

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos**  
**Trópicos**

**DENIS BRUNO SANTOS MARQUES NUNES**

**CONHECER PARA CONSERVAR: ACESSANDO A DIVERSIDADE GENÉTICA, COM  
DNA BARCODE, NA ICTIOFAUNA DO RIO SÃO FRANCISCO**

**MACEIÓ - ALAGOAS**  
**Fevereiro/2023**

**DENIS BRUNO SANTOS MARQUES NUNES**

**CONHECER PARA CONSERVAR: ACESSANDO A DIVERSIDADE GENÉTICA, COM  
DNA BARCODE, NA ICTIOFAUNA DO RIO SÃO FRANCISCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Conservação da Biodiversidade Tropical.

**Orientador: Prof. Dr. Uedson Pereira  
Jacobina**

**MACEIÓ - ALAGOAS  
Fevereiro/2023**

**Catálogo na Fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 - 1767

N972c Nunes, Denis Bruno Santos Marques.

Conhecer para conservar : acessando a diversidade genética, com DNA barcode, na ictiofauna do rio São Francisco / Denis Bruno Santos Marques Nunes. – 2023.  
78 f. : il.

Orientador: Uedson Pereira Jacobina.

Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos. Maceió, 2023.

Inclui bibliografias.

1. Peixes neotropicais. 2. DNA mitocondrial. 3. Diversidade genética. 4. linhagens crípticas. 5. Erros de identificação de espécies. I. Título.

CDU: 577.21

# Folha de aprovação

**Denis Bruno Santos Marques Nunes**

## **CONHECER PARA CONSERVAR: ACESSANDO A DIVERSIDADE GENÉTICA E EVOLUTIVA DA ICTIOFAUNA DO RIO SÃO FRANCISCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS na área da Biodiversidade.

Dissertação aprovada em 15 de fevereiro de 2023.

Documento assinado digitalmente  
 UEDSON PEREIRA JACOBINA  
Data: 23/02/2023 21:10:04-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr.<sup>(a)</sup> Uedson Pereira Jacobina/UFAL  
(orientador)

Documento assinado digitalmente  
 PABLO ARIEL MARTINEZ  
Data: 23/02/2023 16:46:48-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. <sup>(a)</sup> – Pablo Ariel Martinez

Documento assinado digitalmente  
 TAMI MOTT  
Data: 23/02/2023 15:14:17-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. <sup>(a)</sup> – Tamí Mott

Documento assinado digitalmente  
 KIM RIBEIRO BARAO  
Data: 21/02/2023 20:48:56-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. <sup>(a)</sup> – Kim Ribeiro Barão

MACEIÓ - AL

Fevereiro/2023

## DEDICATÓRIA

*À minha querida Mãe Adeliene Marques e aos meus queridos familiares, que amei muito e hoje os guardo na lembrança: Roberto Marques, Danielle Marques, Vicentina Marques, José Nunes e Maria José Ciqueira.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha Mãe Adeliene Marques, que sempre esteve ao meu lado, desde os momentos mais difíceis aos mais felizes. Seu apoio incondicional para o desenvolvimento do meu Mestrado me deu forças para prosseguir diante de alguns problemas que enfrentei durante este período. A Sra. desempenhou papel essencial em minha caminhada.

À Tia Quitéria Lima, minha segunda mãe, pelo amor, apoio e pela paciência e carinho ao me atender em incontáveis chamadas de vídeo.

Ao meu irmão Roberto Marques, e aos meus sobrinhos, Roberto Neto, Miguel Matheus e Lara Valentina, por tornarem minha vida mais leve.

Aos meus amigos Leyciane Costa, Rosângela Pereira, Rayane Pereira, Rayara Pereira, e Henrique Brito por sempre estarem ao meu lado, me aconselhando valiosamente e pelas boas risadas, lembrando que fora da Academia também há vida.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Uedson Jacobina, por todo o conhecimento e suporte científico a mim dispensados durante esses dois anos de Mestrado. Além disso, ao apoio humano irrestrito, a paciência e compreensão, importantes para minha formação.

Aos alunos/ex-alunos de Mestrado Alany Pontes, Leandro Ferreira e Carolina Lima do nosso lab (Laboratório de Sistemática Integrativa Molecular/LABSIM), que contribuíram para a execução deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Milene Silva, Jeferson Santos, Luciano Domingos, Carla Dias, Isabella Silva, Ruth Melo, Pedro Marques, Késia Ferreira e Tiago Santos, que foram bons colegas de trabalho durante esse último ano, devido ao convívio diário envolver conversas descontraídas e aos bons almoços no R.U.

Às meninas da cantina do Campus Arapiraca da UFAL, Renata Amorim e Geane Gomes. À Vera Melo, a moça do cuscuz, e à Elisângela Farias, que fornece ótimos lanches. A todas pelos ótimos momentos de descontração.

A todos os meus colegas de turma do Mestrado 2021 do PPG-DIBICT, em especial a Marciliano Silva, Juciélia Justino e Raíssa Pinto. Gratidão pela parceria, ação em unidade para a resolução de problemas e pelos conselhos durante as dúvidas e angústias, além das boas risadas em momentos de descontração. À turma do Programa de Desenvolvimento Estratégico (PDE) de Alagoas, principalmente ao aluno Jorge Izidro pela troca de experiências de vida, mesmo que à distância. Aos demais alunos que fazem o PPG-DIBIC, incluindo os representantes discentes Lúcia Santos e Diogo Lins, pelos conselhos e ajuda em momentos de aflição.

À Profa. Dra. Luisa Viegas, que me acompanhou no desenvolvimento de minha dissertação e produto social PDE, além de me aconselhar sobre questões acadêmicas.

À coordenação do PPG-DIBICT, antiga e atual, e à Julliene Castro, Secretária do Programa, por terem presteza e habilidade em lidar com questões burocráticas.

Aos órgãos de fomento à pesquisa que financiaram direta ou indiretamente este trabalho, representados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À Universidade Federal de Alagoas por fornecer toda a estrutura física e os recursos humanos necessários para o desenvolvimento do meu Mestrado.

*“The mind that opens to a new idea never  
returns to its original size.”*

Albert Einstein

## RESUMO

Localizado na América do Sul, o rio São Francisco (RSF), que percorre desde o Sudeste até o Nordeste do Brasil, é o 27º maior do mundo. Essa bacia hidrográfica é conhecida por sua diversidade e endemismo, com sua ictiofauna contendo registros de 178 espécies (60% endêmicas), mas devido a fatores antrópicos há espécies que passaram a ser consideradas vulneráveis, em perigo e criticamente em perigo de extinção. Há lacunas de conhecimento acerca do RSF, de modo que o conhecimento genético ainda é difuso e incipiente nos trechos do submédio (barramentos) e baixo (assoreado). Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo suprir déficits de conhecimento da biodiversidade, bem como avaliar a diversidade genética da ictiofauna do RSF, por meio de técnicas de DNA barcode. Foram avaliadas 90 espécies, 74 gêneros, 28 famílias e 6 ordens, incluindo os Characiformes (40 espécies), os Cyprinodontiformes (6 espécies), os Gymnotiformes (3 espécies), os Perciformes (4 espécies), os Siluriformes (36 espécies) e os Synbranchiformes (1 espécie). Foram identificados distintos padrões de divergência genética (DG):  $DG < 1\%$  (74 espécies ou 82.22%),  $1\% < DG < 2\%$  (8 espécies ou 8.89%) e  $DG > 2\%$  (8 espécies ou 8.89%). Além disso, foram detectados erros de identificação envolvendo três pares de espécies: *Cetopsorhamdia iheringi* e *Phenacorhamdia tenebrosa*; *Imparfinis mirini* e *I. minutus*; *Characidium fasciatum* e *C. gomesi*. Também foram encontrados alguns casos de complexos de espécies e advertências taxonômicas envolvendo os gêneros *Astyanax* e *Psalidodon*. Ainda foi verificada divergência genética profunda para as espécies *Pimelodella vittata*, *Synbranchus marmoratus*, *Rhamdia quelen*, *Piabina argentea*, *Gymnotus carapo*, *Hyphessobrycon santae* e *Pamphorichthys hollandi*. Tais resultados auxiliam na compreensão da sistemática e evolução da ictiofauna do RSF, considerando sua formação hidrogeológica. Espera-se que o conhecimento aqui gerado seja utilizado na elaboração e atualização de planos de manejo e conservação da ictiofauna do RSF.

**Palavras-chave:** Peixes Neotropicais, DNA mitocondrial, divergência genética, linhagens crípticas, erros de identificação, complexo de espécies.

## ABSTRACT

Located in South America, São Francisco River (SFR) is distributed from the Southeast to the Brazil Northeast, is the 27th largest river in the world. This watershed is known for its diversity and endemism, with its ichthyofauna containing records of 178 species (60% endemic), but due to anthropic factors there are species that have come to be considered vulnerable, endangered and critically endangered. There are gaps in knowledge about the SFR, so that genetic knowledge is still diffuse and incipient in the submiddle (dams) and lower (silted) stretches. In this context, the present study aimed to overcome knowledge of biodiversity deficits, as well as to evaluate the SFR ichthyofauna genetic diversity, applying DNA barcode techniques. We evaluated 90 species, 74 genera, 28 families and 6 orders, including Characiformes (40 species), Cyprinodontiformes (6 species), Gymnotiformes (3 species), Perciformes (4 species), Siluriformes (36 species) and the Synbranchiformes (1 species). Distinct genetic divergence (GD) patterns were identified:  $GD < 1\%$  (74 species or 82.22%),  $1\% < GD < 2\%$  (8 species or 8.89%) and  $GD > 2\%$  (8 species or 8.89%). Furthermore, identification errors involving three species pairs were detected: *Cetopsorhamdia iheringi* and *Phenacorhamdia tenebrosa*; *Imparfinis mirini* and *I. minutus*; *Characidium fasciatum* and *C. gomesi*. Some cases of species complexes and taxonomic warnings involving the genera *Astyanax* and *Psalidodon* were also found. Deep genetic divergence was also verified for the species *Pimelodella vittata*, *Synbranchus marmoratus*, *Rhamdia quelen*, *Piabina argentea*, *Gymnotus carapo*, *Hyphessobrycon santae* and *Pamphorichthys hollandi*. Such results help to understand the SFR ichthyofauna systematics and evolution, considering its hydrogeological formation. It is expected that the knowledge generated here will be used in the elaboration and updating of management and conservation plans for the ichthyofauna of the SFR.

