Fernández, 2014; Salzburger, 2018; Svoldal et al., 2020).

Traço intrínseco específico da linhagem, como dicromatismo sexual, e extrínseco, como maior incidência de luz nas águas claras de lagos profundos, predizem parcialmente o padrão de diversificação dos ciclídeos africanos (Wagner et al., 2012). De fato, seleção sexual, especiação ecológica e fluxo gênico parecem orientar a radiação adaptativa desses peixes. Uma faceta das radiações adaptativas dos ciclídeos dos lagos africanos é a coexistência espacial de espécies irmãs (Gittenberger, 1991; Seehausen, 2015). Segundo Burress et al., (2018) os lagos profundos e estáveis possuem comunidades reunidas por especiação. No entanto, o padrão simpátrico de diferenciação dos ciclídeos africanos difere daquele observado, de modo geral, para os ciclídeos neotropicais (Gittenberger, 1991; Seehausen, 2015).

As radiações não adaptativas, por outro lado, resultam no rápido surgimento de espécies geograficamente isoladas ou com distribuição parapátrica (Gittenberger, 1991; Seehausen, 2015); padrão frequentemente exibido por espécies congênicas de ciclídeos neotropicais (Malabarba et al., 2015; Ottoni, 2011). As assembleias de ciclídeos de rios neotropicais, podem ser vistos como uma consequência da coocorrência de linhagens diferenciadas em alopatria (Burress et al., 2018). A dispersão resultante de alterações na conectividade de rios e na configuração das bacias hidrográficas também pode explicar a simpatria de espécies não relacionadas (Burress et al., 2018). É provável que esse processo também dirija a diferenciação em ambientes costeiros. Rios e lagoas são elementos da paisagem muito distintos. Contudo, ambos impõem limitações à migração de peixes de água-doce. O isolamento imposto a esses ambientes tem potencial de causar divergência e de alterar os níveis de diversidade genética das populações, resultando em diferenciação não

óbvia, como vista em espécies crípticas (Beheregaray et al., 2002; Montes et al., 2008; Carvajal-Vallejos et al., 2010; Ramos-Fregonezi et al., 2017; Souza et al., 2017; Barbosa et al., 2020).

Dentre os ciclídeos americanos, a subfamília Cichlinae compreende 79 gêneros e 567 espécies (Fricke et al., 2021) de distribuição restrita à região neotropical (Sparks e Smith, 2004). Os ciclíneos apresentam inúmeras variações em suas características, morfológicas (Smith et al., 2008; Steele & López-Fernández, 2014) e ecológicas (Burruss, 2015). Essas diferentes adaptações evolutivas permitem que os ciclíneos sejam muito diversificados (Steele & López-Fernández, 2014) e ocupem vários ecossistemas de águas doces, sendo encontrados em ambiente lênticos, como lagunas, lagoas, e áreas úmidas e ambientes lóticos, como rios e riachos (Kullander, 2003; Sparks & Smith, 2004; López-Fernández et al., 2010; McMahan et al., 2013). Nesse contexto, essas características tornam a subfamília Cichlinae (Sparks & Smith, 2004), assim como os ciclídeos em geral, um modelo ideal para estudos evolutivos (Kocher, 2004; Sparks & Smith, 2004; Smith et al., 2008; López-Fernández et al., 2010; Salzburger, 2018; Svardal et al., 2020).

Inserido na subfamília Cichlinae e tribo Cichlasomatini (Říčan & Kullander, 2006), o gênero *Cichlasoma* compreende atualmente 16 espécies exclusivas da América do Sul. Dentre essas espécies está o *Cichlasoma portalegrense*, popularmente conhecido como Acará (Kullander, 2003), Acará-do-lodo ou Cará (Fishbase, 2021). Essa espécie está amplamente distribuída em ambientes de água doce da Planície costeira do Rio Grande do Sul (PCRS), extremo sul do Brasil (Kullander, 2003; Malabarba et al., 2013). A PCRS é uma região geomorfológica formada por um sistema deposicional de Leques Aluviais e quatro sistemas deposicionais do tipo “Laguna-Barreira”. Os sistemas “Laguna-Barreira I-IV” se originaram de quatro eventos de transgressão/regressão marinha, surgido por volta de 400 mil, 325 mil, 125 mil e 5 mil anos, respectivamente (Tomazelli & Villwock, 1991, 2000, 2005). Nessa região são encontrados vários ambientes límnicos, como, lagunas, lagoas, inúmeros banhados, áreas úmidas intermitentes e permanentes (Tomazelli & Villwock, 1991, 2000, 2005; Burger & Ramos, 2006; Maltchik et al., 2010; Malabarba et al., 2013) sendo estes habitats favoráveis para a ocorrência da espécie.

Espécies que vivem em regiões costeiras são excelentes modelos para avaliar o potencial efeito das oscilações climáticas sobre os processos de diferenciação biológica (ver, Hewitt, 1996; Beheregaray et al., 2002; Montes et al., 2008). Adicionalmente é possível avaliar se, a despeito da gênese recente em termos geomorfológicos e por exibir heterogeneidade ambiental, a PCRS tem potencial de diferenciar populações ou mesmo gerar diversidade críptica (Beheregaray et al., 2002; Montes et al., 2008; Garcez et al., 2018; Barbosa et al., 2020). Por exemplo, o estudo de Beheregaray et al. (2002) com o complexo de peixes de água doce, *Odontesthes perugiae* apoiou

uma radiação “moldada cronologicamente pelas mudanças do nível do mar no Pleistoceno e Holoceno”. Já Montes et al. (2008) em seu estudo com *Deltamys kempi*, demonstram claramente que na Planície Costeira a espécie se dividiu em dois grupos, um ocupando uma pequena porção ao norte desta região e o outro se distribuindo amplamente ao sul. Nesse processo, os fenômenos de formação geológica na dinâmica laguna-barreira alteraram o ambiente natural, juntamente com a ocorrência de sucessivos rearranjos cromossômicos, foram certamente os fatores fundamentais na configuração da diversificação de *D. kempi*.

Portanto, não há informações sobre o quanto a dinâmica e a formação da PCRS podem ter influenciado na evolução do *C. portalegrense*. Até o momento investigações moleculares da espécie se limitaram a poucos espécimes, em um estudo sobre as relações filogenéticas dentro de Cichlasomatini (Musilová et al., 2008). Com isso, este estudo abordou a primeira caracterização genética e morfométrica de *C. portalegrense* ao longo da quase totalidade de sua distribuição conhecida, na região costeira das bacias hidrográficas associadas à Laguna dos Patos e na bacia hidrográfica do rio Tramandaí. Para isso, nós usamos marcadores mitocondriais para (1) investigar os níveis de diversidade genética dentro/entre as populações dos diferentes locais e bacias hidrográficas amostradas; (2) avaliar a estruturação populacional dentro/entre as populações dos diferentes locais e bacias; (3) analisar se a diversificação espacial desta espécie está relacionada com um possível histórico de colonização da PCRS; e utilizamos métodos morfométricos geométricos para (4) testar as diferenças de forma entre as populações dos diferentes locais. Assim, hipotetizamos que a distribuição espacial da diversidade genética do *C. portalegrense*, associada à possível diferenciação morfológica, foi moldada pelos processos históricos geoclimáticos formadores dos sistemas deposicionais da PCRS.

Material e métodos

Área de estudo

Nós investigamos a diversidade mitocondrial e morfológica de *C. portalegrense* da bacia hidrográfica do rio Tramandaí e das bacias associadas à Laguna dos Patos (Fig. 1; Tabela 1S). As amostragens aconteceram exclusivamente na PCRS, com exceção de um ponto de coleta localizado em uma área de transição entre essa unidade geomorfológica e a Depressão Central. A PCRS é delimitada ao norte pelas escarpas da Serra Geral, ao noroeste pela Depressão Central, ao oeste e sul pelo escudo Sul-Riograndense e à leste pelo oceano Atlântico.

A bacia hidrográfica do Rio Tramandaí (Fig. 1) abriga cerca de um quarto da diversidade de peixes do RS nas suas três sub-regiões (Malabarba & Isaia, 1992; Bertaco et al., 2016). Na sub-região da planície costeira, ao norte da PCRS, essa bacia hidrográfica apresenta um cordão de lagoas interligadas, onde podemos encontrar a foz do Rio Maquiné na lagoa dos Quadros (119 km²) e a foz do rio Três Forquilhas na lagoa Itapeva (95 km²). A lagoa Tramandaí (12 km²), lagoas menores isoladas, o Rio Tramandaí, áreas de banhado e de inundação temporária também fazem parte da bacia hidrográfica do Rio Tramandaí (Schwarzbold & Schäfer, 1984; Malabarba & Isaia, 1992; Malabarba et al., 2013; Bertaco et al., 2016). Nessa região obtivemos a amostragem mais setentrional da espécie que foi coletada em um banhado atrás das dunas costeiras no Balneário Yara, Município de Torres, a dois quilômetros da Lagoa Itapeva; de um canal rico em vegetação entre as Lagoas da Pinguela e Lagoa do Peixoto no município de Osório; e de um sangradouro, um córrego de água-doce que atravessa a faixa de dunas em direção à praia, no Balneário Jardim do Éden no município de Tramandaí.

Diferente da bacia hidrográfica do Rio Tramandaí que possui apenas 2.980 km², o sistema da Laguna dos Patos compreende uma vasta área da PCRS. Possui três grandes lagoas, a Laguna dos Patos (9.280 Km²), Lagoa Mirim (3.520 km²) e Lagoa Mangueira (com 802 km²), assim como, lagoas menores, rios, arroios, banhados e áreas úmidas. Seus principais afluentes são o Rio Jacuí, o Rio Taquari-Antas, o Rio Camaquã e o Rio Jaguarão. Esses corpos d'água principais caracterizam áreas de drenagem que subdividem o sistema da Laguna dos Patos nas bacias hidrográficas do Rio Camaquã, do Baixo Jacuí e do Rio Piratini, São Gonçalo e Mangueira. Ao Sul (32°S) um ecossistema estuarino de 1.000 km² é a única conexão de todo o sistema Laguna dos Patos com o Oceano Atlântico (Schwarzbold & Schäfer, 1984; Malabarba, 1989; Seeliger e Odebrecht, 2010; Bertaco et al., 2016).

No sistema da Laguna dos Patos, coletamos em 9 locais distribuídos por três bacias hidrográficas e seis municípios. No município de Eldorado do sul, coletamos em dois pequenos açudes na Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA/UFRGS). Na EEA/UFRGS há inúmeros açudes, banhados, áreas úmidas e arroios cujas águas são drenadas para o Rio Jacuí a cerca de 25 Km da EEA/UFRGS. A dois quilômetros do rio Camaquã, no município de Cristal, amostramos em um açude. Esse rio contém um delta lagunar cercado de áreas úmidas, vegetação de restinga e mata riparia que abriga muitas espécies (Marinho, 2015). No município de São Lourenço do Sul, coletamos no Arroio Viúva Tereza, localizado no km 471 da BR-116/RS (Ceolin, 2015).

Nas proximidades do estuário da Laguna dos Patos, amostramos ambientes lênticos no Arraial e Ilha dos Marinheiros, e lótico, no Arroio Bolaxa. Os ambientes lênticos apresentam diferentes graus de conexão com a Laguna dos Patos. A localidade Arraial fica a dois quilômetros da Laguna dos Patos e a Lagoa del Rey, poças e canais da Ilha dos Marinheiros têm o regime hidrológico afetado pela quantidade de chuvas ao longo das estações do ano, o que promove tanto isolamento como conexões temporárias com os ambientes alagados próximos e consequentemente com as águas estuarinas (Quintela et al., 2009, 2018). O Arroio Bolaxa, localizado a aproximadamente três quilômetros da APA da Lagoa Verde, também conhecida como APA da Lagoa do Bolaxa. Essa lagoa contém uma área com cerca de dois quilômetros e está conectada ao Arroio Bolaxa e diretamente ao Saco da Mangueira (anexo ao canal de desembocadura da Lagoa dos Patos), assim podendo ser influenciada por águas estuarinas (SEMA, 2022).

Coletamos na Lagoa Caiúba, que compreende cerca de 13 km comprimento e dois de largura, localizada dentro do Sistema Hidrológico do Taim, região formada por inúmeras áreas alagáveis, banhado e lagoas. De acordo com Mäder et al. (2017), esses ambientes, cobertos por uma vegetação do tipo gramínea e herbácea, servem de abrigo para inúmeras espécies locais e como refúgio para espécies de aves migratórias. No município Arroio Grande, coletamos na entrada da prainha, a aproximadamente dois quilômetros da margem oeste da segunda maior lagoa do estado e a terceira maior da América do Sul, Mirim (com cerca 180 km de extensão e profundidade média de 6 m) (Beltrame & Tucci, 1998; Santos et al., 2004). No município de Santa Vitória do Palmar, amostramos em um arroio em direção à praia de Hermenegildo. Ao norte desse ponto está a Lagoa Mangueira, cerca de 20km de distância, ao oeste o Banhado do Salies ou Banhados do Saco do Jacaré (encostado na margem leste da Lagoa Mirim). Segundo Mäder et al. (2017), esse banhado contém uma área de aproximadamente 27 km² que se encontra conectado a outros banhados adjacentes, formando uma região rica em alimentos e abrigos para as diversas espécies locais e migratórias.

Amostragem e identificação dos espécimes

No estudo foram analisados 142 espécimes de *C. portalegrense* coletados em 12 localidades (Fig. 1; Tabela 1S) com o auxílio de rede de arrasto de praia (10 x 2,5 m, malha de 5 mm), puçá (60 cm de comprimento, 40 de largura, malha 5mm) e covo (70 cm de comprimento, 30 de diâmetro) e identificados através de suas características morfológicas (Kullander, 2003; Malabarba et al., 2013). Após a coleta, os indivíduos foram levados para o laboratório de Genética da

Universidade Federal do Rio Grande (FURG), onde foram eutanasiados em solução de eugenol na concentração de 300 mg/L. Após as amostras do tecido muscular foram extraídas, preservadas em etanol (95%) e mantidas sob a temperatura de -20° C. Cada espécime foi fotografado (câmera, Nikon® D90), identificado, fixado por 72 horas em formol 10% e, posteriormente, conservado em etanol 70%. Todos os indivíduos capturados foram depositados na coleção de peixes do Laboratório de Genética da Universidade Federal de Rio Grande (FURG). As amostragens foram realizadas sob a licença (Número: 76068-1) fornecida pelo Instituto Chico Mendes (ICMBio / SISBIO) e a eutanásia e análises laboratoriais foram aprovadas pelo comitê de ética da FURG, sob o número do registro (23116.001839/2020-15, Pq006/2020) (veja anexo).

Manipulação do DNA e análises

Para as análises moleculares, usamos 101 espécimes amostrados em nove localidades (Fig. 1; Tabela de apoio 1S). O DNA de cada espécime foi extraído a partir de aproximadamente 20 mg de tecido muscular usando dois protocolos, a base de cloreto de sódio (Medrano et al., 1990) e a base de acetato de potássio (modificado de Pasqualim et al., 2015). Amplificamos o marcador mitocondrial Citocromo b (Cyt-b), usando os primers FishCytBF_Mod (ACCACCGTTGTTATTCAACTACAAAAC) e PortaCytB 2_R (GACTTTAACCTTCGGCGTCC); o marcador citocromo c oxidase subunidade I (COI) foi amplificado utilizando-se os primers Fish F1 Mod (TCAACYAAYCACAAAGACATYGGCAC) e Fish R1 Mod (TATACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA); e para o marcador D-Loop, utilizou-se os primers LloopMod (AKCRYCGGTCTTGTAACCG) e HloopMod (CCTGAARTAGGAACCAGATG). Os primers forward e reverse para os marcadores Cyt-b, COI e D-Loop foram desenhados a partir da sequência do DNA mitocondrial de *C. dimerus* (GenBank: KR150876.1). Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) do Cyt-b foram utilizados 100 ng de DNA em reações de 20 µL, contendo 1 × tampão, 2,5 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTP, 0,15 µM de primer forward, 0,15 µM de primers reverse e 0,2 µL Taq DNA polimerase (5 U/µL). No entanto, para o marcador COI foram usados 100 ng de DNA em reações de 20 µL, contendo 1 × tampão, 3,75 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTP, 0,15 µM de primer forward, 0,15 µM de primers reverse e 0,2 µL Taq DNA polimerase (5 U/µL) e para a PCR do D-Loop foram utilizadas as mesmas condições do marcador COI.

Amplificamos fragmentos dos marcadores Cyt-b, COI e D-Loop por PCR com as seguintes condições: para o Cyt-b usamos um estágio inicial desnaturação 95°C por 5 s, seguido de 35 ciclos

de desnaturação a 95°C por 40 s, anelamento a 50°C por 40 s, extensão a 72°C por 60 s e um estágio final de extensão em 72°C por 10 min. Para o COI e D-Loop utilizamos as seguintes condições: um estágio inicial de desnaturação a 95°C por 5 s, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 40 s, anelamento a 55°C por 40 s, extensão a 72°C por 90 s e um estágio final de extensão em 72°C por 10 min. Para verificar se a amplificação foi bem sucedida, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%), corados com brometo de etídio. Após, os fragmentos amplificados foram purificados com uma solução de PEG 8000 20% e sequenciados. O sequenciamento foi realizado em um sequenciador automático Perkin-Elmer ABI Prism 377 pela MACROGEN (Seul, Coreia).

Todos os eletroferogramas foram inspecionados e montados com o uso do programa MEGA 10.0 (Kumar et al., 2018). A identidade das sequências adquiridas foi confirmada pelo uso do BLASTN, junto ao NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os alinhamentos das sequências foram realizados com o uso do algoritmo de alinhamento múltiplo de sequências (ClustalW) por meio do software MEGA 10.0. Após alinhar todas as sequências, analisamos os sítios polimórficos e corrigimos manualmente quando preciso. O programa DnaSP 6.0 (Rozas et al., 2017) foi utilizado para calcular os índices de diversidade genética dentro das populações de forma individual e em conjunto para os marcadores Cyt-b, COI e D-Loop como diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (Hd), do número de diferenças nucleotídicas entre os haplótipos (k), e número médio de haplótipos distintos (H). Ainda no mesmo software foi realizado os testes de neutralidade de Tajima (1989a) e Fu (1997). Para avaliar a presença de diversidade críptica, foi utilizado o método de DNA-Barcode ou código de barras. As distâncias par-a-par foram calculadas para as sequências dos marcadores (Cyt-b, COI e D-Loop) usando o modelo de substituição Kimura-2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980), no software MEGA 10.0. As relações evolutivas entre os haplótipos foram inferidas para o Cyt-b, COI e D-Loop de forma individual e em conjunto (rede concatenada) a partir das redes de haplótipos geradas por Median-joining no programa Network 10.2 (Bandelt et al., 1999). Medidas de diferenciação genética (índice de fixação - FST) entre populações foram obtidas para o Cyt-b, COI e D-Loop de forma individual e em conjunto através do software Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) para analisar a estruturação populacional. No mesmo software se executou o teste de Mantel para avaliar a correlação entre as distâncias genéticas (FST) e geográficas. O desenho da AMOVA avaliou duas configurações, usando-se 1000 permutações, através do software Arlequin: nove populações independentes e uma configuração onde quatro bacias hidrográficas agrupam as nove localidades. As árvores filogenéticas de cada marcador e matriz concatenada foram obtidas através das análises Bayesianas

(AB) empregadas no MrBayes 3.2.7 (Ronquist et al., 2012) utilizando o melhor modelo de substituição de nucleotídeos, conforme selecionado pelo critério de informação de Akaike (AIC) (Akaike, 1974), implementado no jModeltest 2.1.10 (Posada, 2008). Os modelos selecionados para Cyt-b, COI, D-Loop e matriz concatenada foram HKY+I, GTR+G, HKY e GTR+I, respectivamente. O método “Markov Chain Monte Carlo” (MCMC) na AB foi executado com 10.000.000 de gerações, amostrando árvores a cada 1.000 e descartando 25% dos resultados. As árvores obtidas para os três marcadores individualmente e para o conjunto de dados concatenados foram visualizadas e editadas em FigTree 1.4.3 (Rambaut & Drummond, 2009).

Análise de morfometria

Para as análises morfométricas foram utilizados 112 espécimes, 74 fêmeas e 40 machos procedentes de 12 populações (Fig. 1S; Tabela 1S). O tamanho padrão das fêmeas variou de 3,83cm a 13,54cm (tamanho= $7,99\pm 2,34$ cm), enquanto o tamanho padrão dos machos variou de 4,13cm a 15,45cm (tamanho= $8,48\pm 3,25$ cm) (Fig. 2S). Devido à aparente ausência de dimorfismo sexual e ausência de gibosidade cefálica (caracter sexual secundário ocorrente em machos de Cichlidae) as análises foram realizadas se desconsiderando o sexo. O programa TPSUtil 1.64 (Rohlf, 2013) foi utilizado para criar arquivos.tps a partir das imagens dos espécimes. Esse arquivo foi inserido no software TPSDig2 versão 2.31 (Rohlf, 2015) e foram feitas as marcações dos 11 marcos anatômicos assim selecionados (pontos azuis) (Fig. 2). No programa RStudio (R Core Team, 2021) executamos as análises morfométricas geométricas, usando os pacotes Geomorph (Adams & Otárola-Castillo, 2013; Adams et al., 2017), Morpho, “vegan”, “car”, “RRPP” e MASS (Venables & Ripley, 2002) e para visualização gráfica foi utilizado o “ggplot2”.

Primeiro realizamos uma Análise Generalizada de Procrustes (AGP) (Rohlf & Sclice, 1990) para obter as coordenadas da forma e minimizar as diferenças na translocação, escala e rotação entre os marcos anatômicos (Zelditch et al., 2012). Após, obtivemos os valores do tamanho do centroide da AGP e realizamos o teste de Shapiro-Wilk para analisar a distribuição de normalidade dos valores do tamanho do centroide.

Para remover efeitos alométricos causados pela diferença ontogenética dos espécimes foi utilizado uma regressão das coordenadas de Procrustes (variável forma, obtida na AGP) e tamanho do centroide (variável tamanho). Uma análise multivariada foi realizada com a matriz de covariância calculada a partir dos resultados dos resíduos da regressão (Stange et al., 2016). Para identificar agrupamentos e a variação máxima da forma entre os espécimes realizamos a Análise

de Componentes Principais (ACP), seguida de uma Análise Multivariada de Variância (MANOVA).

Resultados

Análises moleculares

Diversidade e estrutura genética

A diversidade genética para cada um dos três marcadores e nove localidades diferentes podem ser encontradas na Tabela 1. Considerando os três marcadores, 12 sítios variáveis de 881 pb da sequência de Cyt-b produziram 11 haplótipos únicos presentes em 101 espécimes (Fig. 3); os 599 pb de COI mostraram 9 sítios variáveis em 10 haplótipos de 101 espécimes (Fig. 4); e dois sítios variáveis de 429 pb do D-Loop resultaram em 3 haplótipos distribuídos por 100 espécimes (Fig. 5). A diversidade de haplótipos foi heterogênea entre os marcadores, com valores de $0,792 \pm 0,029$ (Cyt-b), $0,272 \pm 0,058$ (COI) e $0,504 \pm 0,019$ (D-Loop), resultando em uma diversidade global de $0,891 \pm 0,014$ (Tabela 1). Nenhuma localidade apresentou desvios significativos da neutralidade para qualquer dos marcadores (Tabela 1), com exceção a população de Hmg, (em relação ao teste F_s de $F_u = -3.14$ $p < 0.01$), com os dados de sequências concatenados. Como 100 indivíduos apresentaram sequências para os três marcadores mitocondriais, arranjamos 300 sequências em uma matriz mitocondrial concatenada composta por 1.909 pb, com 23 sítios variáveis distribuídos entre 21 haplótipos (Fig. 6).

Bya, AVT e Hmg não mostraram variação intrapopulacional em Cyt-b, enquanto o restante das populações apresentou de dois (LdP, e MGB) a quatro (IdM) haplótipos. LdP, IdM e EdS exibiram os maiores valores de H_d , π e K , sendo que, na primeira, amostramos apenas dois indivíduos com haplótipos diferentes (Tabela 1). A distância média para-a-par variou de 0,057% (comparações entre os espécimes da LdP e Bya, AVT e Hmg) a 0,219% (comparação entre ArB e BJE) (Tabela 2, abaixo da diagonal). Encontramos divergência genética em 15 de 36 comparações par-a-par com valores significativos de F_{ST} variando de 0,21 a 0,66. ArB e Hmg foram as populações com mais comparações com valores significativos de divergência (Tabela 2, acima da diagonal). De fato, para esse marcador, 49,06 % da variação genética está distribuída entre as populações e 50,94 % dentro delas (Tabela 9) não existindo correlação significativa entre divergência genética e distância geográfica entre populações. A rede haplotípica gerada resultou

em um haplótipo H1 compartilhado entre as populações (exceto BJE) e fixado em três delas: Hmg, Bya e AVT. Haplótipos exclusivos estão presentes em EdS (H2 e H3), BJE (H5, H6, H7), MGB (H8) e IdM (H10). Além de dois haplótipos compartilhados somente por IdM e ArB (H9 e H11) (Fig. 3).

O marcador COI apresentou de dois a seis haplótipos nos locais BJE, IdM, ArB e Hmg, sendo invariável dentro do restante das populações. Hmg apresentou os maiores valores de diversidade (H_d 0,447, π 0,00127 e K 0,75789) (ver Tabela 1). A distância média exibida pelo COI variou de 0,016% (comparações entre os espécimes de BJE e EdS, Bya, LdP, MGB e AVT) a 0,118% (comparação entre Hmg e ArB) (Tabela 3, abaixo da diagonal). Os poucos índices F_{ST} par-a-par significativos têm valores de 0,12 (na comparação entre IdM e Hmg) a 0,21 (na comparação entre EdS e IdM), sendo que a variação apresentada por esse marcador se encontra majoritariamente dentro das populações (Tabela 9). A rede de haplótipos revelou a predominância de um haplótipo H1 presente em todas as localidades e fixado em cinco delas (EdS, Bya, LdP, MGB e AVT). IdM e ArB compartilham um haplótipo de menor frequência (H4). Os oito haplótipos restantes são exclusivos de uma localidade (IdM, ArB, BJE e Hmg (Fig. 4)).

O D-Loop se mostrou invariável dentro de seis das nove populações estudadas. Nas populações variáveis o H_d foi de 0,233 no ArB, 0,529 na IdM e 1,0 no AVT. A distância média do D-Loop variou de 0,029% (nas comparações entre os espécimes de Hmg e ArB) a 0,351% (na comparação entre Hmg e AVT) (Tabela 4, abaixo da diagonal). Dezesesseis comparações de populações par-a-par mostraram divergência significativa variando de 0,26 (na comparação entre Ilhas dos Marinheiros e ArB) a 1,0 (na comparação entre Hmg e EdS, Bya, LdP, BJE, MGB) (Tabela 4, acima da diagonal). A divergência genética se mostrou significativamente correlacionada com a distância geográfica entre pares de populações ($r = 0.42$; $p < 0.02$). O F_{ST} específico de populações ($F_{ST} = 0,75$), sem a subdivisão em bacias hidrográficas, também se mostrou significativo, evidenciando divergência marcante entre as populações (Tabela 9). A rede de haplótipos apresentou um haplótipo (H1) compartilhado por todas as localidades, exceto Hmg. No sul da PCRS, Hmg possui um haplótipo único, H3, fixado e compartilhado com IdM e ArB. O haplótipo H2 é exclusivo do AVT (Fig. 5).

Nas análises Bayesianas *C. portalegrense* foi recuperado como uma linhagem monofilética, com suportes (probabilidade posterior [PP]) de 0,60 (Cyt-b), 0,99 (COI) e 1,00 (D-Loop). As árvores geradas para cada marcador apresentaram marcante politomia, resultante da baixa variabilidade haplotípica (Fig. 7, 8 e 9). Na árvore de Cyt-b, dentro da politomia, destacam-se sete agrupamentos de sequências. Cinco desses agrupamentos são restritos a localidades únicas,

enquanto outros dois são compartilhados por IdM e ArB (região sul da PCRS) (Fig. 7.). A filogenia recuperada para o marcador COI é representada por uma grande politomia (Fig. 8).

Para o marcador D-Loop, a filogenia recuperada foi dividida em dois agrupamentos que apresentam altos valores de probabilidades (Fig. 9). O primeiro s é representado por espécimes de EdS, Bya, LdP, BJE, MGB, AVT, IdM e ArB, regiões localizadas nas porções norte, sul e oeste da PCRS, e Depressão Central adjacente. O segundo abrange apenas a região sul da PCRS (IdM, ArB e Hmg) (Fig. 9).

Dados Concatenados

A filogenia obtida pela Análise Bayesiana (Fig. 10) revelou um clado com alto suporte (PP=1.00), um clado (PP=0.90) que compreende uma politomia contendo sequências de espécimes de ArB e IdM e um clado (PP=0.61) composto por uma politomia contendo sequências de espécimes de todas as localidades amostradas (nessa politomia são observados agrupamentos de sequências (PP variando de 0.81 a 0.99)). A rede haplotípica revelou dois haplogrupos. Um haplogrupo é formado pelo haplótipo (H1) compartilhado por EdS, Bya, LdP, MGB e AVT, um haplótipo (H12) compartilhado entre ArB e IdM, e 11 haplótipos de ocorrência restrita a uma localidade, distribuídos em IdM, BJE, EdS, LdP, AVT e MGB. Um segundo haplogrupo apresentou distribuição restrita às localidades da porção sul da PCRS (IdM, ArB e Hmg). Neste haplogrupo, um haplótipo (H15) foi compartilhado entre essas três localidades, outro (H14) foi compartilhado por IdM e ArB, cinco haplótipos ocorreram exclusivamente em Hmg e um haplótipo ocorreu exclusivamente no ArB (Fig. 6). A AMOVA dos dados concatenados mostrou estruturação significativa no nível de localidades ($F_{ST} = 0,41695$ e F_{ST} específico de população igual a 0,398), não correlacionada com as distâncias geográficas. A divergência no nível de bacias hidrográficas, contudo, foi não significativa ($F_{CT} = 0,123$) (Tabela 9 e 10).

Estimativas de diversidade nas bacias hidrográficas

Para o Cyt-b, a riqueza por bacia hidrográfica variou de dois (Camaquã) a cinco haplótipos (Tramandaí) sendo que as estimativas de diversidade e os testes de neutralidade podem ser visualizados na Tabela 5. A distância média entre as bacias variou de 0,118% a 0,192% (Tabela 6, abaixo da diagonal). Os valores de F_{ST} variaram entre 0,13 a 0,40 e foram significativos para todas as comparações par-a-par entre as bacias hidrográficas, revelando estruturação genética entre

estas (Tabela 6, acima da diagonal). No entanto, a AMOVA revelou que não existe divergência entre bacias hidrográficas (FCT não significativo; Tabela 10)

COI se mostrou invariável no único local amostrado na bacia hidrográfica do Baixo Jacuí e na bacia do Camaquã. Mesmo nas bacias do Tramandaí e Piratini-São Gonçalo-Mangueira, onde há de três a cinco haplótipos, os índices de diversidade são baixos com valores de diversidade haplotípica (H_d) menores do que 0,5 (Tabela 5). A distância média entre as bacias hidrográficas variou de 0 a 0,068% (Tabela 7, abaixo da diagonal). Com relação aos valores de F_{ST} , não encontramos casos de estrutura genética significativa para nenhuma comparação entre as bacias hidrográficas (Tabela 7, acima da diagonal). A AMOVA corroborou com os resultados de F_{ST} , pois revelou que não há divergência entre bacias hidrográficas.