**Key-words:** Neotropical fishes, mitochondrial DNA, genetic divergence, cryptic lineages, misidentifications, species complex.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Dissertação</b> .....	11
<b>Figura 1.</b> Efeitos da captura de cabeceiras na diversificação macroevolutiva em táxons aquáticos e ribeirinhos obrigatórios de peixes.....	23
<b>3 DNA barcode highlights taxonomic warnings and cryptic diversity of São Francisco river basin fishes, in the Neotropical region</b> .....	41
<b>Figura 1.</b> Mapa de amostragem da ictiofauna da bacia do rio São Francisco .....	73
<b>Figura 2.</b> Reconstrução filogenética bayesiana utilizando o gene <i>cox1</i> para as espécies dos gêneros <i>Astyanax/Psalidodon</i> da bacia do rio São Francisco .....	75
<b>Figura 3.</b> Gráfico de contorno mostrando a distribuição das divergências genéticas do <i>cox1</i> para as espécies da ictiofauna da bacia do São Francisco .....	76

## LISTA DE TABELA

<i>DNA barcode highlights taxonomic warnings and cryptic diversity of São Francisco river basin fishes, in the Neotropical region</i> .....	42
<b>Tabela 1.</b> DGIMAXs (Divergências Genéticas Máximas) de algumas espécies do RSF que são crípticas e de outras que apresentam estruturação populacional.....	79

# SUMÁRIO

<b>1 APRESENTAÇÃO</b> .....	11
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	13
2.1 Água doce, ictiofauna e ameaças antrópicas .....	13
2.2 DNA barcode e suas aplicações .....	15
2.3 Déficits de conhecimento da Biodiversidade .....	18
2.4 Diversificação da ictiofauna Neotropical continental .....	20
2.5 A bacia do rio São Francisco e seus trechos .....	22
2.6 Biogeografia do rio São Francisco.....	25
2.7 Bacia do São Francisco ameaçado pela atividade antrópica .....	29
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34
<b>3 DNA barcode highlights taxonomic warnings and cryptic diversity of São Francisco river basin fishes, in the Neotropical region</b> .....	41
<b>3.1 Introdução</b> .....	44
<b>3.2 Material e Métodos</b> .....	47
3.2.1 Coletas.....	47
3.2.2 Amostras de DNA, PCR e sequenciamento.....	48
3.2.3 Obtenção de sequências do RSF em bancos de dados de domínio público .....	48
3.2.4 Alinhamento, edição de sequências e cálculo de divergências genéticas intraespecíficas .....	49
3.2.5 Filtro de divergências genéticas intraespecíficas máximas (DGIMAXs)	
3.2.6 Métodos de delimitação de linhagens.....	49
<b>3.3 Resultados</b> .....	51
<b>3.4 Discussão</b> .....	53
3.4.1 Eficácia do DNA barcode .....	53
3.4.2 Erros de identificação de espécies.....	54
3.4.3 O caso do complexo de espécies <i>Astyanax/Psalidodon</i> .....	56
3.4.4 Divergências genéticas entre 1 e 2%.....	58
3.4.5 Biodiversidade oculta (divergências genéticas superiores a 2%).....	59
<b>3.5 Considerações Finais</b> .....	61
<b>CONCLUSÕES</b> .....	63
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64
<b>FIGURAS</b> .....	73
<b>MATERIAL SUPLEMENTAR</b> .....	79

# 1 APRESENTAÇÃO

Esta dissertação visa ampliar o conhecimento sobre a diversidade genética e evolutiva da ictiofauna do rio São Francisco (RSF). Sendo composta por mais de 170 espécies, essa ictiofauna neotropical de extremo valor ecológico, comercial e social vem sofrendo com o represamento das águas para abastecimento ou geração de energia elétrica, aliado ao assoreamento, poluição, introdução de espécies exóticas e transposição. Tais fatores têm causado extensos danos sobre RSF o que tem impactado a sua ictiofauna. As ações antrópicas e a falta de conhecimento genético acerca dessa ictiofauna dificultam o delineamento de medidas de manejo e conservação efetivas para essas espécies.

Na revisão de literatura, abordaram-se a definição de água doce e sua importância para a vida, as ameaças humanas à sua ictiofauna, o DNA barcode e suas aplicações, além das características da ictiofauna Neotropical continental e de sua diversificação. Ainda levou-se em consideração aspectos gerais sobre a bacia do RSF e seus diferentes trechos e da sua biogeografia, tratando de modificações do seu paleocurso. Discutiu-se também aspectos envolvendo a ictiofauna do RSF, ameaçada pela atividade humana.

Em seguida, apresentou-se o único capítulo dessa Dissertação, que corresponde ao artigo gerado por meio deste trabalho. Nesse contexto, o artigo visou preencher lacunas Linneana e Darwiniana, avaliando comparativamente as espécies da ictiofauna que habitam os diferentes trechos do RSF. Dessa forma, avaliou-se a divergência genética das espécies da ictiofauna do RSF, ao longo da sua extensão, por meio da técnica de DNA barcode (gene *cox1*). Essas informações poderão auxiliar no delineamento de medidas efetivas para um manejo e conservação adequados da sua ictiofauna. Dentre essas medidas, destaca-se a parceria acadêmico-científica entre instituições de pesquisa alagoanas com órgãos ambientais estaduais. Como resultado de tal parceria, por exemplo, têm-se a proposição de novos planos de manejo e conservação de unidades de

conservação do RSF, que ainda são escassos, além disso, visa auxiliar no conhecimento para estudos de repovoamento de espécies em risco de extinção.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Água doce, ictiofauna e ameaças antrópicas

A água é um dos recursos naturais mais valiosos para a biosfera, principalmente para a humanidade, permitindo a existência da vida e de importantes atividades econômicas para a espécie humana, sendo considerada um serviço ecossistêmico essencial (STEFFEN *et al.*, 2015). Sua importância é tão vital para o funcionamento dos organismos vivos que, em missões espaciais que procuram por vida em outros planetas, há uma busca intensa por evidências que possivelmente sinalizem para a existência desse recurso nesses locais (LINGAM & LOEB, 2020).

A água doce trata-se de um recurso ainda mais restrito e é de inestimável importância para as sociedades e os ecossistemas. A definição da água doce refere-se, quimicamente, a uma mistura homogênea que apresente concentração inferior a 500 ppm de sais dissolvidos. Quanto a sua capacidade de autorrenovação e finitude, a água doce trata-se de um recurso renovável, mas, de fato, finito (HOEKSTRA & MEKONNEN, 2012). Lagoas, rios, pântanos e planícies aluviais podem ser detentores de relevância histórica para a humanidade, seja por meio da produção de bens de consumo, ou pelo fornecimento de serviços ecossistêmicos essenciais para a existência humana e seu bem-estar (WANTZEN *et al.*, 2016). São diversos os serviços ecossistêmicos associados aos sistemas de água doce, dentre eles destacam-se: abastecimento de água, controle de qualidade da água, fornecimento de habitat, prevenção da erosão, abastecimento de alimentos, regulação do clima e recreação e turismo (HANNA *et al.*, 2018; KAVVAL, 2019).

Apesar dos sistemas de água doce serem essenciais para o ser humano, eles estão entre os mais ameaçados do mundo, com declínios globais que atingem 64% de sua extensão, ocorridos entre 1997 e 2011 (COSTANZA *et al.*, 2014). Os limites planetários que envolvem a água doce têm sido amplamente influenciados pela civilização global, que

está alcançando limiares superiores ao que a biosfera pode suportar (BOGARDI, FEKETE & VÖRÖSMARTY, 2013; STEFFEN *et al.*, 2015). A ação antrópica vem modificando a maneira com que as águas superficiais, subterrâneas e atmosféricas traçam seus percursos, isso do ponto de vista regional, levando a uma descaracterização da capacidade de resposta ambiental de ecossistemas aquáticos, ribeirinhos e costeiros (RODELL *et al.*, 2018). Desta forma, o ser humano tem impactado os sistemas de água doce em uma escala de multiestresse, caracterizada pela sua atividade em múltiplas frentes de pressão (BORGWARDT *et al.*, 2019).

Os ecossistemas de água doce destacam-se pela sua grande diversidade – um dos ambientes mais diversos do planeta – por unidade de volume de habitat na Terra. Esses ecossistemas contam com mais de 140.000 espécies de fungos, plantas, invertebrados e vertebrados (com apenas 12% de todas as espécies descritas), comprimidos em 1,70% da área de superfície mundial e em apenas 0,007% do suprimento total de água do planeta Terra (REID *et al.*, 2019). Os riscos para essa rica biodiversidade e para esses ecossistemas são cada vez mais crescentes e incluem alteração de hábitat, poluição das águas, sobrepesca, introdução de espécies exóticas, desvios de rios, fragmentação e regulação do fluxo de água, expansão de paisagens agrícolas e urbanas, mudanças climáticas, aumento do nível do mar e regimes alterados de precipitação (DUDGEON, 2019; GRILL *et al.*, 2019).

Dentro desse cenário negativo, a ictiofauna destaca-se como um dos componentes da biodiversidade que tem sido particularmente ameaçado pelas atividades antrópicas. Os peixes da América do Sul têm sofrido extensamente com processos envolvendo cadeias produtivas humanas, tais como: a introdução de espécies exóticas e alteração ambiental (pesca, aquicultura, represamento, desmatamento e poluição), sendo a poluição a ameaça mais recorrente (BEZERRA *et al.*, 2019). As retiradas e os desvios de águas, em conjunto com a atividade agrícola mundial em plena expansão, traçam rumos destruidores quando trata-se da disponibilidade e qualidade de água doce (DESTOUNI *et*

*al.*, 2013; DESTOUNI & JARSJÖ, 2018; JARAMILLO & DESTOUNI, 2015). Além disso, a fragmentação e a regulação do fluxo das águas constituem ameaças à ictiofauna (WINEMILLER *et al.*, 2016).

## **2.2 DNA barcode e suas aplicações**

Diante dos efeitos das atividades humanas, faz-se necessária a busca por estratégias de conservação que visem minimizar o impacto humano sobre a biodiversidade de peixes de água doce. Portanto, a correta identificação das espécies é o primeiro passo para mitigar os efeitos da ação humana. Como alternativa financeira e metodologicamente viável para a identificação de espécies da ictiofauna de água doce, existe a técnica de DNA barcode. Essa metodologia vem destacando-se como um método genético rápido e preciso utilizado para a identificação de espécies, inclusive as crípticas, muitas vezes não detectadas por métodos tradicionais (AZEVEDO *et al.*, 2021; MATTOX *et al.*, 2021; REIA, OLIVEIRA & BENINE, 2021).

Quatro gargalos, que estão nas bases da taxonomia exclusivamente morfológica, suscitaram o desenvolvimento da técnica do DNA barcode: a plasticidade fenotípica e a variabilidade genética, envolvendo caracteres empregados para o reconhecimento de espécies, podem levar a erros de identificação; ineficiência na detecção de diversidade críptica, aquela que considera espécies geneticamente diferentes, mas morfológicamente indistinguíveis; chaves taxonômicas morfológicas não consideram, muitas vezes, a amplitude de formas de estágios de vida e gênero das espécies; nível elevado de especialização para utilizar corretamente as chaves taxonômicas morfológicas. (HEBERT *et al.*, 2003).

O DNA barcode trata-se de uma metodologia de taxonomia molecular, voltada para o diagnóstico de Unidades Moleculares Taxonômicas Operacionais (do inglês, *Molecular Operational Taxonomic Units/MOTUs*) (BLAXTER *et al.*, 2005). MOTUs tratam-se de um

conjunto de sequências genéticas que compartilham certo grau mínimo de similaridade, o que traz significado biológico para a correlação entre tais sequências. Inicialmente, as MOTUs eram conhecidas por filotipos ou genoespécies, e seu conceito foi estabelecido com o intuito de manter-se a descrição quanto à nomenclatura das espécies previamente existentes (BLAXTER, 2004). Por definição, as MOTUs permanecem em um status taxonômico que requer cuidado quanto à análise da diversidade ecológica e estudos populacionais. As MOTUs podem sugerir espécies novas, quando as análises citadas anteriormente aliam-se a estudos de traços morfofuncionais, ou ainda cladísticos. Essa área é conhecida como taxonomia integrativa, que faz uso de diferentes abordagens ( ex: genética, morfologia e ecologia entre outros), que nos últimos anos vem crescendo de forma vertiginosa (DAYRAT, 2005; GOLDSTEIN & DESALLE, 2011; ZAMANI *et al.*, 2022).

O protocolo do DNA barcode nasce com o uso do gene mitocondrial do citocromo oxidase subunidade I (*cox1*) para a identificação de 200 espécies da ordem Lepidoptera (HEBERT *et al.*, 2003). Essa técnica tem particularidades que a tornam única para fins de atribuição de MOTUs, indicando o possível diagnóstico de espécies. Em primeiro lugar, a similaridade da técnica com o conceito por trás dos Códigos Universais de Produto. Desse modo, considerando os quatro nucleotídeos do DNA para a pesquisa de apenas 15 posições nucleotídicas, poderia resultar em 1 bilhão de códigos (HEBERT *et al.*, 2003). Em segundo lugar, o DNA barcode pode ser utilizado mesmo com a composição de nucleotídeos em sítios da terceira posição sendo, com frequência, fortemente enviesada. Portanto, a análise de um fragmento de 90 pares de base alcançaria a estimativa de 1 bilhão ( $2^{30}=4^{15}$ ) de alternativas, mesmo que o conteúdo GC apresentasse uma proporção de 1, (HEBERT *et al.*, 2003; PARVATHY *et al.*, 2022). Em terceiro lugar, o DNA barcode é suportado por registros fósseis e estudos moleculares que diagnosticam táxons (GISMONDI *et al.*, 2012; SHIRAK *et al.*, 2013; GODUNKO *et al.*, 2022). Por exemplo, espécies que acumulem mutações a uma taxa de 2% por milhão de ano, em uma região do genoma com 600 pb, apresentaram 12 mutações, ao final um milhão de ano. Sendo

assim, as diferenças acumulam-se em um grau detectável pelo DNA barcode, ao longo de milhares de anos (HEBERT *et al.*, 2003).

As regiões do genoma utilizadas para o diagnóstico de espécies, via DNA barcode, podem variar de acordo com o organismo utilizado. Para metazoários o gene *cox1*, que corresponde a um fragmento do genoma mitocondrial de 650 bp, tem sido escolhido (MEYER & PAULAY, 2005). Contudo há outros marcadores também utilizados para metazoários, incluindo o gene mitocondrial *D-loop*, e os genes nucleares Rag1 e Rag2 (do inglês, *Recombination activating 1 e 2*) (GUO *et al.*, 2022; LYRA *et al.*, 2017). O nível de acurácia do diagnóstico de espécies em potencial, utilizando-se o *cox1*, está intimamente associado à ideia de que a diversidade genética intraespecífica verificada para essa região é inferior àquela observada a nível interespecífico (MEYER & PAULAY, 2005). Tal ideia, está conectada à existência exclusiva de monofiletismo recíproco entre as espécies em questão (KEKKONEN & HEBERT, 2014; MEYER & PAULAY, 2005).

Para o DNA barcode, a utilização do gene *cox1* é fundamentada em características atreladas ao seu funcionamento e evolução. O *cox1* é um gene codificador de proteína, o que garante que grande parte das modificações na terceira posição do códon sofra discretamente com a seleção, devido à degenerescência quádrupla nessa posição (HEBERT *et al.*, 2003). Genes desse tipo apresentam, na terceira posição do códon, uma alta incidência de substituições de bases, levando a uma taxa de evolução molecular que é cerca de três vezes maior do que a dos genes 12S ou 16S que são codificadores de RNA ribossomal, por exemplo (KNOWLTON & WEIGT, 1998). O *cox1* está inserido no genoma mitocondrial, e em metazoários, este é um alvo eficiente para a taxonomia molecular, devido à ausência de íntrons, à baixa taxa de recombinação e a sua herança matrilinear haploide (SACCONE *et al.*, 1999). Terceiro, os primers utilizados para a amplificação da região do *cox1* apresentam universalidade para quase todos os filos conhecidos (HEBERT *et al.*, 2003). De fato, o *cox1* tem-se mostrado eficiente para além

da discriminação de espécies, sugerindo a ocorrência de grupos filogeográficos, no âmbito da existência de uma espécie antes considerada conspícua (GARCEZ *et al.*, 2020).

### **2. 3 Déficits de Conhecimento da Biodiversidade**

Atualmente a Biologia lida com questões importantíssimas, que consistem em lacunas ou déficits de conhecimento, tais como: quantas espécies existem no planeta? Onde elas estão distribuídas? Sendo assim, a completude acerca do conhecimento de qualquer característica da biodiversidade é algo quase que impraticável, uma vez que ocorre uma complexa interação entre a distinta dinâmica temporal e espacial da natureza e a capacidade humana de pesquisá-la (LADLE & HORTAL, 2013).

Os déficits de conhecimento da biodiversidade podem ser definidos como as lacunas entre o conhecimento realizado/existente e o conhecimento completo dentro de um domínio biológico em um determinado momento no tempo, normalmente os dias atuais (HORTAL *et al.*, 2015). Tal trabalho indica a existência de sete déficits de conhecimento da biodiversidade, são eles: Linneano (descrição de espécies), o Wallaceano (distribuição geográfica), o Prestoniano (populações), o Darwiniano (evolução), o Raunkiæran (traços funcionais e funções ecológicas), o Hutchinsonian (tolerâncias abióticas) e o Eltoniano (interações ecológicas). Contudo o presente trabalho irá concentrar-se em três deles: o déficit Linneano, que refere-se à discrepância entre as espécies descritas formalmente e o número de espécies que realmente existem, de modo que a maioria das espécies na Terra não foi descrita e catalogada, sendo que este déficit compreende também espécies extintas (HORTAL *et al.*, 2015); o déficit Wallaceano, que aborda a falta de conhecimento acerca da distribuição geográfica das espécies, considerando que para a maioria das espécies ele é incompleto, além de ser inadequado em todas as escalas, na maioria das vezes (LOMOLLINO, 2004); e o déficit Darwiniano, que é conceituado como a falta de conhecimento sobre a árvore da vida e a evolução das espécies e suas relações filogenéticas (DINIZ-FILHO *et al.*, 2013). As deficiências de conhecimento são mais

pronunciadas para certos grupos, em detrimento de outros, como é o caso de animais aquáticos que não têm sido avaliados com o mesmo desempenho que seus correspondentes terrestres (LÉVÊQUE *et al.*, 2005; SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2008).

O déficit Linneano ainda é desconhecido, como afirma HORTAL *et al.*, (2015), sendo essencial identificar a diversidade críptica para abordar essa lacuna, diminuindo os efeitos da perda de biodiversidade. Sabe-se que as espécies com distinção fenotípica clara são mais facilmente identificáveis, o que amplia sua taxa de identificação, se comparadas às espécies crípticas (RIDDLE *et al.*, 2011). Desse modo, esse déficit de conhecimento é ainda maior para espécies morfologicamente semelhantes. Assim, estudos com o DNA barcode têm contribuído para o estreitamento da lacuna de conhecimento Linneana (AZEVEDO *et al.*, 2021; MATTOX *et al.*, 2021; REIA, OLIVEIRA & BENINE, 2021).