D-Loop mostrou-se invariável nas bacias do norte (Tramandaí e Baixo Jacuí). Em Camaquã e Piratini-São Gonçalo-Mangueira apresentou apenas dois haplótipos e valores de H_d de 0,33 (Tabela 5). A distância média entre as bacias hidrográficas variou de 0 a 0,224% (Tabela 8, abaixo da diagonal). Os valores de F_{ST} variaram entre 0,65 a 0,73 e foram significativos nas comparações par-a-par entre a bacia hidrográfica do Rio Piratini-São Gonçalo-Mangueira e as bacias hidrográficas do Baixo Jacuí, Rio Tramandaí e Rio Camaquã (Tabela 8, acima da diagonal). A AMOVA sugere estruturação genética significativa, tanto devida à subdivisão em bacias hidrográficas ($F_{CT} = 0,615$) como por causa do efeito conjunto da subdivisão em bacias hidrográficas e subdivisão em populações dentro de bacias hidrográficas ($F_{ST} = 0,789$) (Tabela 10).

Análises morfométricas

Os resultados da MANOVA indicaram diferença significativa na forma do corpo entre as populações amostradas ($F = 4,9074$; Wilks = 0,2758; $P = <0.001$). A PC1 (que explicou 25,89% da variação total), PC2 (que explicou 17,89% da variação total) e PC3 (que explicou 11,73% da variação total) foram os principais componentes informativos, e responderam por 55,18% da variação total. Esses eixos da PCA estão relacionados principalmente à posição dos olhos, tamanho da cabeça, comprimento do corpo e comprimento do pedúnculo caudal. Os resultados da PCA (Fig. 11) mostram que dentre as populações estudadas, poucas foram agrupadas ao longo dos eixos de PC1, PC2 e PC3. IdM está distribuído no eixo negativo da PC1; MBG está no negativo da PC2 e PC3; BJE está distribuído quase totalmente no negativo PC2; BYA está no positivo PC1.

Os espécimes distribuídos no eixo negativo do PC1 tendem a apresentar pedúnculo caudal mais longo, corpo mais alongado quando comparado com os espécimes do eixo positivo. Para o PC2 os espécimes que se encontram ao longo do eixo negativo a apresentam o pedúnculo caudal mais longo e corpo mais alongado quando comparado com os espécimes do eixo positivo. Para o PC3, o espécime distribuído no eixo negativo contém o pedúnculo caudal mais curto e corpo menos alongado quando comparado com os espécimes do eixo positivo (Fig.11).

Discussão

As populações de *C. portalegrense* avaliadas apresentaram um nível relativamente alto de diversidade de haplótipos ($> 0,5$) (com exceção do marcador COI, em que os valores foram menores) e um nível relativamente baixo de diversidade de nucleotídeos ($< 0,5\%$) ou, ainda, uma grande diferença entre esses dois parâmetros, indicando somente pequenas diferenças entre os haplótipos. Isso fica evidente no padrão espaço temporal de distribuição da variabilidade que mostra, principalmente, diferenças de um único ou dois nucleotídeos entre os haplótipos. Cyt-B e COI exibiram uma rede de haplótipos com um padrão estrelado, com haplótipo comum e compartilhado por todas as populações. A única exceção é a população BJE que apresenta dois haplótipos do loco Cyt-B exclusivos e derivados do haplótipo comum. A combinação de alta diversidade de haplótipos com baixa diversidade de nucleotídeos tem sido conectada a crescimento populacional posterior a uma fase de baixo tamanho efetivo da população (Grant & Bowen 1998). A expansão populacional que segue de sua redução favorece o surgimento de mutações novas presentes em baixa frequência (Fu, 1997; Avise, 2000; Tajima, 1989a, 1989b).

Devido à formação recente da planície costeira, assim como de seus corpos d'água (Tomazelli & Villwock, 1991, 2000, 2005), se esperaria detectar sinais de expansão das populações de *C. portalegrense*, visto que, esse padrão é também encontrado para outras espécies de peixes que colonizaram a PCRS. Os peixes anuais ameaçados de extinção *Austrolebias wolterstorffi* e *A. nigrofasciatus*, por exemplo, apresentaram assinaturas de expansão populacional recente em algumas populações de corpos d'água do sul da PCRS (ambas as espécies) e da região costeira do Uruguai (apenas *A. wolterstorffi*) (Garcez et al. 2018; Barbosa et al., 2020). No entanto, as populações aqui estudadas aparentemente não se desviam da neutralidade, ou seja, elas apresentam quantidades de variação compatíveis com tamanhos populacionais históricos estáveis e embora algumas mostrem valores negativos nos testes D de Tajima e F_s de Fu, esses valores não

foram significativos. A única exceção é a localidade Hermenegildo, ao sul, cujo teste F_s de F_u com os dados de sequências concatenados, sugere expansão populacional.

Mesmo se considerando que a amostragem populacional abrange aproximadamente 600 km ao longo da distribuição da espécie, as populações são geneticamente próximas, também um reflexo da baixa diversidade dos locos estudados. A taxa de um indivíduo migrante até 10 por geração é suficiente para minimizar a perda de variabilidade dentro das populações locais, permitindo a divergência entre populações (Mills & Allendorf, 1996). Contudo, a distribuição aparentemente alopátrica das populações, uma capacidade provavelmente limitada de dispersão de *C. portalegrense*, hábitos provavelmente sedentários como exibido pelos demais carás (Koch et al., 2000), preferência por ambientes como lagos e banhados com vegetação densa e de fundo lodoso (Kullander, 2003; Malabarba et al., 2013), assim como, a ausência de clados reciprocamente monofiléticos, favorecem a hipótese de uma colonização recente desses corpos d'água, corroborando com a ideia de que estas populações, mesmo que aparentemente isoladas, estão a pouco tempo se diferenciando. Nossos dados indicam, portanto, que *C. portalegrense* da PCRS é uma entidade taxonômica única, sem evidência de especiação críptica. A similaridade genética dessas populações, portanto, pode não ser o resultado exclusivo de marcante fluxo gênico, mas sim de colonização a partir de uma ou poucas populações ancestrais semelhantes.

O marcador D-loop é visto como um marcador de evolução rápida, adequado para o estudo de populações com divergência recente (Brown et al., 1979; Lee et al., 1995; Renno et al., 2006; Brown, 2008; Carvajal-Vallejos et al., 2010; Diamante et al., 2017). Neste estudo a rede de haplótipos para esse marcador diferencia as populações ao norte do estuário da Laguna dos Patos da população mais meridional, Hmg. A divergência dessas populações é evidenciada principalmente por causa de diferenças fixadas entre Hmg e as populações ao norte. Enquanto as populações próximas ao estuário apresentam tanto o haplótipo das populações ao norte quanto do sul. Ainda, a rede indica que apenas a população de Hermenegildo não compartilha haplótipos com as outras populações a não ser com aquelas da região sul. Isso sugere um padrão de isolamento para a população de Hermenegildo, o que foi confirmado pelo teste de Mantel. Por outro lado, para o Cyt-b foi a população do Balneário Jardim do Éden que não compartilhou haplótipos com as demais.

A rede de haplótipos das sequências concatenadas evidência mais claramente essa divisão, separando os haplótipos em dois haplogrupos. Nesses dois haplogrupos é evidente a divergência de duas populações principalmente: ao norte BJE e ao sul Hmg. Apesar das distâncias genéticas baixas indicarem a existência de um único táxon, as populações do sul, Hmg, IdM e ArB e a

população do norte da PCRS, BJE são as mais divergentes em relação ao restante das populações. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos por Beheregaray et al. (2002) que apontam relação entre a diferenciação genética e a compartimentação geográfica. Nesse estudo, Beheregaray e colaboradores utilizaram a região controle (D-Loop) para avaliar a estrutura genética e as relações evolutivas dos morfotipos de ambientes lênticos e lóticos do complexo de espécies de água doce *Odontesthes perugiae* no sistema de drenagem no Sul e no Norte da PCRS. Desse modo, foi constatado pelos autores que o grupo *perugiae* é monofilético, representado por um mínimo de três espécies alopátricas (*O. sp. A*, *O. sp. B* e *O. sp. C*) e duas simpátricas (*O. mirinensis* e *O. perugiae*) com acentuada estrutura populacional. As espécies alopátricas são endêmicas pra drenagem ao Norte do PCRS do sistema Tramandaí (Beheregaray et al., 2002). Por outro lado, as espécies simpátricas apresentam uma distribuição ao longo da drenagem Sul do sistema da Laguna dos Patos. No mesmo trabalho, os autores também encontraram divergência substancial entre as populações representadas por diferentes morfotipos, com homogeneidade genética para as amostras com o mesmo morfotipo, mostrando relacionamento entre a genética populacional e a geografia local.

Árvores filogenéticas (com marcante politomia) condizentes com a redes de haplótipos foram obtidas para os três marcadores. O presença de um único haplótipo entre a maioria das localidades sugere o compartilhamento de polimorfismos ancestrais (Tajima, 1983). Esse padrão também pode ser visto nas árvores filogenéticas adquiridas para os marcadores aqui analisados. Assim, podemos sugerir que a espécie colonizou recentemente a região, o que não é incomum em peixes (ver, Beheregaray et al. (2002)), como o caso extremo das espécies de *Odontesthes* da bacia do rio Tramandaí que divergiram há aproximadamente 5.000 anos). Com isso, sugerimos que a dinâmica e evolução da PCRS está relacionada em parte ao surgimento das diferenciações genética nas populações *C. portalegrense* que são observadas. Como o marcador D-Loop apresenta evolução rápida (Meyer, 1993; Brown, 2008), ele foi útil na detecção dessas diferenças para a população de *C. portalegrense* presente no Hermenegildo.

Quando realizamos as mesmas análises considerando as bacias hidrográficas, diferenciação significativa par-a-par é observada em relação à variação em Cyt-B entre todas as quatro bacias. Isso contrasta com a divergência revelada pelo D-loop onde apenas Piratini São-Gonçalo-Mangueira se diferencia das bacias hidrográficas restantes. Estrutura genética entre bacias hidrográficas também foi significativa na análise de variância, como revelado pelo D-Loop. Porém parte da variância, tanto para o D-loop como em Cyt-b, se distribuíram entre locais ou ainda entre locais dentro de bacias. Dessa forma, tanto o isolamento em bacias como em locais é importante.

Esse padrão é semelhante àquele encontrado por Berbel-Filho et al. (2016) na avaliação da variação genética e fenotípica de *C. orientale* e *Crenicichla menezesi* em cinco bacias isoladas do semi-árido do nordeste do Brasil. Ambas as espécies têm a forma do corpo influenciada pelo isolamento em bacias hidrográficas e, no caso de *C. orientale*, pelo ambiente, se lótico ou lântico. Em *C. orientale* quase 80 % da variação genética está distribuída entre as bacias, existindo um pequeno efeito de localidade também. Nesse caso a rede de haplótipos mostrou divergência de sequências entre as bacias hidrográficas Paraíba do Norte, Piranhas-Açu e São Francisco em relação às bacias Jaguaribe e Apodi-Mossoro. Já *Crenicichla menezesi* apresentou apenas três haplótipos, com um haplótipo mais frequente compartilhado por todas as populações.

Os resultados de análise morfométrica apontam que as diferenças indicadas nos grids da morfogeno, sendo indicadores das formas corporais independente do sexo, foram bem acentuadas principalmente em relação ao alongamento do corpo e algumas populações se destacaram na PCA como as populações da Ilha dos Marinheiros (negativo PCA1) e Balneário Yara (positivo PCA1). Porém, não existe agrupamento claro das populações do norte e do sul, como encontrado no cenário para os marcadores neutros. Essa diferenciação fenotípica pode estar associada à diferenciação genética encontrada nas distintas populações, ou pode estar relacionada às características/pressão do meio, o que justificaria essa diferenciação morfométrica analisada. Assim como encontrado em Berbel-Filho et al. (2016), em que os resultados sugeriram que a variação da forma atual das populações de *C. orientale* e *C. menezesi* no nordeste do Brasil pode ser influenciada pelos regimes de fluxo de água, por isolamento em localidades ou por isolamento em bacias hidrográficas.

A análise dos resultados reforça as relações entre estruturação genética e a compartimentação de bacias. Mesmo com esse indicativo, quanto da hipótese inicial, não foi possível identificar um padrão de diferenciação genética relacionado a evolução geológica da planície costeira do RS a partir da análise empregada e do recorte amostral disponível (temporal e espacialmente). Mesmo considerando as limitações da análise, aponta-se existir estrutura genética relacionada a divisão espacial por bacias hidrográficas, embora não seja possível indicar relação direta entre a geocronologia da PCRS e formação dos Sistemas Laguna-barreira e as diferenças genéticas das populações analisadas.

Agradecimentos: Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES)—Código Financeiro 001, FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) FAPERGS/CNPq-PRONEX N° 16/0485-4.

REFERÊNCIAS

- Adams, D. C. & E. Otárola-Castillo, 2013. Geomorph: an r package for the collection and analysis of geometric morphometric shape data. *Methods in Ecology and Evolution* 4: 393–399.
- Adams, D. C., M. L. Collyer, A. Kaliontzopoulou & E. Sherratt, 2017. 2017 Geomorph: software for geometric morphometric analyses. *R Package Version* 3: 4.
- Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19: 716–723.
- Avise, J. C., 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge.
- Bandelt, H. J., P. Forster, & A. Röhl, 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37–48.
- Barbosa, C., D. K. Garcez, M. V. Volcan, & L. J. Robe, 2020. Evidences for genetic differentiation within the highly endemic and endangered annual fish *Austrolebias nigrofasciatus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Journal of Fish Biology* 96: 154–167.
- Beheregaray, L. B., P. Sunnucks, & D. A. Briscoe, 2002. A rapid fish radiation associated with the last sea-level changes in southern Brazil: The silverside *Odontesthes perugiae* complex. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 269: 65–73.
- Beltrame, L. F. S., & C. E. M. Tucci, 1998. Estudo para avaliação e gerenciamento da disponibilidade hídrica da Bacia da Lagoa Mirim. Instituto de Pesquisas Hidráulicas/UFRGS, Porto Alegre. Porto Alegre.
- Berbel-Filho, W. M., P. A. Martinez, T. P. A. Ramos, R. A. Torres, & S. M. Q. Lima, 2016. Inter- and intra-basin phenotypic variation in two riverine cichlids from northeastern Brazil: potential eco-evolutionary damages of São Francisco interbasin water transfer. *Hydrobiologia* 766: 43–56.
- Bertaco, V. A., J. Ferrer, F. R. Carvalho, & L. R. Malabarba, 2016. Inventory of the freshwater fishes from a densely collected area in South America - A case study of the current knowledge of Neotropical fish diversity. *Zootaxa* 4138: 401–440.
- Brown, K. H., 2008. Fish mitochondrial genomics: Sequence, inheritance and functional variation. *Journal of Fish Biology* 72: 355–374.
- Brown, W. M., M. George, & A. C. Wilson, 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 1967–1971.
- Burger, M. I., & R. A. Ramos, 2006. Áreas importantes para conservação na Planície Costeira do

- Rio Grande do Sul. Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Brasília.
- Burress, E. D., 2015. Cichlid fishes as models of ecological diversification: patterns, mechanisms, and consequences. *Hydrobiologia* 748: 7–27.
- Burress, E. D., L. Piálek, J. R. Casciotta, A. Almirón, M. Tan, J. W. Armbruster, & O. Říčan, 2018. Island- and lake-like parallel adaptive radiations replicated in rivers. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 285: 1–9.
- Carvajal-Vallejos, F. M., F. Duponchelle, J. P. T. Ballivian, N. Hubert, J. N. Rodríguez, P. Berrebi, S. S. Cornejo, & J. F. Renno, 2010. Population genetic structure of *Cichla pleiozona* (Perciformes: Cichlidae) in the Upper Madera basin (Bolivian Amazon): Sex-biased dispersal?. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Elsevier Inc. 57: 1334–1340.
- Ceolin, A., 2015. Avaliação da regeneração natural da vegetação promovida pela bioengenharia de solos nas margens do Arroio Viúva Tereza, São Lourenço do Sul – RS. Dissertação de Mestrado, Universidade La Salle, Canoas.
- Diamante, N. A., A. V. de Oliveira, A. C. Petry, P. A. Catelani, F. M. Pelicice, S. M. A. P. Prioli, & A. J. Prioli, 2017. Molecular analysis of invasive *Cichla* (Perciformes: Cichlidae) populations from neotropical ecosystems. *Biochemical Systematics and Ecology* 72: 15–22.
- Excoffier, L., & H. E. L. Lischer, 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564–567.
- Fishbase, 2021. *Cichlasoma portalegrense*. [<https://www.fishbase.se/summary/Cichlasomaportalegrense>]. Acessado em 18 de jul de 2021.
- Fricke, R., W. N. Eschmeyer, & J. D. Frong, 2021. Species by family/ subfamily in the Catalog of Fishes Catalog of Fishes. [versão eletrônica]. [<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>]. Acessado em 5 de Abr de 2021.
- Fu, Y. X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.
- Garcez, D. K., C. Barbosa, M. Loureiro, M. V. Volcan, D. Loebmann, F. M. Quintela, & L. J. Robe, 2018. Phylogeography of the critically endangered neotropical annual fish, *Austrolebias wolterstorffi* (Cyprinodontiformes: Aplocheilidae): genetic and morphometric evidence of a new species complex. *Environmental Biology of Fishes* 101: 1503–1515.