O déficit Darwiniano trata das dificuldades concernentes à adesão de filogenias na prática conservacionista da biodiversidade. São descritos três componentes intimamente associados nessa lacuna de conhecimento: a ausência de filogenias resolutivas para a maior parte dos grupos de organismos; o conhecimento restrito acerca dos comprimentos dos ramos, além das deficiências em calibrações de tempo absoluto; e o fator mais crítico, modelos evolutivos desconhecidos que possam associar tais filogenias a características ecológicas e à variação da história de vida (DINIZ-FILHO *et al.*, 2013).

A falta de filogenias abrangentes revela que para a maioria dos grupos de organismos, as relações filogenéticas entre as espécies são pouco conhecidas e só foram estabelecidas principalmente para algumas espécies que representam táxons superiores. Além disso, mesmo quando as relações entre todas as espécies em um clado foram estimadas, existem muitas incertezas em topologias, comprimentos de ramos e calibração de tempo. Mesmo quando as filogenias são conhecidas com baixa incerteza em todos os aspectos, há uma falta de conhecimento sobre como as características evoluíram e como

os processos evolutivos criam padrões mais complexos que não podem ser descritos apenas por relações filogenéticas. Dessa forma, tais componentes podem ser resolvidos, simultaneamente, ampliando o conhecimento biológico e a capacidade bioinformática (DINIZ-FILHO e al., 2013).

## **2.4 Diversificação da ictiofauna Neotropical continental**

A região Neotropical, que compreende desde o México até o sul da América do Sul e adicionalmente as Índias Ocidentais, corresponde a uma das regiões de maior riqueza de espécies do nosso planeta (ANTONELLI *et al.*, 2018; MORRONE, 2014). Diversos biomas e habitats diferentes compõem a região Neotropical, como florestas sazonalmente secas, zonas áridas, campos de altitude, sistemas montanhosos jovens e antigos e extensas florestas tropicais, como a Mata Atlântica e a Amazônia (HOORN *et al.*, 2010).

A região Neotropical é composta por 44 ecoregiões de água doce, uma vez que os sistemas aquáticos continentais da Terra foram categorizados em ecoregiões biogeográficas, de acordo com os padrões de composição e distribuição de sua ictiofauna (ABELL *et al.*, 2008). Assim, a ictiofauna Neotropical continental (INC), ou de água doce, apresenta uma grande diversidade (ALBERT & REIS, 2011; REIS *et al.*, 2016), que tem sido investigada por estudos moleculares, com o gene *cox1*, abordando sua sistemática e seus processos evolutivos (JACOBINA *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2013; RAMIREZ *et al.*, 2017).

A América do Sul destaca-se como o centro da diversidade da INC (ALLEN & PAVELSKY, 2018). Do total de 33,700 espécies de toda a ictiofauna do planeta Terra, 5,160 (15.3%) pertence à INC, que está classificada em 739 gêneros, 69 famílias e 20 ordens (REIS *et al.*, 2016). Sabe-se que aproximadamente 4,100 espécies (80%) dessa ictiofauna, concentram-se nas ordens Characiformes, Siluriformes e Perciformes (REIS *et*

*al.*, 2016). Contudo, a totalidade estimada de espécies está em torno de 3,000 a 4,000 espécies, que ainda não foram descritas e catalogadas (REIS *et al.*, 2016).

Os dados de biodiversidade da INC, para a América do Sul, indicam um padrão complexo de diversificação das espécies, seguindo um modelo duplo de museu/berço evolutivos (ALBERT *et al.*, 2011). O modelo de museu é aplicável a diversos táxons da INC da América do Sul, nos planaltos dos escudos brasileiros e das Guianas, durante o Paleógeno. Já o modelo de berço é consistente com a diversificação desses mesmos clados durante o Neógeno, em bacias tropicais de terras baixas (ALBERT *et al.*, 2011).

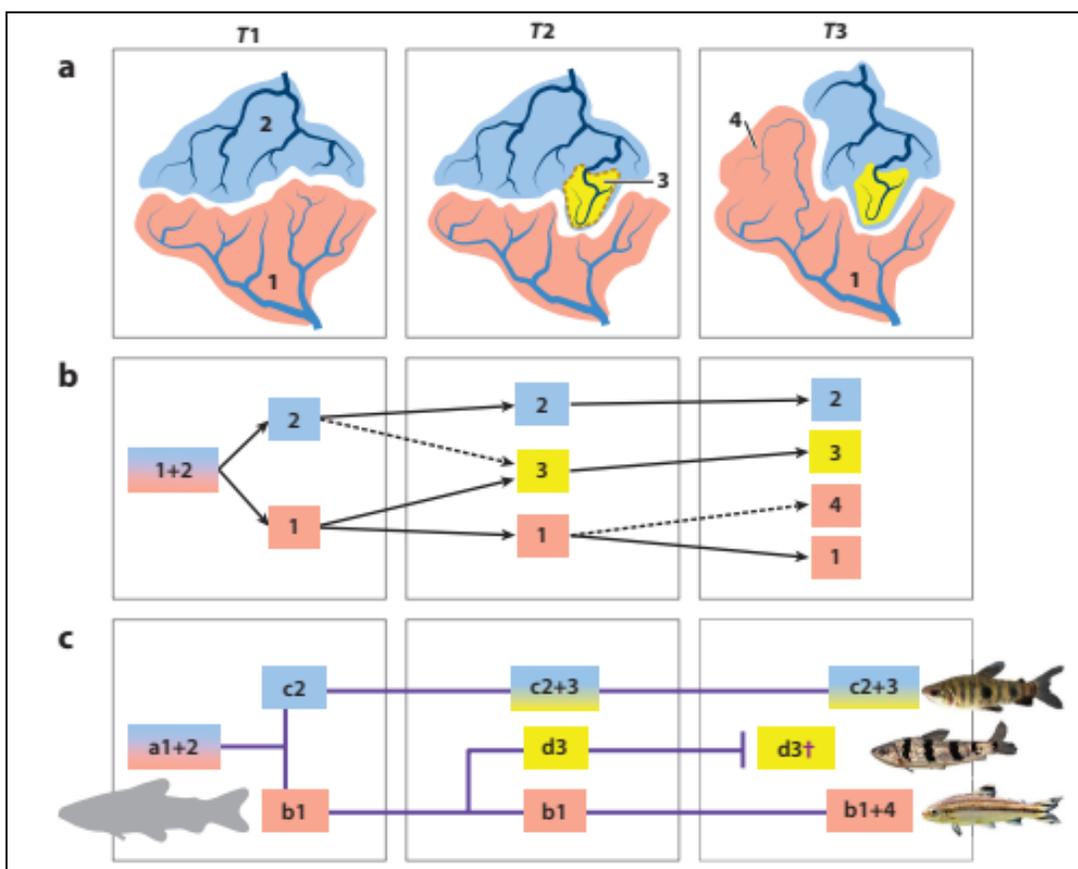
Na América do Sul, o modelo duplo de museu/berço explica com eficiência a grande diversidade de espécies de peixes de água doce, considerando o enorme endemismo em bacias hidrográficas periféricas. Suas elevadas taxas de diversificação estão relacionadas à especiação alopátrica. Desse modo, a alopatria teria ocorrido em função da distribuição espacial das bacias hidrográficas, devido às redes dendríticas fragmentadas. Soma-se a isso, um considerável histórico de capturas de cabeceiras, que ocorreu ao longo de dezenas de milhões de anos, fragmentando de maneira episódica, e fundindo trechos de rios adjacentes (ALBERT *et al.*, 2018; ALBERT & ANTONELLI, 2017; ALBERT, VAL & HOORN, 2018; MACHADO *et al.*, 2018; TAGLIACOLLO *et al.*, 2015; THOMAZ *et al.*, 2019). A origem da diversidade da INC sul-americana está associada a um modelo de radiação continental, cuja especiação se dá via alopatria, majoritariamente, ao invés de radiação adaptativa. De acordo com tal modelo, as radiações continentais ocorreriam sob um desacoplamento entre especiação e adaptação. Os fatores que levaram a essas radiações seriam a influência perene da captura de cabeceiras e a oscilação do nível do mar, que fragmentaram e mesclaram diferentes regiões ribeirinhas próximas (ALBERT *et al.*, 2020).

A captura de cabeceiras, corresponde a um processo geomorfológico atuante de maneira perene em todas as superfícies continentais. Esse processo tem implicações biogeográficas, pois modifica os limites entre rios próximos, ao passo que separa e funde seus trechos e as biotas que ali residem (Fig. 1) (ALBERT, *et al.*, 2017). A captura de cabeceiras portanto, tem relevância na diversificação evolutiva de táxons aquáticos e ribeirinhos obrigatórios (ALBERT *et al.*, 2018; MUSHER *et al.*, 2019; TAGLIACOLLO *et al.*, 2015). Ao fragmentar bacias hidrográficas anteriormente conectadas, a captura de cabeceiras fracciona as áreas geográficas dos táxons, ampliando o isolamento genético entre as populações e, conseqüentemente as taxas de especiação e extinção (ALBERT, TAGLIACOLLO & DAGOSTA, 2020). Ainda, devido à fusão de determinadas porções da rede de drenagem, a captura de cabeceiras também facilita a dispersão entre as populações, reduzindo o isolamento genético, retardando, portanto, as taxas de especiação e extinção (ALBERT *et al.*, 2020). A captura de cabeceiras é tão eficaz na condução da diversificação de táxons aquáticos e ribeirinhos obrigatórios, que geralmente esses grupos apresentam variação genética mais ampla entre as populações distribuídas em uma paisagem dendrítica, em oposição à euclidiana (FAGAN, 2002)

## **2.5 A bacia do rio São Francisco e seus trechos**

O RSF está inserido na América do Sul, mais especificamente entre o Sudeste e o Nordeste do Brasil, sendo o 27º maior do mundo (BEST, 2018), ele conta com uma área de aproximadamente 700,000 km<sup>2</sup>, e possui vazão média de 2,850 m<sup>3</sup>/s. Trata-se de uma bacia hidrográfica de grande relevância socioeconômica, sendo avaliada como a bacia da integração nacional, uma vez que drena cinco estados (Minas Gerais, Bahia, Goiás, Pernambuco, Sergipe e Alagoas, além do Distrito Federal, representando 7,5% do território brasileiro) (KNOPPERS *et al.*, 2005). Além disso, o RSF atravessa uma variedade de biomas, climas (incluindo o semiárido), paisagens e níveis socioeconômicos em toda a sua extensão. Os recursos hídricos do RSF têm aplicações em diversas

atividades humanas, tais como geração de energia, irrigação, abastecimento urbano/industrial de água, navegação, agricultura e aquicultura (O'HANLEY *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2014). Além disso, as áreas de várzea da bacia do RSF proveem uma das mais importantes regiões de pesca do interior do Brasil (SATO & GODINHO, 2004).



**Figura 1.** Efeitos da captura de cabeceiras na diversificação macroevolutiva em táxons aquáticos e ribeirinhos obrigatórios de peixes.  $T1-T3$  são etapas de tempo 1-3. (a) As regiões coloridas indicam diferentes áreas geográficas, como bacias hidrográficas e barreiras de dispersão. (b) Alteração dos padrões de conectividade de área hidrográfica ao longo do tempo. As setas sólidas indicam a área de eventos de vicariância; setas

tracejadas indicam eventos de geodispersão. (c) Filogenia hipotética de peixes na paisagem evolutiva. As espécies são indicadas por letras e as áreas por números. A cruz roxa denota espécies extintas. Observe em *T2* a origem alopátrica concordante das espécies d na área 3 e a expansão do alcance da espécie c na área 3, de modo que as espécies c e d sejam simpátricas, mas não espécies irmãs. Observe também em *T3* a expansão do alcance da espécie b na área 4, a extirpação da espécie c na área 4 e a extinção de espécie d com distribuição restrita. Figura obtida de ALBERT, TAGLIACOLLO & DAGOSTA, 2020.

A bacia do RSF compreende distintos regimes climáticos, além de perpassar por diversas paisagens fisiográficas, e é tradicionalmente dividida nos trechos alto, médio, submédio e baixo (Fig. 2) (KNOPPERS *et al.*, 2005). A região do alto RSF compreende desde a nascente, na Serra da Canastra (MG), até a cidade de Pirapora (MG), correspondendo a 19% da área da bacia; o médio RSF se estende de Pirapora (MG) à Remanso (BA), equivale a 50% da bacia; o submédio RSF vai de Remanso (BA) à Paulo Afonso (BA) (24% da bacia); e o baixo RSF equivale à região de Paulo Afonso (BA) à foz, entre os estados de Alagoas e Sergipe (7% da bacia) (PEREIRA *et al.*, 2007).

A nascente do RSF origina-se na Serra da Canastra, de modo que o alto RSF alcança a cidade de Pirapora (MG), precedendo a convergência com o Rio das Velhas. Nesse trecho o RSF pode ser identificado pelo seu leito rochoso, correndo em vale entrincheirado, com desenvolvimento local de estreita planície aluvial (<2 km). O médio RSF trata-se de um longo trecho, com planície fluvial de bom desenvolvimento, alcançando larguras que vão desde 2 a 16 km, apresentando, em geral, maiores larguras a jusante (norte). Esse trecho é semi-árido, possuindo aridez crescente ao norte, cuja predominância vegetacional é da Caatinga. O submédio RSF tem como ponto principal a cachoeira de Paulo Afonso (BA), que originalmente tinha 80 m de altura, mas que agora está parcialmente coberta pelas águas do reservatório da hidrelétrica de Paulo Afonso. O

submédio RSF está sob influência do semiárido, cuja vegetação predominante é a da Caatinga e o regime pluviométrico não ultrapassa os 500/mm anuais (MESCOLOTTI *et al.*, 2021).

O baixo RSF possui leito rochoso na maior parte de seu comprimento, havendo o surgimento de uma planície fluvial nos últimos 70 km. A descarga fluvial apresenta grande amplitude de variação ao longo dos anos, pois há secas sazonais, de modo que a média a longo prazo alcança algo em torno de 3.000 m<sup>3</sup>/s. Antes de alcançar o Oceano Atlântico, o RSF alcança paisagens repletas de planícies costeiras subparalelas que ocorrem em ambas as margens, parcialmente cobertas por dunas eólicas do Holoceno (DOMINGUEZ, 1996; BARBOSA E DOMINGUEZ, 2004)

## **2.6 Biogeografia do rio São Francisco**

Os principais sistemas fluviais sul-americanos iniciaram sua gênese com o rompimento do Gondwana, há aproximadamente 90 milhões de anos atrás. Contudo, grande parcela dos rios somente alcançou seu status moderno em períodos mais recentes, após sofrer forte influência do período de soerguimento dos Andes no Mioceno-Pleistoceno médio (HOORN *et al.*, 1995; LUNDBERG *et al.*, 1998). Dessa forma, devido à tectônica de compressão, pressupõe-se que a orogenia andina, ao passo que promoveu a ruptura, também originou a coalescência do assoalho fluvial (LUNDBERG *et al.*, 1998). Além disso, a flutuação do nível do mar e as mudanças climáticas atuaram também no sentido de gerar mudanças das conexões entre os rios (ALBERT, PETRY, & REIS, 2011).

O aparecimento do sistema hidrográfico do RSF é muito antigo, remetendo ao rompimento do Gondwana (POTTER, 1997; RIBEIRO, 2006). Entre as cabeceiras adjacentes desta bacia há um sistema de falhas geológicas reconhecido por Descontinuidade Crustal do Alto São Francisco (DCARSF), cuja atividade tectônica é recorrente desde o Pré-Cambriano (BUCKUP, 2011). Com as contínuas reativações da

DCARSF, supõe-se que as capturas de cabeceiras constituam relevantes eventos de diversificação para os gêneros *Salminus* e *Hyspostomus* (MONTROYA-BURGOS, 2003), além de alguns Characiformes (HUBERT & RENNO, 2006).

Poucos trabalhos relatam a história geológica do rio, sendo de acesso limitado em função da idade, raridade e idioma. Discute-se que o rio tem origem no período Cretáceo, contudo o atual curso iria em direção a um pequeno deslocamento Plio-Pleistoceno, após uma trajetória anterior, pelos rios Vaza-Barris ou Itapicuru (KING, 1957). Outra hipótese envolvendo mudanças de curso na bacia do RSF é a de uma modificação muito mais antiga e importante, que afirma que ele teria inicialmente se deslocado para o norte, por meio de um trecho linear próximo ao rio Parnaíba, alcançando o Atlântico Norte (GRABERT, 1968). Dados genômicos da rã sibiladora brasileira revelam que tal drenagem passou, então, por mudanças para o leste, modificando seu curso para uma estrutura em forma de cotovelo. Isso teria ocorrido na altura de Remanso, desembocando no Atlântico Sul (possivelmente pelos rios Vaza-Barris ou Itapicuru) (THOMÉ *et al.*, 2021).

GRABERT (1968) afirma que o deslocamento do RSF ocorreu após a bacia sedimentar do RSF sofrer com erosões causadas por transgressões marinhas. De modo que, o leito de alguns pequenos rios da costa, orientados para o oeste, fossem capazes de direcionar suas águas para o Atlântico Sul. Em contraste, uma outra teoria sugere que o rio mudou de curso com o soerguimento da Serra Grande/Ibiapaba, tornando-se posteriormente endorreico, alcançando o Atlântico Sul há apenas 450 mil anos (MABESOONE, 1994).

POTTER (1997) apontou que soerguimentos ocorridos no meio do Mioceno, em função da orogênese andina, reativaram falhas na depressão tectônica do RSF, ao passo que VALADÃO (1998) situou essa ocorrência dentro do final do meio do Mioceno. E ainda, baseando-se na análise de sedimentos marinhos, um trabalho datou tal ocorrência até meados do Eoceno, traçando o ponto de captura até um afluente abandonado do Rio Piauí

(KARNER E DRISCOLL, 1999). Ainda, outro estudo apontou que o curso atual do RSF já ocorria desde o Cretáceo (PETRI, 1987).

Em relação às consequências biológicas da atividade geológica da Terra, a literatura relata a hipótese hidrogeológica, adotada neste trabalho, como contraponto à hipótese paleogeográfica. A hipótese paleogeográfica foi elaborada para explicar a diversidade de espécies na Amazônia. Segundo o modelo de ilha, tal hipótese tem como pressuposto que os movimentos tectônicos e a formação do relevo superficial nas áreas baixas e altas da América do Sul (com ou sem mudanças no nível do mar) são considerados fatores necessários e suficientes para explicar o isolamento geográfico das populações e a especiação resultante (CROIZAT, 1976; EMSLEY, 1965). Dessa forma, linhagens irmãs serão encontradas em ambos os lados de um arco geológico. Além disso, a divergência será datada no pré-Plioceno, exceto no caso do Arco Fitzcarrald, uma formação mais recente. (DA SILVA & PATTON, 1998; HUBERT *et al.*, 2007). A hipótese hidrogeológica defende que os eventos de captura de cabeceiras entre bacias têm papel crucial na colonização de novos locais, seguida de diferenciação genética (HUBERT & RENNO, 2006; MONTOYA-BURGOS, 2003). Tal hipótese está relacionada ao desaparecimento temporário de barreiras entre bacias adjacentes, de modo que se torna permissivo o intercâmbio faunístico entre elas, havendo fluxo gênico e a expansão de alcance (geodispersão) (HO *et al.*, 2015; LIEBERMAN & ELDREDGE, 1996). Esse processo parece ter sido o evento mais importante na estruturação das linhagens do peixe neotropical *Salminus hilarii* entre a bacia do rio Alto Paraná e do RSF (MACHADO *et al.*, 2017). Desse modo, no cenário da hipótese hidrogeológica, espera-se que linhagens ou espécies recém-formadas por geodispersão estejam aninhadas dentro de um clado de peixes que ocupam bacias adjacentes (HUBERT *et al.*, 2007).