- Gittenberger, E., 1991. What about non-adaptive radiation?. *Biological Journal of the Linnean Society* 43: 263–272.
- Grant, W. S., & B. W. Bowen, 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Genetics* 30: 415–426.
- Hewitt, G. M., 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. 247–276.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120.
- Kocher, T. D., 2004. Adaptive evolution and explosive speciation: The cichlid fish model. *Nature Reviews Genetics* 5: 288–298.
- Koch, W. R., P. C. Milani, K. M. Grosser, 2000. Peixes Parque Delta do Jacuí. The study on the environmental management. Dolika, Porto Alegre.
- Kullander, S.O., 2003. Cichlidae (Cichlids). In Reis, R. E., S.O. Kullander & C.J. Ferraris, Jr. Checklist of the freshwater fishes of south and central America, EDIPUCRS, Porto Alegre.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, & K. Tamura, 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547–1549.
- López-Fernández, H., J. H. Arbour, K. O. Winemiller, & R. L. Honeycutt, 2013. Testing for ancient adaptive radiations in neotropical cichlid fishes. *Evolution* 67: 1321–1337.
- López-fernández, H., K. O. Winemiller, & R. L. Honeycutt, 2010. Multilocus phylogeny and rapid radiations in Neotropical cichlid fishes (Perciformes: Cichlidae: Cichlinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 1070–1086.
- Lee, W. J., J. Conroy, W. H. Howell, & T. D. Kocher, 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *Journal of Molecular Evolution* 41: 54–66.
- Mäder, A., F. C. Silva, J. M. Pinto, I. S. Amaral, F. P. R. Santos, D. R. Giudice, P. T. Sarti, C. K. Marques, D. Silveira, F. A. Faria, P. Nunes, & G. E. Casa-JR, 2017. Guia de espécies da fauna e da flora do Banhado Salies. Santa Vitória do Palmar, RS.
- Malabarba, L. R., 1989. Historico sistematico e lista comentada das especies de peixes de água doce do sistema da Laguna dos Patos. 2: 107-179.
- Malabarba, L. R., & E. A. Isaia, 1992. The fresh water fish fauna of the Rio Tramandai drainage, Rio Grande do Sul, Brazil, with a discussion of its historical origin. *Comunicações do Museu de Ciências PUCRS, série zoologia* 5: 197–223.

- Malabarba, L. R., M. C. Malabarba, & R. E. Reis, 2015. Descriptions of five new species of the Neotropical cichlid genus *Gymnogeophagus* Miranda Ribeiro, 1918 (Teleostei: Cichliformes) from the Rio Uruguay drainage. *Neotropical Ichthyology* 13: 637–662.
- Malabarba, L. R., P. C. Neto, V. de A. Bertaco, T. P. Carvalho, J. F. dos Santos, & L. G. S. Artioli, 2013. Guia de identificação dos peixes da bacia do Rio Tramandaí. Via Sapiens, Porto Alegre.
- Maltchik, L., L. Esteban, K. Lanés, C. Stenert, & E. S. F. Medeiros, 2010. Species-area relationship and environmental predictors of fish communities in coastal freshwater wetlands of southern Brazil. *Environ Biol Fish* 25–35.
- Marinho, C., 2015. Integração de parâmetros geomorfológicos e biológicos no desenvolvimento de uma proposta de Índice de Sensibilidade do Litoral (ISL). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- Mills, L. S., & F. W. Allendorf, 1996. The One-Migrant-per-Generation Rule in Conservation and Management. *Conservation Biology* 10: 1509–1518.
- McMahan, C. D., P. Chakrabarty, J. S. Sparks, W. L. Smith, & M. P. Davis, 2013. Temporal patterns of diversification across global cichlid biodiversity (Acanthomorpha: Cichlidae). *PLOS ONE* 8:1-9.
- Medrano, J. F., E. Aasen, & L. Sharrow, 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8: 43
- Meyer, A., 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and molecular biology of fishes* 2: 1–38.
- Montes, M. A., L. F. B. Oliveira, S. L. Bonatto, S. M. Callegari-Jacques, & M. S. Mattevi, 2008. DNA sequence analysis and the phylogeographical history of the rodent *Deltamys kempi* (Sigmodontinae, Cricetidae) on the Atlantic Coastal Plain of south of Brazil. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 1823–1835.
- Musilová, Z., O. Říčan, K. Janko, & J. Novák, 2008. Molecular phylogeny and biogeography of the Neotropical cichlid fish tribe Cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae: Cichlasomatinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 659–672.
- Otoni, F. P., 2011. *Cichlasoma zarskei*, a new cichlid fish from northern Brazil (Teleostei: Labroidae: Cichlidae). *Vertebrate Zoology* 61: 335–342.
- Pasqualim, G., G. Baldo, T. G. De Carvalho, A. M. V. Tavares, R. Giugliani, & U. Matte, 2015. Effects of enzyme replacement therapy started late in a murine model of mucopolysaccharidosis type I. *PLoS ONE* 10: 1–15.

- Plano de Manejo APA da Lagoa Verde, 2011. Disponível em: <https://sema.rs.gov.br/upload/arquivos/202112/15165421-pm-apa-da-lagoa-verde-compressed.pdf>. Acesso em 04 de fevereiro de 2022.
- Quintela, F. M., L. F. M. N. Neves, I. G. Medvedovsky, M. B. Santos, M. C. L. M. Oliveira & M. R. C. Figueiredo, 2009. Relação dos anfíbios da Ilha dos Marinheiros, estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 7: 231–233.
- Quintela, F., F. Corrêa, R. M. Pinheiro & D. Loebmann, 2018. Ichthyofauna of Marinheiros Island, Patos Lagoon estuary, southern Brazil. *Biota Neotropica* 18: e20170430.
- Ramos-Fregonezi, A. M.C., L.R. Malabarba, & N.J.R. Fagundes, 2017. Population genetic structure of *Cnesterodon decemmaculatus* (Poeciliidae): A freshwater look at the Pampa biome in southern south america. *Frontiers in Genetics* 8: 1–10.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Renno, J. F., N. Hubert, J. P. Torrico, F. Duponchelle, J. Nunez Rodriguez, C. Garcia Davila, S. C. Willis, & E. Desmarais, 2006. Phylogeography of *Cichla* (Cichlidae) in the upper Madera basin (Bolivian Amazon). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 503–510.
- Říčan, O., & S. O. Kullander, 2006. Character- and tree-based delimitation of species in the “*Cichlasoma*” *facetum* group (Teleostei, Cichlidae) with the description of a new genus. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 44: 136–152.
- Rohlf, F. J., 2013. tps Utility program. SUNY at Stony Brook.
- Rohlf, F. J., 2015. The tps series of software. *Hystrix-Italian Journal of Mammalogy* 26: 9–12.
- Rohlf, F. J. & D. Slice, 1990. Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology* 39: 40–59.
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. Van Der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, & J. P. Huelsenbeck, 2012. Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.
- Rozas, J., A. Ferrer-Mata, J. C. Sanchez-DelBarrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, S. E. Ramos-Onsins, & A. Sanchez-Gracia, 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution* 34: 3299–3302.
- Rambaut A, Drummond AJ (2009) FigTree, v1.4.3. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Acesso em 09 de outubro de 2020.
- Salzburger, W., 2018. Understanding explosive diversification through cichlid fish genomics. *Nature Reviews Genetics Springer US* 19: 705–717.

- Santos, I. R., P. Baisch, G. T. N. P. Lima, & E. V. Silva Filho, 2004. Nutrients in surface sediments of Mirim lagoon , Brazil- Uruguay border. *Acta Limnológica Brasileira* 16: 85–94.
- Seehausen, O., 2015. Process and pattern in cichlid radiations - inferences for understanding unusually high rates of evolutionary diversification. *New Phytologist* 207: 304–312.
- Seeliger, U. & C. Odebrecht, 2010. O estuário da Lagoa dos Patos: um século de transformações. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- Schwarzbald, A., & A. Schäfer, 1984. Gênese e morfologia das lagoas costeiras do Rio Grande do Sul - Brasil. *Amazoniana* 1: 87–104.
- Smith, W.L., P. Chakrabarty, & J.S. Sparks, 2008. Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). *Cladistics* 24: 625–641.
- Souza, C. R., P. R. A. de Mello Affonso, J. de Araújo Bitencourt, I. Sampaio, & P. L. S. Carneiro, 2017. Species validation and cryptic diversity in the *Geophagus brasiliensis* Quoy & Gaimard, 1824 complex (Teleostei, Cichlidae) from Brazilian coastal basins as revealed by DNA analyses. *Hydrobiologia* 809: 309–321.
- Sparks, J. S., 2004. Molecular phylogeny and biogeography of the Malagasy and South Asian cichlids (Teleostei : Perciformes : Cichlidae). 30: 599–614.
- Sparks, J. S., & W. L. Smith, 2004. Phylogeny and biogeography of cichlid fishes (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *Cladistics* 20: 501–517.
- Stange, M., G. Aguirre-Fernández, R. G. Cooke, T. Barros, W. Salzburger & M. R. Sánchez-Villagra, 2016. Evolution of opercle bone shape along a macrohabitat gradient: species identification using mtDNA and geometric morphometric analyses in neotropical sea catfishes (Ariidae). *Ecology and Evolution* 6: 5817–5830.
- Steele, S. E., & H. López-Fernández, 2014. Body size diversity and frequency distributions of neotropical cichlid fishes (Cichliformes: Cichlidae: Cichlinae). *Plos One* 9: 1–11.
- Svardal, H., W. Salzburger, & M. Malinsky, 2020. Genetic variation and hybridization in evolutionary radiations of cichlid fishes. *Annual Review of Animal Biosciences* 9: 55–79.
- Tajima, F., 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437–460.
- Tajima, F., 1989a. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585–595.
- Tajima, F., 1989b. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123: 597–601.
- Tomazelli, L. J., & J. A. Villwock, 2000. O Cenozóico costeiro do Rio Grande Do Sul. *Geologia*

- do Rio Grande do Sul 375–406.
- Tomazelli, L. J., & J. A. Villwock, 2005. Mapeamento geológico de Planícies Costeiras: o exemplo da costa do Rio Grande do Sul. *Gravel* 3: 109–105.
- Tomazelli, L., & J. Villwock, 1991. Geologia do sistema lagunar holocênico do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisa em Geocências* 18: 13–24.
- Venables, W. N. & B. D. Ripley, 2002. *Modern Applied Statistics with S*. Springer, New York.
- Vidal, L. V. O., R. C. B. Albinati, A. C. L. Albinati, A. D. de Lira, T. R. de Almeida, & G. B. Santos, 2008. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43: 1069–1074.
- Wagner, C. E., L. J. Harmon, & O. Seehausen, 2012. Ecological opportunity and sexual selection together predict adaptive radiation. *Nature* 487: 366–369.
- Zelditch, M. L., D. L. Swiderski & H. D. Sheets, 2012. *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. Elsevier, London

TABELAS

Tabela 1 Estimativas de diversidade genética e testes de neutralidade realizados para cada sítio usando os marcadores Cyt-b, COI e D-Loop.

Marcadores moleculares	Bacias hidrográficas	Locais	N	H	Hd/sd	π /sd	K	D Tajima	FS e de FU
Cyt-b	Baixo Jacuí	Eldorado do Sul (EdS)	15	3	0,629±0,086	0,00117±0,00031	1,02857	0,34155	0,989
	Tramandaí	Balneário Yara (Bya)	3	1	0	0	0	—	—
	Camaquã	Lagoa da Pinguela (LdP)	2	2	1,000±0,500	0,00114±0,00057	1,00000	—	—
		Balneário Jardim do Éden (BJE)	21	3	0,452±0,105	0,00097±0,00024	0,85714	0,07336	0,917
		Museu General Bento Gonçalves (MGB)	4	2	0,500±0,265	0,00170±0,00090	1,50000	-0,75445	1,716
		Arroio Viúva Tereza (AVT)	2	1	0	0	0	—	—
	Piratini-São Gonçalo-Mangueira	Ilha dos Marinheiros (IdM)	18	4	0,784±0,040	0,00145±0,00011	1,27451	1,27889	0,439
		Arroio Bolaxa (ArB)	16	3	0,433±0,138	0,00072±0,00025	0,63333	0,12996	0,062
Hermenegildo (Hmg)		20	1	0	0	0	—	—	
TOTAL			101	11	0,792± 0,029	0,00136±0,00011	1,19683	-1,27990	-4,031
COI	Baixo Jacuí	Eldorado do Sul (EdS)	15	1	0	0	0	—	—
	Tramandaí	Balneário Yara (Bya)	3	1	0	0	0	—	—
	Camaquã	Lagoa da Pinguela (LdP)	2	1	0	0	0	—	—
		Balneário Jardim do Éden (BJE)	21	3	0,186±0,110	0,00032±0,00019	0,19048	-1,51414	-1,920
		Museu General Bento Gonçalves (MGB)	4	1	0	0	0	—	—
		Arroio Viúva Tereza (AVT)	2	1	0	0	0	—	—
	Piratini-São Gonçalo-Mangueira	Ilha dos Marinheiros (IdM)	18	2	0,425±0,099	0,00071±0,00017	0,42484	0,86950	1,039
		Arroio Bolaxa (ArB)	16	3	0,342±0,140	0,00102±0,00055	0,60833	-1,4972	-0,014
Hermenegildo (Hmg)		20	6	0,447±0,137	0,00127±0,00045	0,75789	-1,41437	-3,148	
TOTAL			101	10	0,272±0,058	0,00064±0,00017	0,38535	-1,93852	-10,125
D-LOOP	Baixo Jacuí	Eldorado do Sul (EdS)	15	1	0	0	0	—	—
	Tramandaí	Balneário Yara (Bya)	3	1	0	0	0	—	—
	Camaquã	Lagoa da Pinguela (LdP)	2	1	0	0	0	—	—
		Balneário Jardim do Éden (BJE)	21	1	0	0	0	—	—
		Museu General Bento Gonçalves (MGB)	4	1	0	0	0	—	—
		Arroio Viúva Tereza (AVT)	2	2	1,000±0,500	0,00233±0,00117	1,00000	—	—
	Piratini-São Gonçalo-Mangueira	Ilha dos Marinheiros (IdM)	17	2	0,529±0,045	0,00123±0,00010	0,52941	1,52627	1,389
		Arroio Bolaxa (ArB)	16	2	0,233±0,126	0,00054±0,00029	0,23333	-0,44832	0,083
Hermenegildo (Hmg)		20	1	0	0	0	—	—	
TOTAL			100	3	0,504±0,019	0,00119±0,00006	0,51212	0,50076	0,816
Diversidade global			100	21	0,891±0,014	0,00109±0,00007	2,07354	-1,57316	-11,227

N, número de indivíduos; H, número de haplótipos; Hd, diversidade de haplótipos; π , diversidade de nucleotídeos; Sd, desvio padrão; K, diferenças de nucleotídeos entre haplótipos. Testes de neutralidade, D de Tajima e Fs de Fu (sem valor significativo).