Diante do histórico dos efeitos hidrogeológicos, sabe-se que a bacia do RSF passou por remodelações que levaram a mudanças em seu curso, o que culminou em conexões com outras bacias em determinados momentos, e em isolamentos em outros períodos

(FERNANDES *et al.*, 2022). Apesar da literatura sobre a história geológica do RSF ser escassa, ela indica que o rio teve seu paleocurso modificado, antes reto, do sul para o norte, desaguando no Atlântico Norte próximo ao atual estado do Piauí, para seu novo paleocurso leste-oriental curvando-se ao seu curso atual. A partir de então, a Caatinga, anteriormente contínua, foi dividida nas regiões norte e sul (GRABERT, 1968).

Diante do exposto, estipula-se que o RSF pode ter primeiro alcançado o Atlântico Sul através de meandros ao sul de sua atual foz antes de se deslocar para o norte (KING, 1957). A principal mudança de paleocurso possivelmente ocorreu durante a glaciação do Mindel do Pleistoceno Médio (~450 mil anos atrás) (MABESOONE, 1994), mas há controvérsias, com alguns trabalhos indicando que esse processo ocorreu no Plio-Pleistoceno inicial (RIBEIRO *et al.*, 2021), ou em meados do Mioceno (POTTER, 1997), ou ainda em épocas do Eoceno (KARNER & RISCOLL, 1999).

A bacia do RSF compartilha sua paleohidrologia com as ecorregiões da Caatinga Centro-Nordeste e a do Maranhão-Piauí, em decorrência das intrincadas atividades tectônicas que surgiram durante o período Terciário (AB'SABER, 2001). O RSF também esteve ligado à bacia do rio Parnaíba durante o período em que apresentou uma modificação de seu curso que o levou a escoar de modo temporário para o norte (POTTER, 1997; WERNECK *et al.*, 2015). Posteriormente, o RSF ainda estabeleceu conexões com bacias costeiras, tais como as de Itapicuru, Paraíba do Norte e Contas, uma vez que ele escoou para o leste (POTTER, 1997; COSTA, 2010; WERNECK *et al.*, 2015).

As alterações históricas que afetaram a paleohidrologia do RSF influenciaram em seu curso, de forma que foram propiciadas diversas ligações, com potenciais acoplamentos entre as bacias citadas anteriormente, possibilitando o fluxo gênico entre as populações outrora isoladas (PEREIRA *et al.* 2012). Desse modo, o compartilhamento

de fauna ocorreria a partir de eventos de captura de cabeceiras, o que propiciou o intercâmbio entre as distintas ictiofaunas das bacias em questão (ROSA *et al.*, 2004).

## **2.7 Bacia do São Francisco ameaçado pela atividade antrópica**

Apesar de toda a importância socioeconômica do RSF, ele vem sofrendo com a ação antrópica de diversas maneiras. As retiradas de água subterrânea para irrigação podem provavelmente ter sido responsáveis pela diminuição do fluxo de base no médio RSF (LUCAS *et al.*, 2020). Mudanças climáticas também estão relacionadas às atividades humanas que pressionam a bacia hidrográfica do RSF (OLIVEIRA, LIMA & SPYRIDES, 2021).. Nesse contexto, eventos hidrometeorológicos extremos, como chuvas intensas, vazões máximas e secas prolongadas, estão ocorrendo com mais frequência e intensidade em vários locais do globo (SMITH *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2017). A poluição das águas do rio também é um dos impactos causados pelo ser humano (FRENA *et al.*, 2016; GADELHA *et al.*, 2019; DANTAS *et al.*, 2020).

Contudo, duas atividades humanas têm gerado forte impacto negativo sobre a ictiofauna do RSF, a transposição de suas águas (alto e submédio RSF) (MOREIRA-FILHO & BUCKUP, 2005; SILVA *et al.*, 2020) e os barramentos (submédio) (BARRETO, *et al.*, 2020). Durante as décadas de 1970 a 1990, uma série de barragens, funcionando em cascata, foram construídas na bacia hidrográfica do RSF para produzir energia elétrica (KNOPPERS *et al.*, 2005). Dessa maneira, houve a redução do envio de sedimentos e carga de nutrientes para o mar costeiro, além da intrusão crônica de sal na bacia estuarina (PAIVA & SCHETTINI, 2021). Por causa das barragens, das águas de fluxo lento e dos altos níveis de salinização, peixes historicamente importantes para a economia local, como o bagre, *Pseudoplatystoma corruscans*, foram extintos localmente. Enquanto isso, espécies não nativas, como a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, passaram a ocupar o nicho de espécies endêmicas porque estão adaptadas a esses ambientes (ASSIS *et al.*, 2017). Outra espécie localmente extinta, acima da barragem de Três Marias, foi o

matrinchã (*Brycon orthotaenia*). A dieta desse peixe depende da vegetação ripária local, que tem sido destruída. Ainda a água mais fria proveniente da barragem de Três Marias influenciou negativamente na reprodução de *B. orthotaenia* (NUNES *et al.*, 2015).

De acordo com pescadores artesanais locais do submédio RSF há espécies raramente capturadas, consideradas como ameaçadas de extinção desde a construção dos reservatórios no RSF, que são citadas a seguir: surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*), dourado (*Salminus franciscanus*), piau verdadeiro (*Leporinus* sp.), mandi (*Pimelodus maculatus*), Matrinchã (*B. orthotaenia*), pirá (*Conorhynchos conirostris*), e pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) (SILVA *et al.*, 2018). Além disso, dados da lista vermelha da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN, do inglês *International Union for Conservation of Nature*) ainda são incompletos, mas revelam que há espécies no RSF criticamente em risco de extinção (*Hypsolebias flavicaudatus* e *Hypsolebias janaubensis*), em risco de extinção (*Conorhynchos conirostris* e *Stygichthys typhlops*) e vulneráveis (*Brycon orthotaenia*, *Hypsolebias guanambi* e *Lophiosilurus alexandri*). Ainda, houve um caso de extinção local na Lagoa Santa (alto RSF), com redução de aproximadamente 70% da ictiofauna nativa. As causas prováveis desse processo foram a obstrução da comunicação da lagoa com o rio das Velhas, a introdução de espécies exóticas, mudanças no nível da água, poluição orgânica e eliminação da vegetação marginal e submersa (POMPEU & ALVES, 2003).

Na região do alto Paraná (rio Grande/rio Piumhi) poderia haver uma conexão natural, com o alto RSF, desempenhando um papel importante no intercâmbio faunístico entre essas duas bacias. Contudo a escala dessa troca seria menor, quando comparada à uma conexão artificial. Essa hipótese é corroborada pela análise de antigos mapas locais, em que se constata que as nascentes de alguns afluentes da margem esquerda do rio Piumhi, assim como o antigo Pantanal do Cururu, situam-se em altitudes semelhantes (~800 m) e com curta distância (400 m–1 km) de afluentes da margem direita

do RSF. Assim, é provável que tenham ocorrido conexões entre as águas da bacia do rio Grande e as do RSF, por meio do Pantanal Cururu durante as cheias, representando uma provável rota migratória natural dos peixes (BLANCO *et al.*, 2010).

A bacia do alto Paraná foi conectada à bacia do RSF na década de 1960, o que resultou em um aporte de ictiofauna da bacia capturada (MOREIRA-FILHO & BUCKUP, 2005). A transposição do rio Piumhi, afluente da margem direita do rio Grande, ocorreu devido à construção da Usina Hidrelétrica de Furnas (1958-1963), que se localiza entre os municípios de São José da Barra (MG) e São João Batista (MG). O enchimento do lago formado pela barragem exigiu a construção de uma barragem secundária, afim de evitar a inundação da cidade de Capitólio. Assim, também foi impedido o extravasamento de suas águas para o sistema vizinho, através do ribeirão Sujo, um afluente da margem direita do RSF. No entanto, a construção dessa barragem secundária isolou a drenagem do rio Piumhi, em 1963. Dessa forma, as águas do rio Piumhi foram transferidas por 18 km de canais artificiais para o córrego Água Limpa (RSF), afluente da margem esquerda do ribeirão Sujo (RSF). Portanto, o rio Piumhi, com seus lagos marginais associados e 22 afluentes, foi separado do sistema Paraná-Plata, integrando, assim, o sistema do RSF (MOREIRA-FILHO & BUCKUP, 2005).

Estudos de biodiversidade devem considerar que é pouco provável que a drenagem do ribeirão Sujo seja atualmente capaz de suportar a soma de sua ictiofauna original e toda a fauna de peixes que ocorria originalmente no rio Piumhi. Quando ambas as faunas foram forçadas a coexistir por meio da conexão artificial entre as duas bacias hidrográficas, é provável que algumas espécies fossem levadas à extinção (MOREIRA-FILHO & BUCKUP, 2005). Espécimes do grupo *Astyanax bimaculatus* apresentaram citótipos intermediários entre indivíduos do alto Paraná e alto RSF, na zona híbrida do rio Piumhi (PERES *et al.*, 2012). Por outro lado, é provável que as espécies que sobrevivem

eventualmente tornem-se organismos invasores na drenagem hospedeira. Isto é particularmente importante para espécies migratórias como *Leporinus octofasciatus*, que foram coletadas no canal de transposição. Essa espécie é nativa do sistema do alto Paraná, mas agora está presente na bacia do RSF. Outro exemplo é a espécie exótica *Hypostomus regani* do rio Piumhi detectada na bacia do RSF (MENDES-NETO *et al.*, 2011).

O Projeto de Integração do RSF com as Bacias Hidrográficas do Nordeste Setentrional transferiu 3,5% da água da bacia do São Francisco para as bacias do Jaguaribe, Apodi-Mossoró, Piranhas-Açu e Paraíba do Norte (BRASIL, 2004). Tal transferência ocorreu por meio de um sistema de dois canais (Eixos Norte e Leste), aquedutos, túneis, barragens e estações elevatórias, resultando em 720 km de extensão (477 km, excluindo os canais secundários, 260 km no Eixo Norte e 217 km no Eixo Leste) (BRASIL, 2022). Essa transposição ocorreu na bacia do submédio RSF e desde a sua aprovação em 2007 e o início da construção, em 2008, o projeto sofreu muitos atrasos, sendo concluído em 2021 (ANDRADE *et al.*, 2011; BRASIL, 2022).

Os projetos de transposição hídrica que envolvem o RSF apresentam potenciais riscos, já que ameaçam a biodiversidade Neotropical de água doce, com destaque para a sua ictiofauna (DUDGEON, 2019). As transições envolvendo o regime hidrológico das bacias influenciadas pelas transposições do RSF, seriam capazes de modificar a sazonalidade, vazão, disponibilidade e qualidade dos rios da Caatinga (JARDINE *et al.*, 2015). Assim, essas modificações desencadeariam uma diminuição da diversidade de peixes e da produção de pesca no interior (SABO *et al.*, 2017). Os problemas ambientais causados pelas transposições hídricas constituem introduções de espécies, perda de adaptações locais e homogeneização da biota, introgressão genética, exclusão competitiva, hibridização, modificação de habitat (incluindo fragmentação da vegetação

terrestre por canais) e disponibilidade/qualidade da água (ALBERT *et al.*, 2020; MEADOR, 1992; PITTCOK *et al.*, 2009).

Diante de tantos riscos oferecidos pela pressão antrópica, faz-se urgente o conhecimento acerca da ictiofauna da bacia do RSF, pois torna-se muito mais executável e prático conservar aquilo que se conhece. A ictiofauna da bacia do RSF foi inventariada, resultando em registros de 178 espécies, das quais 60% foram consideradas endêmicas (LIMA *et al.*, 2018). Já outro estudo elaborou uma *checklist* para a ictiofauna do submédio RSF, alcançando um total de 86 espécies (SILVA *et al.*, 2020). Um estudo genético com a técnica de DNA barcode avaliou o alto e o médio RSF, apontando para a presença de algumas linhagens crípticas entre esses diferentes trechos (CARVALHO *et al.*, 2011). Cabe ressaltar que esse trecho está em regiões mais altas e com maior pluviosidade. Além disso, alguns trabalhos também têm verificado linhagens crípticas de peixes no RSF (BERBEL-FILHO *et al.*, 2018; JACOBINA *et al.*, 2018).

Apesar de haver estudos com identificação morfológica das espécies que compõe a ictiofauna de todo o RSF, como mencionado anteriormente, não há o mesmo para estudos genéticos amplos, envolvendo o *cox1*, para esses peixes. Estudos genéticos têm sido realizados sobre a ictiofauna Neotropical de bacias da sul-americanas brasileiras, incluindo as do rio Paraná, Paraíba do Sul, Jequitinhonha, Mucuri e RSF (PEREIRA *et al.*, 2013, 2011; GOMES *et al.*, 2015; PUGEDO *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2011). Todos esses estudos, têm em comum, o fato de que não avaliaram a ictiofauna dessas bacias ao longo de toda a sua extensão, limitando-se a um ou dois trechos. No RSF, o estudo expoente na área é o de Carvalho *et al.*, (2011), que analisou, por meio de técnicas morfológicas e da metodologia de DNA barcode, 101 espécies da ictiofauna do médio e do alto RSF. Contudo o submédio e o baixo RSF permanecem uma incógnita do ponto de vista da diversidade genética de sua ictiofauna.

## REFERÊNCIAS

- ALBERT, J. S.; TAGLIACOLLO, V. A.; DAGOSTA, F. Diversification of Neotropical freshwater fishes. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 51, p. 27-53, 2020.
- ALBERT, J. S. *et al.* Scientists' warning to humanity on the freshwater biodiversity crisis. **Ambio**, v. 50, n. 1, p. 85-94, 2021.
- ALBERT, J. S.; ANTONELLI, A.. Society for the study of systematic biology symposium: Frontiers in parametric biogeography. **Systematic Biology**, v. 66, n. 2, p. 125-127, 2017.
- ALBERT, J. S.; CARVALHO, T. P. Neogene assembly of modern faunas. **Historical biogeography of neotropical freshwater fishes**, p. 119-136, 2011.
- ALBERT, J. S.; PETRY, P.; REIS, R. E. Major biogeographic and phylogenetic patterns. **Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes**, v. 1, p. 21-57, 2011.
- ALBERT, J. S.; REIS, R. (Ed.). **Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes**. Univ of California Press, 2011.
- ALBERT, J. S.; VAL, P.; HOORN, C. The changing course of the amazon river in the neogene: Center stage for neotropical diversification. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 3, 2018.
- ALBERT, J. S. *et al.* Upland and lowland fishes: a test of the river capture hypothesis. **Mountains, climate and biodiversity**, p. 273-294, 2018.
- ALLEN, G. H.; PAVELSKY, T. M. Global extent of rivers and streams. **Science**, v. 361, n. 6402, p. 585–588, 10 ago. 2018.
- ASSIS, D. A. S. DE *et al.* Establishment of the non-native fish *Metynnis lippincottianus* (Cope 1870) (Characiformes: Serrasalminidae) in lower São Francisco River, northeastern Brazil., v. 52, n. 3, p. 228–238, 2 set. 2017.
- ANDRADE, J. G. P. *et al.* Interbasin water transfers: The Brazilian experience and international case comparisons. **Water Resources Management**, v. 25, p. 1915-1934, 2011.
- ANTONELLI, A. *et al.* Amazonia is the primary source of Neotropical biodiversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 23, 2018.
- AZEVEDO, F. M. *et al.* Integrative taxonomy reveals the historically poorly defined armoured catfish *Hypostomus variipictus* (Ihering 1911), from the upper rio Paraná basin, Brazil (Siluriformes, Loricariidae). **Journal of Fish Biology**, 2021.
- BARBOSA, J. M. *et al.* Perfil da ictiofauna da bacia do rio São Francisco / Profile of the fish fauna of the São Francisco river basin. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 5, n. 1, p. 70–90, 2017.
- BARBOSA, L. M.; DOMINGUEZ, J. M. L. Coastal dune fields at the São Francisco River strandplain, northeastern Brazil: Morphology and environmental controls. **Earth**

- Surface Processes and Landforms**, v. 29, n. 4, p. 443–456, 2004.
- BARRETO, I. D. DE C. *et al.* Complexity analyses of Sao Francisco river streamflow: influence of dams and reservoirs. **Journal of Hydrologic Engineering**, v. 25, n. 10, p. 05020036-1 a 8, 2020.
- BERMINGHAM, E.; MARTIN, A. P. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 4, p. 499–517, 1998.
- BEST, J. Anthropogenic stresses on the world's big rivers. **Nature Geoscience** **2018** **12:1**, v. 12, n. 1, p. 7–21, 2018.
- BEZERRA, L. A. V. *et al.* A network meta-analysis of threats to South American fish biodiversity. **Fish and Fisheries**, v. 20, n. 4, p. 620–639, 2019.
- BLANCO, D. R. *et al.* Characterization of invasive fish species in a river transposition region: evolutionary chromosome studies in the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 20, p. 1-8, 2010.
- BLAXTER, M. L. The promise of a DNA taxonomy. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 359, n. 1444, p. 669–679, 2004.
- BLAXTER, M. L. *et al.* Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1935–1943, 2005.
- BOGARDI, J. J.; FEKETE, B. M.; VÖRÖSMARTY, C. J. **Planetary boundaries revisited: A view through the “water lens”** **Current Opinion in Environmental Sustainability**, 2013.
- BORGWARDT, F. *et al.* Exploring variability in environmental impact risk from human activities across aquatic ecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 652, 2019.
- BRASIL. Relatório de Impacto Ambiental-RIMA do Projeto de Integração do rio São Francisco com as Bacias Hidrográficas do Nordeste Setentrional. Brasília: Ministério da Integração Nacional; 2004.
- BRASIL. Projeto de Integração do Rio São Francisco. Brasília: Ministério da Integração e do Desenvolvimento Regional; 2022. Acesso em: 02/02/2023. Disponível em: <https://www.gov.br/mdr/transposicao-sao-francisco>
- CAMPOS, M. C. *et al.* A new mechanism for millennial scale positive precipitation anomalies over tropical South America. **Quaternary Science Reviews**, v. 225, p. 105990, 2019.
- CARVALHO, D. C. *et al.* Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. **Mitochondrial Dna**, v. 22, n. sup1, p. 80-86, 2011.
- COSTANZA, R. *et al.* Changes in the global value of ecosystem services. **Global Environmental Change**, v. 26, n. 1, 2014.
- CROIZAT, L. **Biogeografía analítica y sintética ("Panbiogeografía") de las Américas**. Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales, 1976.