Tabela 2 Índices de fixação par-a-par (FST) (acima da diagonal) e distâncias médias par-a-par (abaixo da diagonal) obtidos nas comparações entre os locais de coleta utilizando o marcador Cyt-b. Valores significativos ($p < 0,05$) são indicados por um “*”.

Grupos	Eldorado do Sul	Balneário Yara	Lagoa da Pinguela	Balneário Jardim do Éden	Museu General Bento Gonçalves	Arroio Viúva Tereza	Ilha dos Marinheiros	Arroio Bolaxa	Hermenegildo
Eldorado do Sul	0	0,13462	0,21375	0,49420*	0,22967	0,04762	0,29223*	0,50622*	0,40299*
Balneário Yara	0,00091	0	0,25000	0,38656*	-0,09091	0,00000	0,00847	0,45552*	0,00000
Lagoa da Pinguela	0,00148	0,00057	0	0,43043	-0,06024	0,00000	0,09467	0,49512*	0,82533
Balneário Jardim do Éden	0,00210	0,00119	0,00176	0	0,41339*	0,33754	0,43780*	0,60699*	0,58436*
Museu General Bento Gonçalves	0,00176	0,00085	0,00142	0,00202	0	-0,26316	0,14344	0,45299*	0,43396
Arroio Viúva Tereza	0,00091	0,00000	0,00057	0,00119	0,00085	0	-0,09346	0,40914	0,00000
Ilha dos Marinheiros	0,00186	0,00095	0,00152	0,00214	0,00180	0,00095	0	0,21453*	0,24916*
Arroio Bolaxa	0,00191	0,00099	0,00156	0,00219	0,00185	0,00099	0,00139	0	0,66809*
Hermenegildo	0,00091	0,00000	0,00057	0,00119	0,00085	0,00000	0,00095	0,00099	0

Tabela 3 Índices de fixação par-a-par (FST) (acima da diagonal) e distâncias médias par-a-par (abaixo da diagonal) obtidos nas comparações entre os locais de coleta utilizando o marcador COI. Valores significativos ($p < 0,05$) são indicados por um “*”.

Grupos	Eldorado do Sul	Balneário Yara	Lagoa da Pinguela	Balneário Jardim do Éden	Museu General Bento Gonçalves	Arroio Viúva Tereza	Ilha dos Marinheiros	Arroio Bolaxa	Hermenegildo
Eldorado do Sul	0	0,00000	0,00000	-0,01695	0,00000	0,00000	0,21265*	0,02183	0,03226
Balneário Yara	0,00000	0	0,00000	-0,19658	0,00000	0,00000	0,00847	-0,17230	-0,15385
Lagoa da Pinguela	0,00000	0,00000	0	-0,33122	0,00000	0,00000	-0,09346	-0,30430	-0,28114
Balneário Jardim do Éden	0,00016	0,00016	0,00016	0	-0,13821	-0,33122	0,18195*	0,03026	0,03510
Museu General Bento Gonçalves	0,00000	0,00000	0,00000	0,00016	0	0,00000	0,05740	-0,11397	-0,09756
Arroio Viúva Tereza	0,00000	0,00000	0,00000	0,00016	0,00000	0	-0,09346	-0,30430	-0,28114
Ilha dos Marinheiros	0,00046	0,00046	0,00046	0,00062	0,00046	0,00046	0	0,00951	0,12456*
Arroio Bolaxa	0,00052	0,00052	0,00052	0,00068	0,00052	0,00052	0,00087	0	0,03105
Hermenegildo	0,00067	0,00067	0,00067	0,00082	0,00067	0,00067	0,00113	0,00118	0

Tabela 4 Índices de fixação par-a-par (FST) (acima da diagonal) e distâncias médias par-a-par (abaixo da diagonal) obtidos nas comparações entre os locais de coleta utilizando o marcador D-Loop. Valores significativos ($p < 0,05$) são indicados por um “*”.

Grupos	Eldorado do Sul	Balneário Yara	Lagoa da Pinguela	Balneário Jardim do Éden	Museu General Bento Gonçalves	Arroio Viúva Tereza	Ilha dos Marinheiros	Arroio Bolaxa	Hermenegildo
Eldorado do Sul	0	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,77612	0,41913*	0,86262*	1,00000*
Balneário Yara	0,00000	0	0,00000	0,00000	0,00000	0,25000	0,21538	0,77880*	1,00000*
Lagoa da Pinguela	0,00000	0,00000	0	0,00000	0,00000	0,00000	0,14165	0,76296*	1,00000*
Balneário Jardim do Éden	0,00000	0,00000	0,00000	0	0,00000	0,83267	0,47033*	0,88374*	1,00000*
Museu General Bento Gonçalves	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0	0,38462	0,25502	0,79085*	1,00000*
Arroio Viúva Tereza	0,00117	0,00117	0,00117	0,00117	0,00117	0	0,36178	0,76905*	0,96113*
Ilha dos Marinheiros	0,00110	0,00110	0,00110	0,00110	0,00110	0,00227	0	0,26626*	0,52464*
Arroio Bolaxa	0,00204	0,00204	0,00204	0,00204	0,00204	0,00321	0,00122	0	0,08720
Hermenegildo	0,00234	0,00234	0,00234	0,00234	0,00234	0,00351	0,00124	0,00029	0

Tabela 5 Estimativas de diversidade genética e testes de neutralidade realizados para cada bacia hidrográfica utilizando os marcadores Cyt-b, COI e D-Loop.

Marcadores moleculares	Bacias hidrográficas	N	H	Hd/sd	π /sd	K	D Tajima	FS e de FU
Cyt-b	Baixo Jacuí	15	3	0,629±0,086	0,00117±0,00031	1,02857	0,34155	0,989
	Tramandaí	26	5	0,628±0,087	0,00110±0,00018	0,96923	-0,20135	-0,873
	Camaquã	6	2	0,333±0,215	0,00114±0,00073	1,00000	-1,23311	1,609
	Piratini-São Gonçalo-Mangueira	54	4	0,674±0,039	0,00095±0,00010	0,84067	0,56237	0,478
COI	Baixo Jacuí	15	1	0	0	0	—	—
	Tramandaí	26	3	0,151±0,093	0,00026±0,00016	0,15385	-1,51314	-2,176
	Camaquã	6	1	0	0	0	—	—
	Piratini-São Gonçalo-Mangueira	54	8	0,412±0,080	0,00105±0,00027	0,63033	-1,72393	0,998
D-Loop	Baixo Jacuí	15	1	0	0	0	—	—
	Tramandaí	26	1	0	0	0	—	—
	Camaquã	6	2	0,333±0,215	0,00078±0,00050	0,33333	-0,93302	-0,003
	Piratini-São Gonçalo-Mangueira	53	2	0,335±0,066	0,00078±0,00015	0,33527	0,69017	1,173

N, número de indivíduos; H, número de haplótipos; Hd, diversidade de haplótipos; π , diversidade de nucleotídeos; Sd, desvio padrão; K, diferenças de nucleotídeos entre haplótipos.

Testes de neutralidade, D de Tajima e Fs de Fu (sem valor significativo).

Tabela 6 Índices de fixação par-a-par (FST) (acima da diagonal) e distâncias médias par-a-par (abaixo da diagonal) obtidos nas comparações entre bacias hidrográficas usando o marcador Cyt-b. Valores significativos ($p < 0,05$) são indicados por um “*”.

Bacias hidrográficas	Baixo Jacuí	Tramandaí	Camaquã	Piratini São-Gonçalo-Mangueira
Baixo Jacuí	0	0,40938*	0,21774*	0,31626*
Tramandaí	0,00192	0	0,28544*	0,37003*
Camaquã	0,00148	0,00156	0	0,13092*
Piratini-São-Gonçalo-Mangueira	0,00152	0,00162	0,00118	0

Tabela 7 Índices de fixação par-a-par (FST) (acima da diagonal) e distâncias médias par-a-par (abaixo da diagonal) obtidos nas comparações entre bacias hidrográficas usando o marcador COI. Valores significativos ($p < 0,05$) são indicados por um “*”.

Bacias hidrográficas	Baixo Jacuí	Tramandaí	Camaquã	Piratini São-Gonçalo-Mangueira
Baixo Jacuí	0	-0,02308	0,00000	0,00552
Tramandaí	0,00013	0	-0,08635	0,02437
Camaquã	0,00000	0,00013	0	-0,05365
Piratini-São-Gonçalo-Mangueira	0,00056	0,00068	0,00056	0

Tabela 8 Índices de fixação par-a-par (FST) (acima da diagonal) e distâncias médias par-a-par (abaixo da diagonal) obtidos nas comparações entre bacias hidrográficas usando o marcador D-Loop. Valores significativos ($p < 0,05$) são indicados por um “*”.

Bacias hidrográficas	Baixo Jacuí	Tramandaí	Camaquã	Piratini São-Gonçalo-Mangueira
Baixo Jacuí	0	0,00000	0,16667	0,70011*
Tramandaí	0,00000	0	0,28440	0,73297*
Camaquã	0,00039	0,00039	0	0,65086*
Piratini-São-Gonçalo-Mangueira	0,00185	0,00185	0,00224	0

Tabela 9 Análise de variância molecular (AMOVA) realizada para os locais usando as sequências dos marcadores Cyt-b, COI, D-Loop e dados concatenados.

Origem da variação	(d.f.) Porcentagem de variação %			
	COI	Cyt-b	D-Loop	Concatenado
Entre locais	(8) 2,22	(8) 49,06	(8) 75,01	(8) 39,83
Dentro dos locais	(92) 97,78	(92) 50,94	(91) 24,99	(91) 60,17
Índice de fixação				
FST	0,02217(ns)	0,4906***	0,75010*	0,39829***

ns: não significativo; ***: p-value < 0.001; *: p-value < 0.05.

Tabela 10 Análise de variância molecular (AMOVA) realizada para bacias hidrográficas usando as sequências dos marcadores Cyt-b, COI, D-Loop e dados concatenados.

Origem da variação	(d.f.) Porcentagem de variação %			
	COI	Cyt-b	D-Loop	Concatenado
Entre bacias hidrográficas	(3) 5,77	(3) 0,99	(3) 61,57	(3) 12,33
Entre locais dentro de bacias hidrográficas	(5) -2,11	(5) 48,20	(5) 17,31	(5) 29,36
Dentro dos locais	(92) 96,35	(92) 50,81	(91) 21,12	(91) 58,30
Índices de fixação				
FCT	0,05766(ns)	0,00985(ns)	0,61572***	0, 12334(ns)
FST	0,03655(ns)	0,49190***	0,78880***	0,41696***
FSC	-0,02240(ns)	0,48684***	0,45042*	0,33493***

ns: não significativo; ***: p-value < 0.001; *: p-value < 0.05.

FIGURAS

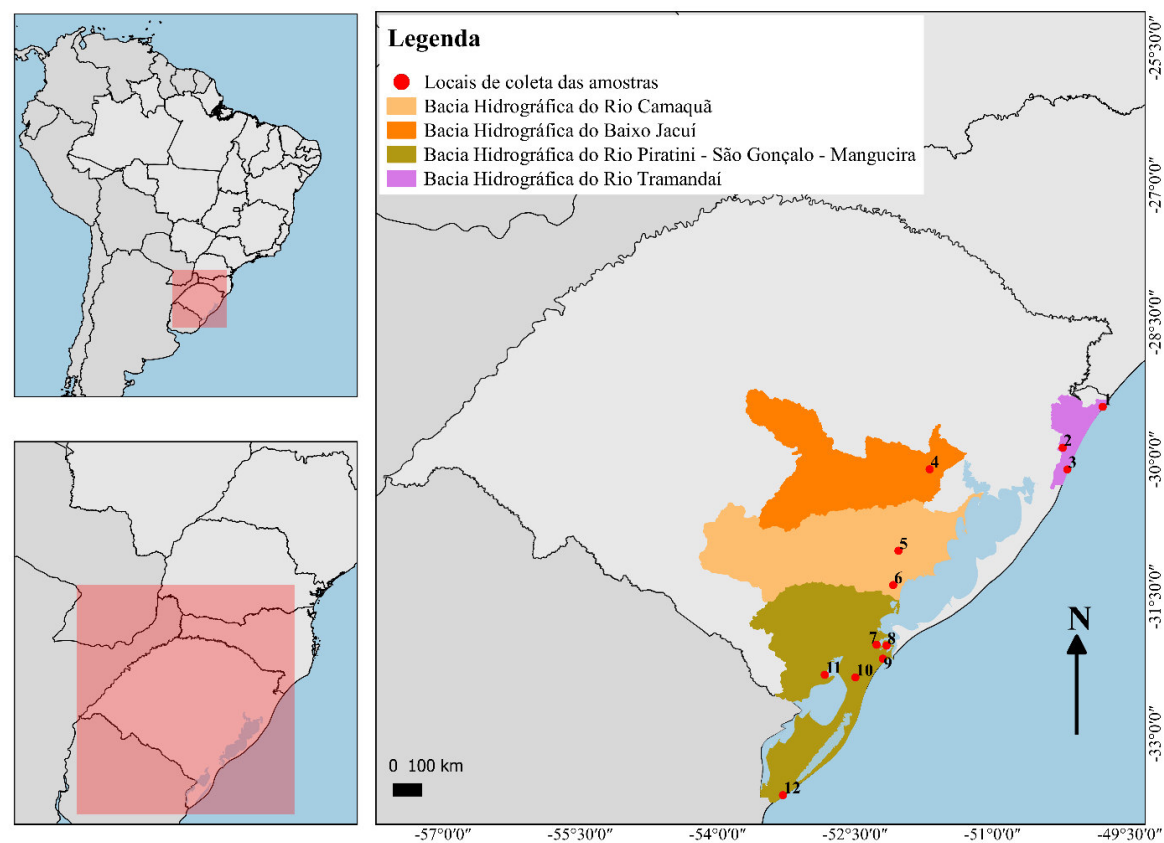


Fig. 1 Localização dos pontos amostrados. 1: Balneário Yara= **Bya** (Barreira IV); 2: Lagoa da Pinguela= **LdP** (Barreira IV); 3: Balneário Jardim do Éden= **BJE** (Barreira IV); 4: Eldorado do Sul= **EdS** (Depressão Periférica); 5: Museu General Bento Gonçalves= **MGB** (Leques Aluvias); 6: Arroio Viúva Tereza= **AVT** (Leques Aluvias); 7: Arraial= **Arr** (Barreira IV); 8: Ilha dos Marinheiros= **IdM** (Barreira IV); 9: Arroio Bolaxa= **ArB** (Barreira IV); 10: Lagoa Caiúba= **Cab** (Barreira III); 11: Arroio Grande= **ArG** (Sistema lagunar pleistocênico e holocênico); 12: Hermenegildo= **Hmg** (Barreira III).

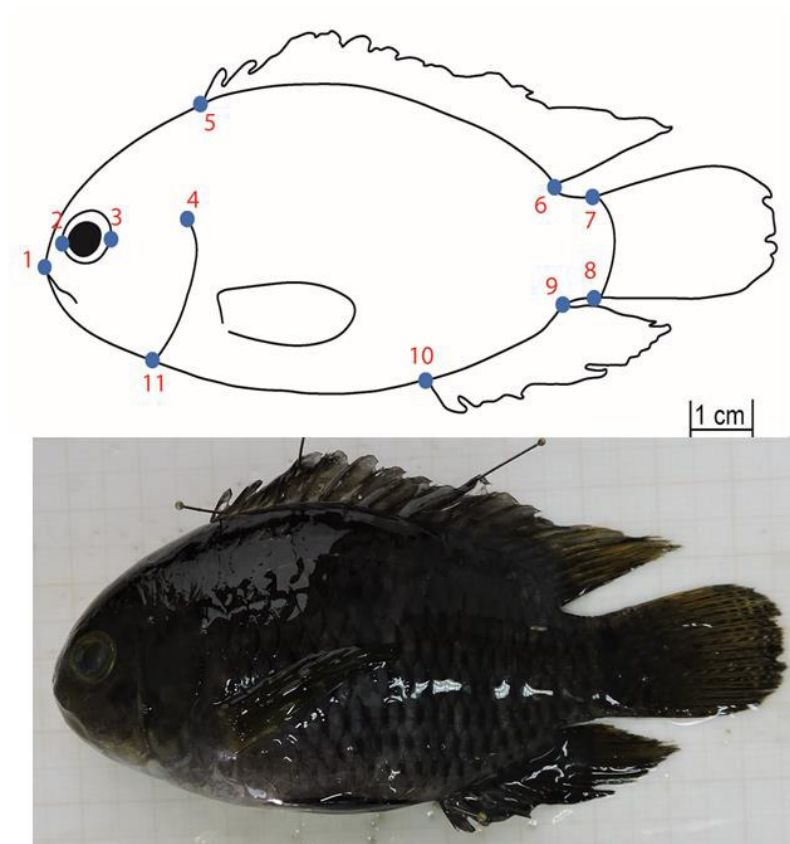


Fig. 2 Marcos anatômicos (pontos azuis). 1: margem anterior do maxilar superior; 2: margem mais anterior dos olhos; 3: margem mais posterior dos olhos; 4: extremidade anterior da abertura branquial; 5: origem anterior da nadadeira dorsal; 6: margem posterior da base da nadadeira dorsal; 7: margem dorsal da base da barbatana caudal; 8: margem ventral da base da nadadeira caudal; 9: margem posterior da base da nadadeira anal; 10: origem anterior da nadadeira anal; 11: extremidade posterior da abertura branquial.

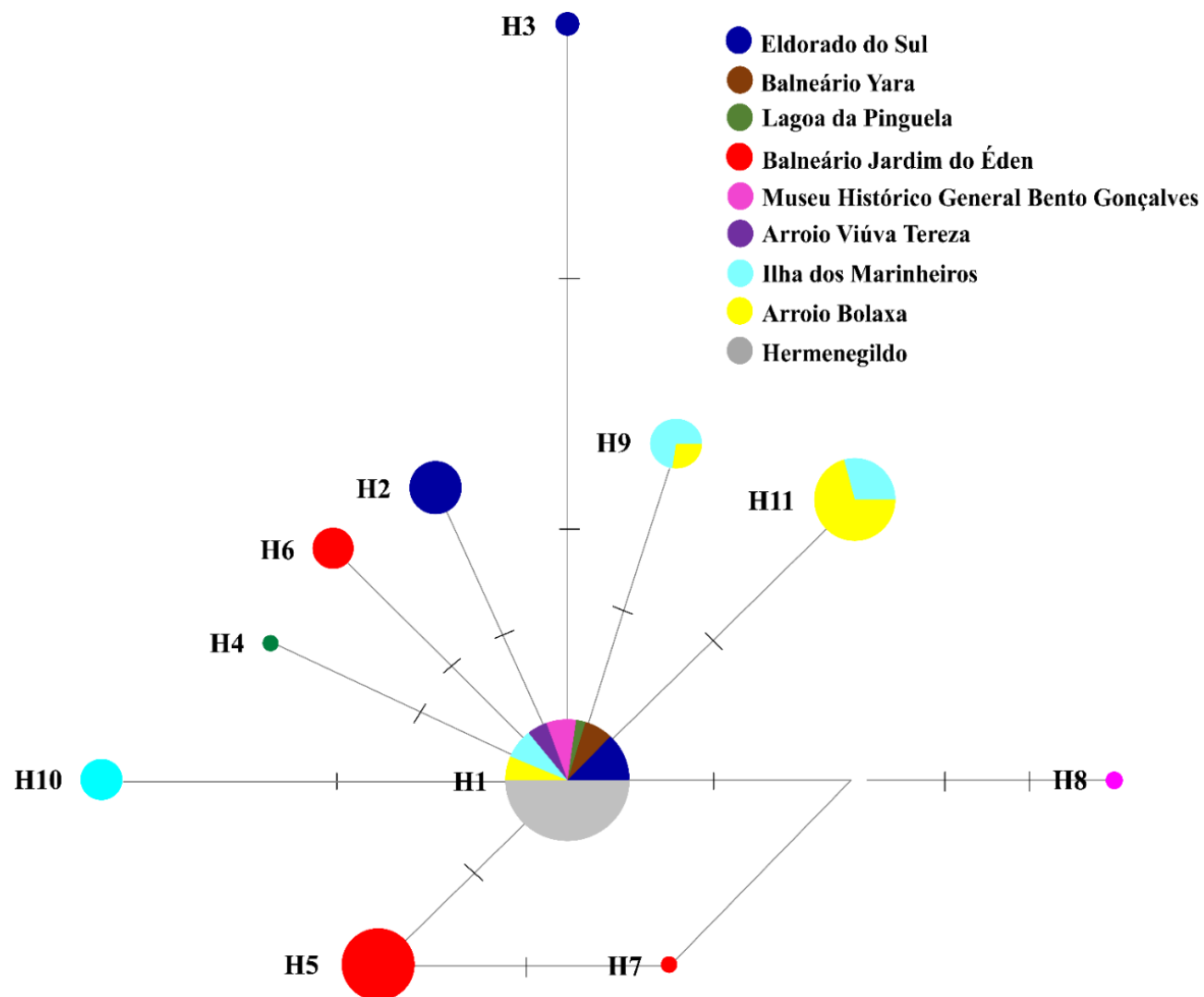


Fig. 3 Rede de haplótipos das 101 sequências Cyt-b (881 pb) amostradas para a espécie *Cichlasoma portalegreense*. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo. Os traços correspondem às diferenças mutacionais entre haplótipos. As cores referem-se às localizações, indicadas na legenda à direita.

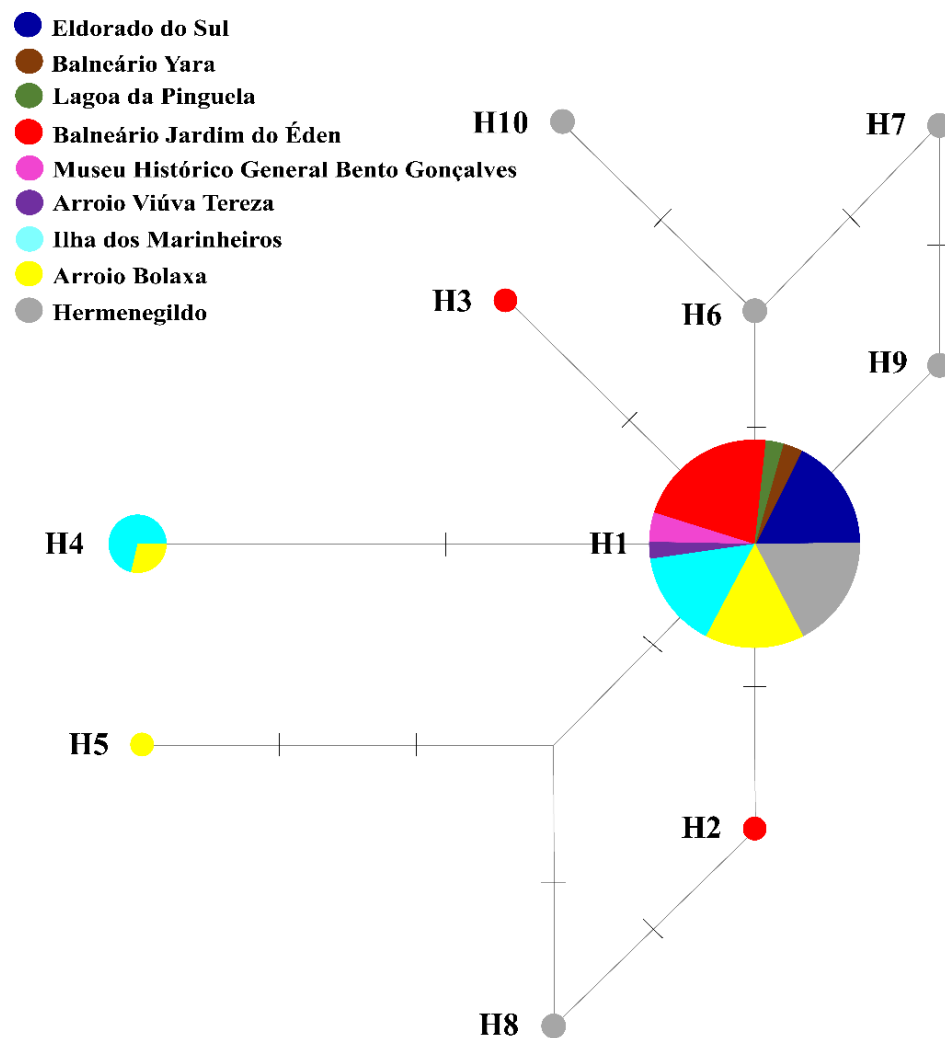


Fig. 4 Rede de haplótipos das 101 sequências COI (599 pb) amostradas para a espécie *Cichlasoma portalegreense*. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo. Os traços correspondem às diferenças mutacionais entre haplótipos. As cores referem-se às localizações, indicadas na legenda à esquerda.

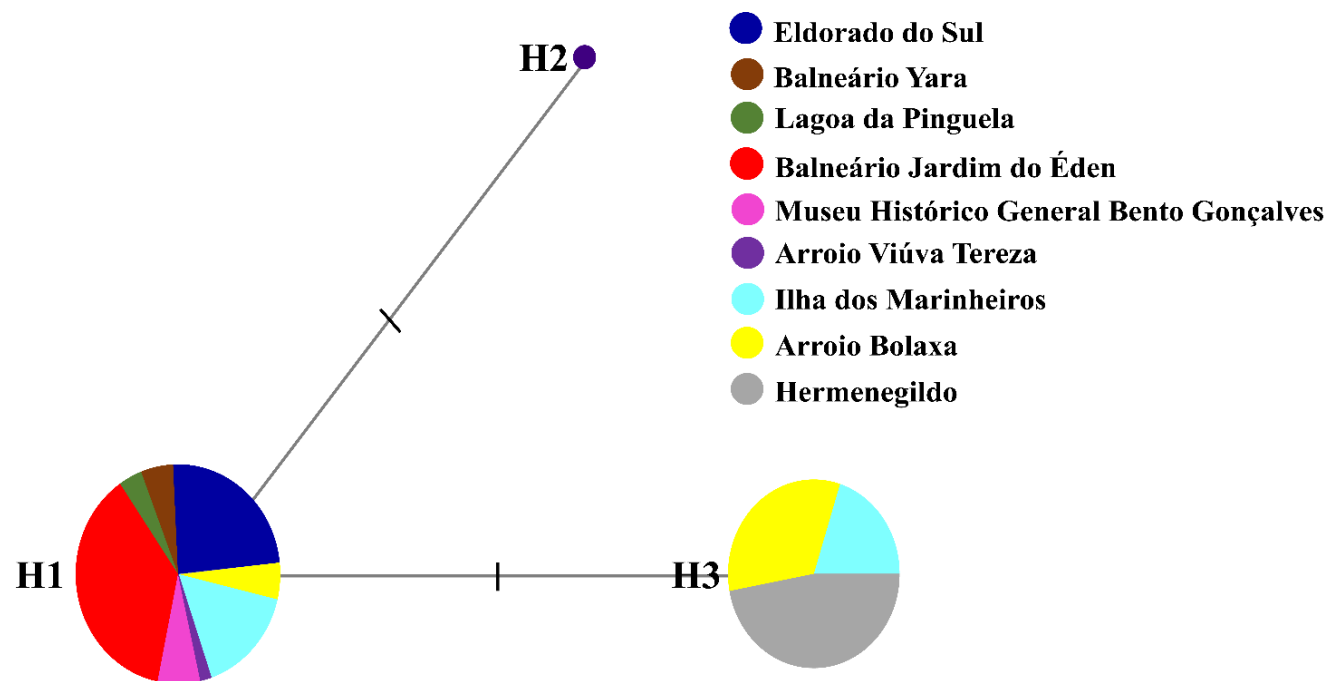


Fig. 5 Rede de haplótipos das 100 sequências D-Loop (429 pb) amostradas para a espécie *Cichlasoma portalegreense*. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo. Os traços correspondem às diferenças mutacionais entre haplótipos. As cores referem-se às localizações, indicadas na legenda à direita.

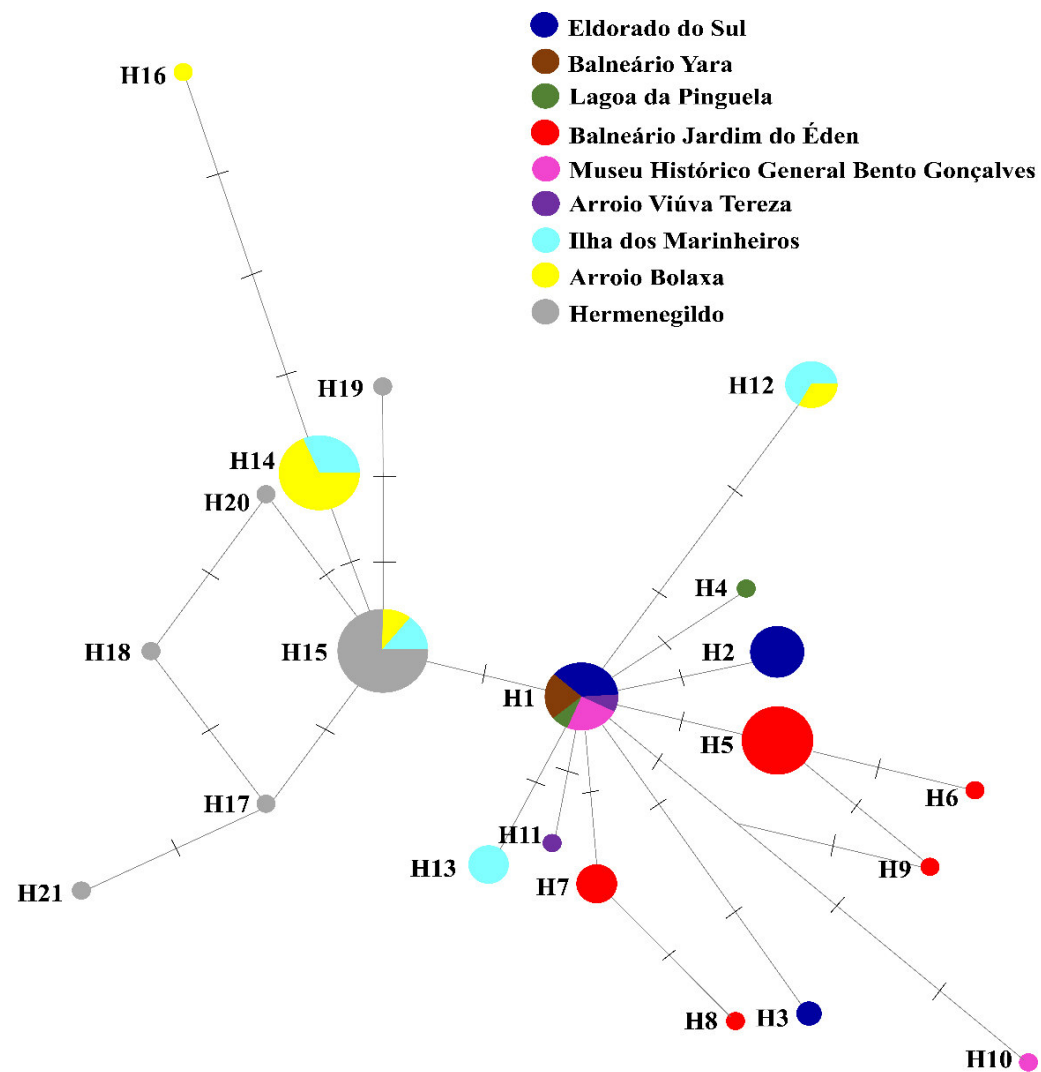


Fig. 6 Rede de haplótipos das 300 sequências concatenadas (1909 pb) amostradas para a espécie *Cichlasoma portalegreense*. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo. Os traços correspondem às diferenças mutacionais entre haplótipos. As cores referem-se às localizações, indicadas na legenda à direita.

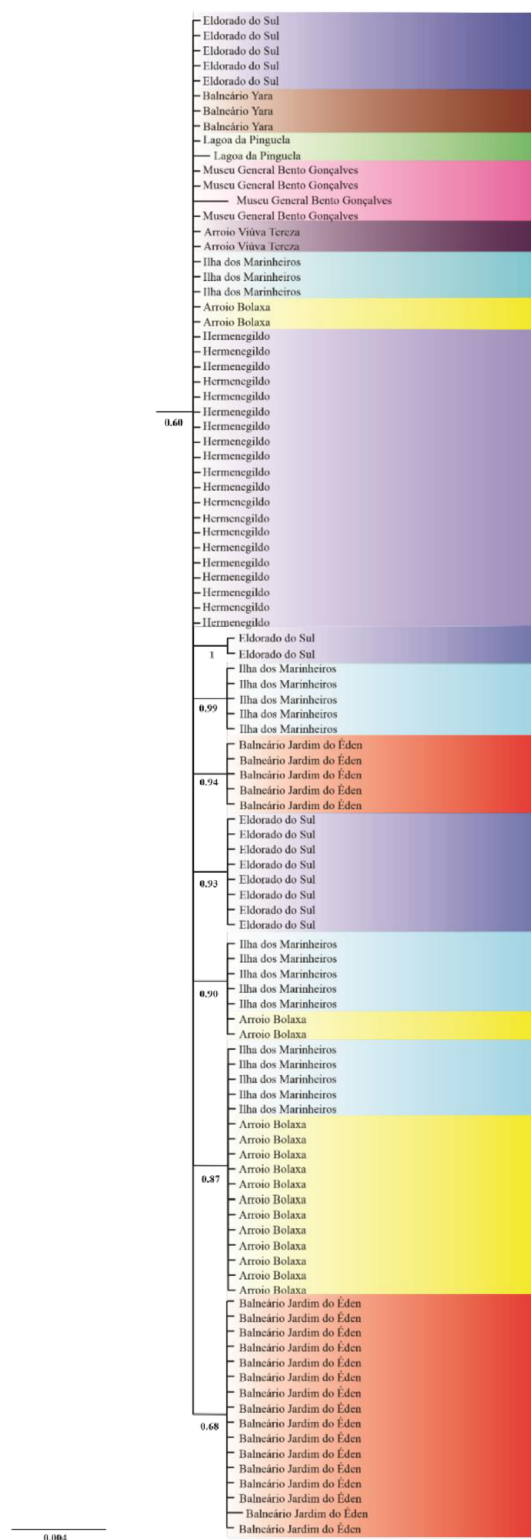


Fig. 7 Árvore filogenética obtida por Análise Bayesiana usando o marcador Cyt-b. Os valores ao lado de cada agrupamento representam valores de suporte, dados por valores de probabilidades posteriores. As cores referem-se às localizações. Esta árvore foi enraizada com sequências Cyt-b de *Cichlasoma dimerus* (KR150876.1), *Cichlasoma orientale* (KF894814.1), *Cichlasoma bimaculatum* (AF145128.1) e *Cichlasoma amazonarum* (AF370669.1).

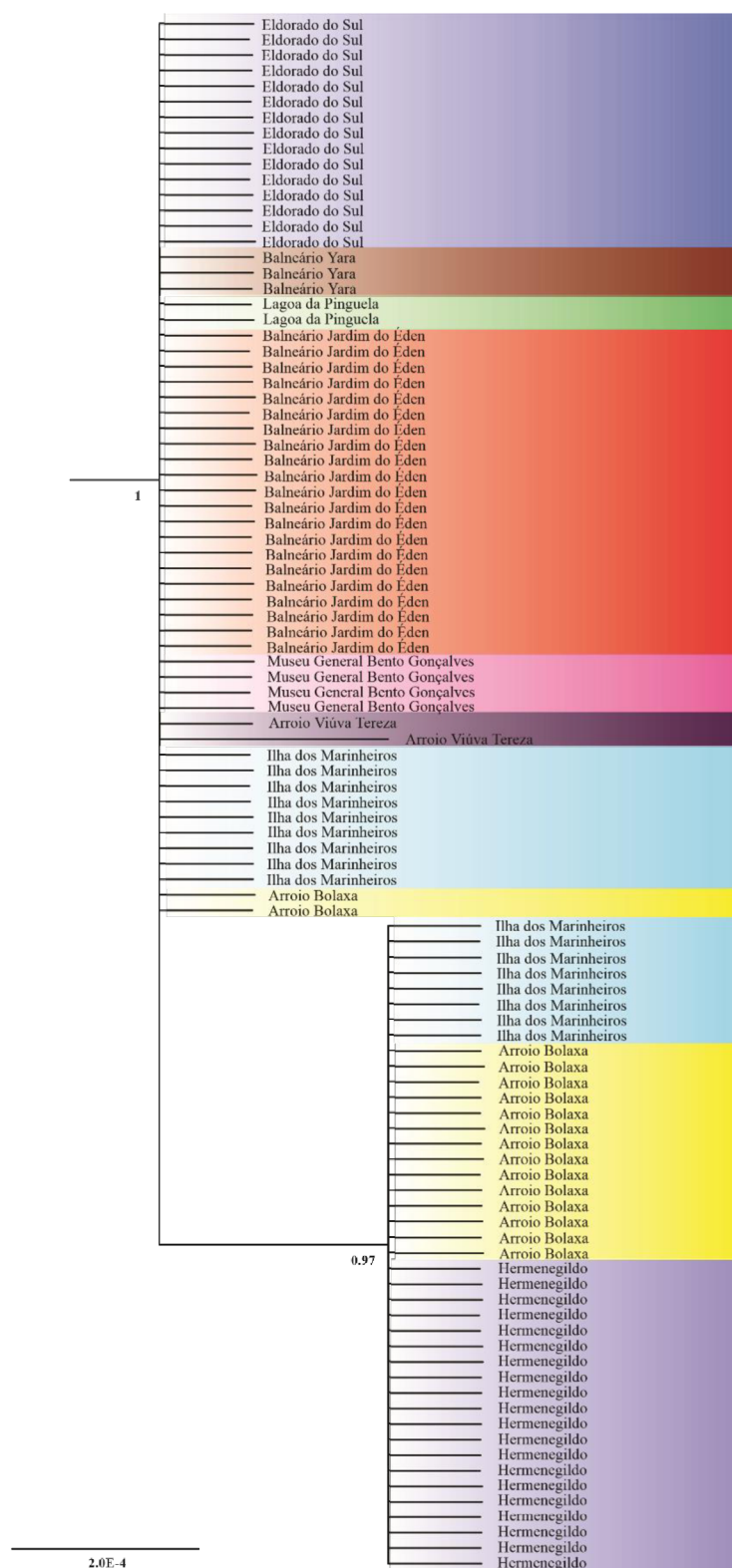


Fig. 9 Árvore filogenética obtida por Análise Bayesiana usando o marcador D-Loop. Os valores ao lado de cada agrupamento representam valores de suporte, dados por valores de probabilidades posteriores. As cores referem-se às localizações. Esta árvore foi enraizada com a sequência D-Loop de *Cichlasoma dimerus* (KR150876.1).

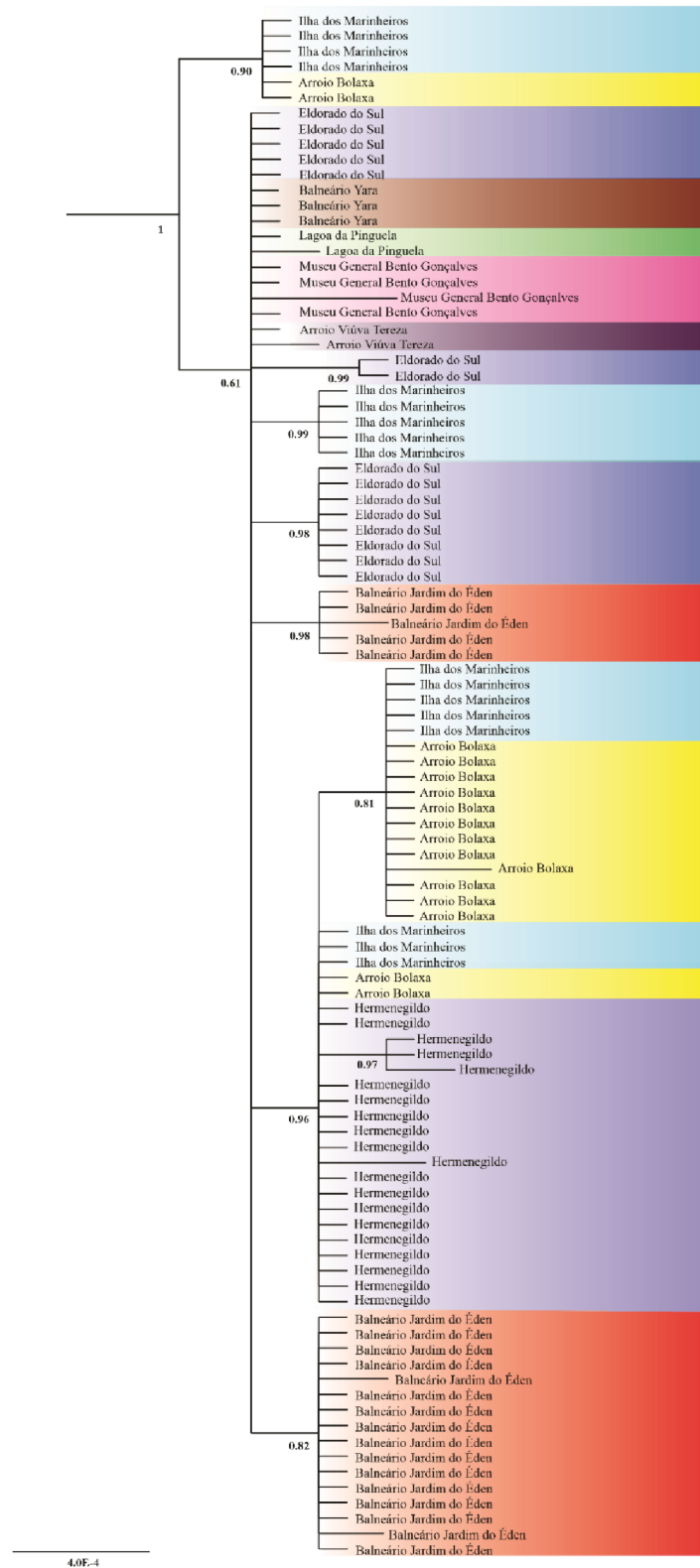


Fig. 10 Árvore filogenética obtida por Análise Bayesiana utilizando sequências concatenadas de Cyt-b, COI e D-Loop. Os valores ao lado de cada agrupamento representam valores de suporte, dados por valores de probabilidade posteriores. As cores referem-se às localizações. Esta árvore foi enraizada com sequências Cyt-b, COI e D-Loop de *Cichlasoma dimerus* (KR150876.1).

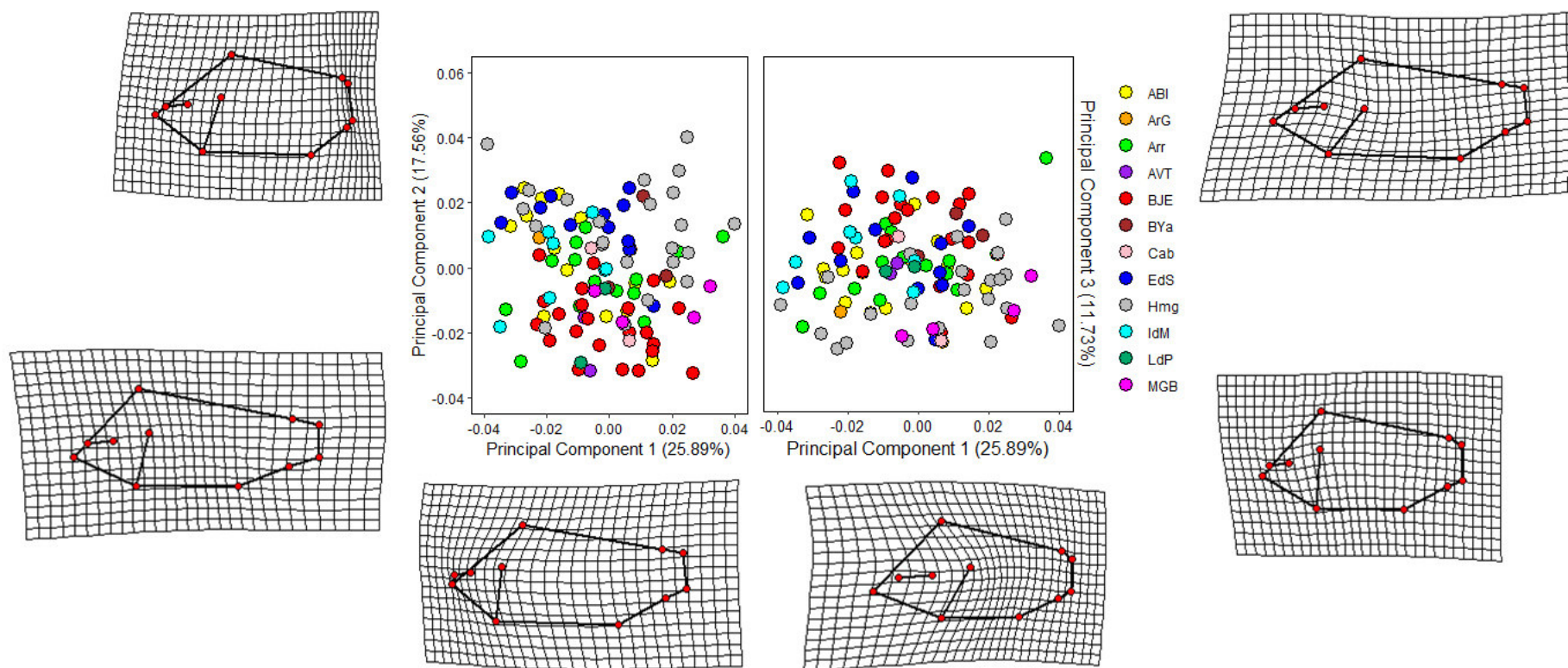


Fig. 11 Análise dos componentes principais da forma corporal independente do sexo, mostrando PC1 versus PC2 versus PC3. Para cada PC, a mudança de forma dos valores extremos de PC da forma média é representada por meio dos gráficos de peixes distorcidos na grade de deformação.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 1S Número de indivíduos utilizados para análise molecular (Mol) e morfométrica (Mor), apenas molecular ou apenas morfométrica. Número de indivíduos coletados para cada população da espécie *Cichlasoma portalegrense* (N = número de indivíduos).

Espécie	Bacias hidrográfica	Populações	Análises Mol/Mor	Apenas Mol	Apenas Mor	N	Coordenadas		Habitat
<i>C. portalegrense</i>	Tramandaí	Balneário Yara	3	-	-	3	29°24'29.30"S	49°47'13.13"W	Lêntico
		Lagoa da Pinguela	2	-	-	2	29°51'19.31"S	50°13'24.25"W	Lêntico
		Balneário Jardim do Éden	18	3	4	25	30° 5'36.25"S	50°10'23.09"W	Lótico
	Baixo Jacuí	Eldorado do Sul	10	5	4	19	30°5.00'27.87"S	51°40'36.64"W	Lêntico
	Camaquã	Museu General Bento Gonçalves	4	-	-	4	30°58'55.23"S	52° 1'2.30"W	Lêntico
		Arroio Viúva Tereza	2	-	-	2	31°21'24.64"S	52° 4'29.34"W	Lótico
		Arraial	-	-	15	15	32°0'33.89"S	52°15'25.76"W	Lêntico
	Piratini-São Gonçalo-Mangueira	Ilha dos Marinheiros	6	12	2	20	31°59'54"S	52°6'10"W	Lêntico
		Arroio Bolaxa	14	2	-	16	32° 9'44.44"S	52°11'15.93"W	Lótico
		Lagoa Caiúba	-	-	2	2	32°21'59.83"S	52°29'17.52"W	Lêntico
		Arroio Grande	-	-	3	3	32°20'18.73"S	52°49'20.20"W	Lêntico
		Hermenegildo	14	6	11	31	33°39'14.55"S	53°16'44.39"W	Lótico
	Total		73	28	41	142	-	-	-

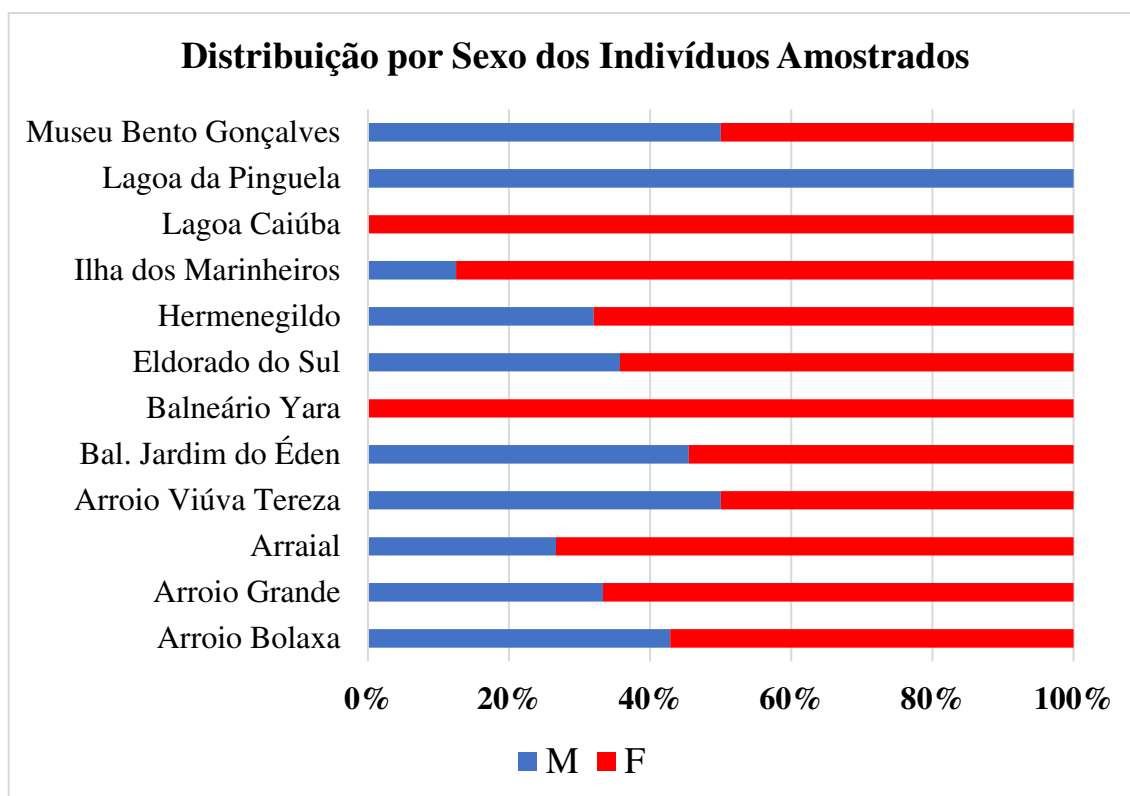


Fig. 1S Frequência de machos e fêmeas de *Cichlasoma portalegreense* para cada local de coleta.

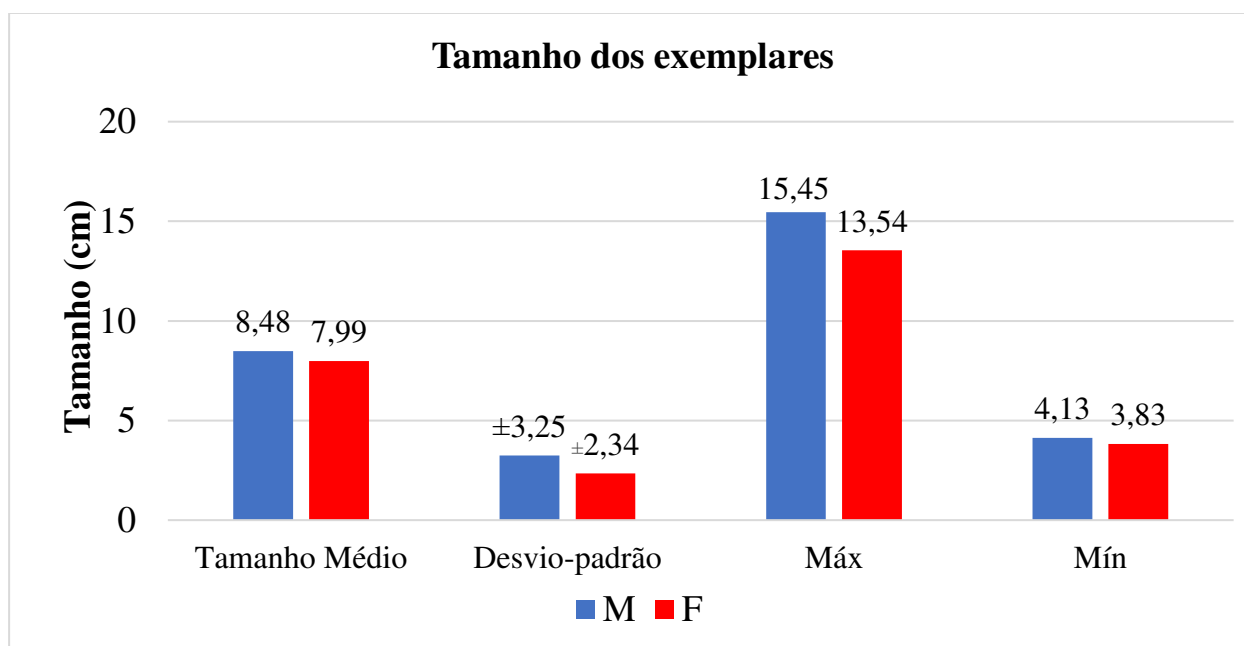


Fig. 2S Tamanho médio, desvio-padrão, máximo e mínimo para os espécimes de *Cichlasoma portalegreense*. Medidas em centímetros (cm).

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Este estudo é o passo inicial para a compreensão da diversidade, estrutura genética e variação da forma de *Cichlasoma portalegreense*. Aqui, unimos as informações obtidas através das análises com marcadores mitocondriais e morfometria geométrica para reforçar o entendimento dos processos evolutivos da espécie. Destaco que os resultados moleculares dos marcadores Cyt-b, COI e D-Loop revelaram padrões distintos para as diferentes populações e bacias hidrográficas amostradas. Para as análises morfométricas, aponto que as diferenças de forma foram bem acentuadas, principalmente em relação ao alongamento do corpo. Assim, essas mudanças fenotípicas podem estar associadas à variação genética ou plasticidade encontrada nas distintas populações, ou relacionadas às características/pressão do meio.

As análises do COI sugeriram baixa diferenciação genética entre as populações e bacias, padrão que resultou na ausência de diversidade críptica e presença de uma única unidade taxonômica. Diferente do encontrado para os marcadores Cyt-b e D-Loop, que indicaram maior diversidade genética. Para o Cyt-b, a análise de variância molecular (AMOVA), apontou que a variação genética está distribuída dentro e entre as populações, não entre bacias. Esse padrão mostrou que pode estar havendo uma redução do fluxo gênico entre os indivíduos dos diferentes locais, sugerindo assim. No entanto, para o D-Loop, a mesma análise, revelou que a variação foi significativa para os diferentes locais e bacias e AMOVA da matriz concatenada reafirmou que o isolamento é entre os diferentes locais. Com isso, tanto o isolamento em bacias como em locais é importante.

Desta forma torna-se importante uma maior compressão sobre a história de vida da espécie, para assim entender melhor como os processos naturais e antrópicos (por exemplo, fragmentação e perda dos habitats naturais) estão atuando na sua diversidade e estruturação genética.

Neste sentido, as perspectivas futuras deste estudo são:

- Aumento de amostragem para os locais (Balneário Yara, Lagoa da Pinguela, Museu General Bento Gonçalves e Arroio Viúva Tereza), que foram representados por poucos indivíduos.
- Amostrar a bacia do Litoral Médio
- Realizar análises com marcador nuclear
- Realizar análises moleculares e morfométricas para os diferentes regimes de fluxo de água (ambientes lênticos e lóticos).

ANEXOS

PARECER DE AUTORIZAÇÃO DO CEUA – FURG

COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL

Universidade Federal do Rio Grande
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PROPESP
ceua@furg.br <http://www.propesp.furg.br>

CE  A



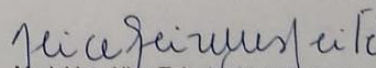
CERTIFICADO Nº P023/2020

Certificamos que o projeto intitulado "Diversidade genética e estrutura populacional de *Cichlasoma portalegreense* (Perciformes, *Cichlidae*) da Planície Costeira do Rio Grande do Sul", protocolo nº 23116.001839/2020-15, sob a responsabilidade de Adriana Gava - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE (CEUA-FURG), em reunião de 27 de maio de 2020 (Ata 006/2020).

A CEUA lembra aos pesquisadores que qualquer alteração no protocolo experimental ou na equipe deve ser encaminhada à comissão para avaliação e aprovação. Um relatório final deve ser enviado à CEUA no término da vigência do seu projeto.

CEUA Nº	Pq006/2020
COLABORADORES AUTORIZADOS A MANIPULAR OS ANIMAIS	Tamires Pereira Pintado
VIGÊNCIA DO PROJETO	31/12/2021
ESPÉCIE/ LINHAGEM / RAÇA	<i>Cichlasoma portalegreense</i>
NÚMERO DE ANIMAIS	300
PESO/ IDADE	Adultos e juvenis – 14 gramas
SEXO	Indiferente
ATIVIDADE(S)	(x) CAPTURA (x) COLETA DE ESPÉCIMES () MARCAÇÃO () OUTRAS:
ORIGEM	Bacias hidrográficas do Rio Tramandaí, Litoral Médio, Rio Camaquã e Rio Piratini – São Gonçalo – Manguieira
ENVIO DOS RELATÓRIOS PARCIAIS	Janeiro de 2021
ENVIO DO RELATÓRIO FINAL	Janeiro de 2022

Rio Grande, 02 de junho de 2020.


Med. Vet. Aline Teixeira Meirelles Leite
Coordenadora da CEUA-FURG

PARECER DE AUTORIZAÇÃO DO ICMBio



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISbio

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 76068-1	Data da Emissão: 18/11/2020 22:59:24	Data da Revalidação*: 18/11/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: TAMIRES PEREIRA PINTADO	CPF: 028.521.090-42
Título do Projeto: Diversidade genética e estrutura populacional de <i>Cichlasoma portalegreense</i> (Cichliformes, Cichlidae) da Planície Costeira do Rio Grande do Sul	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE ? FURG	CNPJ: 94.877.586/0001-10

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Extração de DNA	12/2020	05/2021
2	Análise de dados	01/2021	06/2021
3	Amplificação, purificação e sequenciamento	12/2020	07/2021
4	Coleta dos indivíduos	11/2020	04/2021

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Adriana Gava	Orientadora	558.433.790-00	Brasileira
2	Yan Gonçalves Gowert	Pesquisador associado	030.441.380-19	Brasileira

Observações e ressalvas

1	O pesquisador somente poderá realizar atividade de campo após o término do estado de emergência devido à COVID-19, assim declarado por ato da autoridade competente.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Esta autorização NÃO exige do pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0760680120201118

Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 76068-1	Data da Emissão: 18/11/2020 22:59:24	Data da Revalidação*: 18/11/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: TAMIREZ PEREIRA PINTADO	CPF: 028.521.090-42
Título do Projeto: Diversidade genética e estrutura populacional de Cichlasoma portalegrense (Cichliformes, Cichlidae) da Planície Costeira do Rio Grande do Sul	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE ? FURG	CNPJ: 94.877.586/0001-10

Observações e ressalvas

8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
---	---

Outras ressalvas

1	1. A capacidade atual do alojamento compartilhado do Parque Nacional da Lagoa do Peixe / ICMBio é de cinco pessoas. Caso haja interesse em usá-lo, solicita-se que o pesquisador faça o contato prévio com a sede da UC para agendamento e instruções através do e-mail (parna-lagoadopeixe.rs@icmbio.gov.br) 2. Quando houver saídas de campo durante a noite, solicita-se que seja avisada a Brigada Militar de Mostardas/RS para que a equipe não seja abordada por suspeita de abigeato. Assim como também a equipe do Parque Nacional da Lagoa do Peixe devido às atividades de fiscalização noturnas.	PARNA da Lagoa do Peixe
2	Para agendamento da coleta na UC, contatar a equipe pelo email esec-taim.rs@icmbio.gov.br ou esec.taim.rs@gmail.com ou ainda telefone (53) 3503-3151.	ESEC do Taim

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Parque Nacional da Lagoa do Peixe	RS	Pampa	Não	Dentro de UC Federal
2	Parque Estadual do Camaquã	Rio Grande-RS	Pampa	Não	Dentro de UC Estadual
3	Parque Estadual de Itapeva	Torres-RS	Pampa	Não	Dentro de UC Estadual
4	Diversas	Tramandaí-RS	Pampa	Não	Fora de UC Federal
5	Diversas	Camaquã-RS	Pampa	Não	Fora de UC Federal
6	Bolaxa	Rio Grande-RS	Pampa	Não	Fora de UC Federal
7	Ilha dos Marinheiros	Rio Grande-RS	Pampa	Não	Fora de UC Federal
8	Hermenegildo	Santa Vitória do Palmar-RS	Pampa	Não	Fora de UC Federal
9	Estação Ecológica do Taim	RS	Pampa	Não	Dentro de UC Federal
10	Refúgio de Vida Silvestre Banhado dos Pachecos	Rio Grande-RS	Pampa	Não	Dentro de UC Estadual

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0760680120201118

Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 76068-1	Data da Emissão: 18/11/2020 22:59:24	Data da Revalidação*: 18/11/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: TAMIRES PEREIRA PINTADO	CPF: 028.521.090-42
Título do Projeto: Diversidade genética e estrutura populacional de Cichlasoma portalegrense (Cichliformes, Cichlidae) da Planície Costeira do Rio Grande do Sul	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE ? FURG	CNPJ: 94.877.586/0001-10

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Fora de UC Federal
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Dentro de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Cichlasoma portalegrense	20

A quantidade prevista só é obrigatória para atividades do tipo "Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ". Essa quantidade abrange uma porção territorial mínima, que pode ser uma Unidade de Conservação Federal ou um Município.

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Método de captura/coleta (Peixes)	Armadilha (covo, manzuá, potes para polvos, substrato específico, manilha e variações), Rede de arrasto de praia: cerco de praia (tração manual), Puçá

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE ? FURG	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0760680120201118

Página 3/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 76068-1	Data da Emissão: 18/11/2020 22:59:24	Data da Revalidação*: 18/11/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: TAMIRES PEREIRA PINTADO	CPF: 028.521.090-42
Título do Projeto: Diversidade genética e estrutura populacional de Cichlasoma portalegreense (Cichliformes, Cichlidae) da Planície Costeira do Rio Grande do Sul	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE ? FURG	CNPJ: 94.877.586/0001-10

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0760680120201118

Página 4/4