- MEYER, C. P.; PAULAY, G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. **PLoS biology**, v. 3, n. 12, p. 1–10, 2005.
- DAGOSTA, F. C. P.; PINNA, M. DE. The Fishes of the Amazon: Distribution and Biogeographical Patterns, with a Comprehensive List of Species., v. 2019, n. 431, p. 1–163, 2019.
- DA SILVA, M. N. F.; PATTON, J. L. Amazonian phylogeography: mtDNA sequence variation in arboreal echimyid rodents (Caviomorpha). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 2, n. 3, p. 243-255, 1993.
- DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, n. 3, p. 407–415, 2005.
- DINIZ-FILHO, J. A. F. *et al.* Darwinian shortfalls in biodiversity conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 28, n. 12, p. 689-695, 2013.
- DOMINGUEZ, J. M. L. The São Francisco strandplain: A paradigm for wave-dominated deltas? **Geological Society Special Publication**, v. 117, p. 217–231, 1996.
- DUDGEON, D. Multiple threats imperil freshwater biodiversity in the Anthropocene. **Current Biology**, 2019.
- EMSLEY, M. G. Speciation in *Heliconius* (Lep., Nymphalidae): morphology and geographic distribution. **Zoologica**, v. 50, p. 191-254, 1965.
- FAGAN, W. F. Connectivity, fragmentation, and extinction risk in dendritic metapopulations. **Ecology**, v. 83, n. 12, 2002.
- FARIAS, Renata S. *et al.* Genetic diversity and aquaculture conservation for a threatened Neotropical catfish. **Neotropical Ichthyology**, v. 18, 2020.
- FRENA, M. *et al.* Evaluation of anthropogenic contamination using sterol markers in a tropical estuarine system of northeast Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 109, n. 1, p. 619–623, 2016.
- GADELHA, L. G. *et al.* Distribution patterns of aliphatic hydrocarbons in sediments from a tropical estuarine system. **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, p. 110607, 2019.
- GARCEZ, D. K. *et al.* Phylogenetic structure of Neotropical annual fish of the genus *Cynopoecilus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae), with an assessment of taxonomic implications. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 58, n. 4, p. 1123–1134, 2020.
- GISMONDI, A. *et al.* Identification of ancient *Olea europaea* L. and *Cornus mas* L. seeds by DNA barcoding. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 335, n. 7, 2012.
- GODUNKO, R. J. *et al.* Cenozoic origins of the genus *Calliarcys* (Insecta, Ephemeroptera) revealed by Micro-CT, with DNA barcode gap analysis of Leptophlebiinae and Habrophlebiinae. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 15228, 2022.
- GOLDSTEIN, P. Z.; DESALLE, R. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: Determination, discovery, and description. **BioEssays**, v. 33, n. 2, p. 135–147, 2011.
- GOMES, L. C. *et al.* Integrative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a neotropical river basin. **Genetica 2015 143:5**, v. 143, n. 5, p. 581–588, 2015.

- GUO, M. *et al.* Life barcoded by DNA barcodes. **Conservation Genetics Resources**, p. v. 14, p. 351-365, 2022.
- GRILL, G. *et al.* Mapping the world's free-flowing rivers. **Nature**, v. 569, n. 7755, 2019.
- HANNA, D. E. L. *et al.* A review of riverine ecosystem service quantification: Research gaps and recommendations. **Journal of Applied Ecology**, 2018.
- HEBERT, P. D. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings. Biological sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003.
- HOEKSTRA, A. Y.; MEKONNEN, M. M. The water footprint of humanity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 9, 2012.
- HOORN, C. *et al.* Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. **Science**, v. 330, n. 6006, p. 927-931, 2010.
- HORTAL, J. *et al.* Seven Shortfalls that Beset Large-Scale Knowledge of Biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 46, 2015.
- HUBERT, N. *et al.* Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 10, p. 2115-2136, 2007.
- HUBERT, N.; RENNO, J. F. Historical biogeography of South American freshwater fishes. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 8, p. 1414-1436, 2006.
- JACOBINA, U. P. *et al.* DNA barcode sheds light on systematics and evolution of neotropical freshwater trahiras. **Genetica**, v. 146, n. 6, p. 505–515, 2018.
- JARDINE, T. D. *et al.* Reconciling the role of organic matter pathways in aquatic food webs by measuring multiple tracers in individuals. **Ecology**, v. 96, n. 12, p. 3257–3269, 2015.
- KAVAL, P. Integrated catchment management and ecosystem services: A twenty-five year overview. **Ecosystem Services**, v. 37, 2019.
- KEKKONEN, M.; HEBERT, P. D. N. DNA barcode-based delineation of putative species: efficient start for taxonomic workflows. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, n. 4, p. 706–715, 2014.
- KNOPPERS, B. *et al.* The São Francisco Estuary, Brazil. **Estuaries**, p. 51-70, 2006.
- KNOWLTON, N.; WEIGT, L. A. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 265, n. 1412, p. 2257–2263, 1998.
- LADLE, R.; HORTAL, Joaquín. Mapping species distributions: living with uncertainty. **Frontiers of Biogeography**, v. 5, n. 1, 2013.
- LÉVÊQUE, C.; BALIAN, E. V.; MARTENS, K. An assessment of animal species diversity in continental waters. **Hydrobiologia**, v. 542, p. 39-67, 2005.
- LINGAM, M.; LOEB, A. What's in a name: The etymology of astrobiology. **International Journal of Astrobiology**, v. 19, n. 5, 2020.
- LOMOLINO, M. V. *et al.* Conservation biogeography. **Frontiers of Biogeography: new directions in the geography of nature**, v. 293, 2004.

- LUCAS, M. C. *et al.* Significant Baseflow Reduction in the Sao Francisco River Basin. **Water** **2021**, v. 13, n. 1, p. 2, 2020.
- LYRA, M. L.; HADDAD, C. F. B.; DE AZEREDO-ESPIN, A. M. L. Meeting the challenge of DNA barcoding Neotropical amphibians: polymerase chain reaction optimization and new COI primers. **Molecular Ecology Resources**, v. 17, n. 5, p. 966-980, 2017.
- MACHADO, C. B.; GALETTI, P. M.; CARNAVAL, A. C.. Bayesian analyses detect a history of both vicariance and geodispersal in Neotropical freshwater fishes. **Journal of Biogeography**, v. 45, n. 6, 2018.
- MATTOX, G. M. T. *et al.* A new miniature species of *Priocharax* (Characiformes: Characidae) from the upper rio Ipixuna, Purus drainage, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 19, n. 2, 2021.
- MEADOR, M. R. Inter-basin water transfer: ecological concerns. **Fisheries**, v. 17, n. 2, p. 17-22, 1992.
- MENDES-NETO, E. O. *et al.* Description of karyotype in *Hypostomus regani* (Ihering, 1905)(Teleostei, oricariidae) from the Piumhi river in Brazil with comments on karyotype variation found in *Hypostomus*. **Comparative Cytogenetics**, v. 5, n. 2, p. 133, 2011.
- MESCOLOTTI, P. C. *et al.* Fluvial aggradation and incision in the Brazilian tropical semi-arid: Climate-controlled landscape evolution of the São Francisco River. **Quaternary Science Reviews**, v. 263, p. 106977, 2021.
- MOREIRA-FILHO, O.; BUCKUP, P. A.. A poorly known case of watershed transposition between the São Francisco and upper Paraná river basins. **Neotropical Ichthyology**, v. 3, p. 449-452, 2005.
- MORRONE, J. J. Biogeographical regionalisation of the neotropical region. **Zootaxa**, v. 3782, n. 1, 2014.
- MUSHER, L. J. *et al.* Why is Amazonia a “source” of biodiversity? Climate-mediated dispersal and synchronous speciation across the Andes in an avian group (Tityrinae). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 286, n. 1900, 2019.
- NUNES, D. M. F. *et al.* Influence of a large dam and importance of an undammed tributary on the reproductive ecology of the threatened fish matrinxã *Brycon orthotaenia* Günther, 1864 (Characiformes: Bryconidae) in southeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, p. 317-324, 2015.
- O’HANLEY, J. R. *et al.* Optimizing hydropower dam location and removal in the São Francisco river basin, Brazil to balance hydropower and river biodiversity tradeoffs. **Landscape and Urban Planning**, v. 195, p. 103725, 2020.
- OLIVEIRA, D. H. M. C.; LIMA, K. C.; SPYRIDES, M. H. C. Rainfall and streamflow extreme events in the São Francisco hydrographic region. **International Journal of Climatology**, v. 41, n. 2, p. 1279–1291, 2021.
- PAIVA, B. P.; SCHETTINI, C. A. F. Circulation and transport processes in a tidally forced salt-wedge estuary: The São Francisco river estuary, Northeast Brazil. **Regional Studies in Marine Science**, v. 41, p. 101602, 2021.

- PARVATHY, S. T.; UDAYASURIYAN, V.; BHADANA, V.. Codon usage bias. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 1, p. 539-565, 2022.
- PEREIRA, L. H. G. *et al.* Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics** **2013 14:1**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2013.
- PEREIRA, L. H. G. *et al.* DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. v. 22, n. SUPPL. 1, p. 71–79, 2011.
- PEREIRA, S. B. *et al.* Estudo do comportamento hidrológico do Rio São Francisco e seus principais afluentes. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 6, p. 615–622, 2007.
- PERES, Wellington Adriano Moreira *et al.* Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition: Karyotypic evidence in *Astyanax* “bimaculatus group”(Characiformes: Characidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 22, p. 519-526, 2012.
- PITTOCK, J. *et al.* Interbasin water transfers and water scarcity in a changing world - a solution or a pipedream?. Germany: **WWF**; 2009.
- POMPEU, P. S.; ALVES, C. B. M. Local fish extinction in a small tropical lake in Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 1, p. 133-135, 2003.
- PUGEDO, M. L. *et al.* Integrative taxonomy supports new candidate fish species in a poorly studied neotropical region: the Jequitinhonha River Basin. **Genetica** **2016 144:3**, v. 144, n. 3, p. 341–349, 2016.
- RAMIREZ, J. L. *et al.* Revealing hidden diversity of the underestimated neotropical ichthyofauna: DNA barcoding in the recently described genus *Megaleporinus* (characiformes: Anostomidae). **Frontiers in Genetics**, p. 149, 2017.
- REIA, L.; OLIVEIRA, C.; BENINE, R. C. *Moenkhausia andrica* (Characiformes: Characidae): a new species from the rio Tapajós basin, Brazil, with minute fin hooklets in females. **Journal of Fish Biology**, p. jfb.14847, 2021.
- REID, A. J. *et al.* Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. **Biological Reviews**, v. 94, n. 3, 2019.
- REIS, R. E. *et al.* Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish Biology**, v. 89, n. 1, p. 12–47, 2016.
- RIDDLE, B. R. *et al.* Basic biogeography: estimating biodiversity and mapping nature. **Conservation biogeography**, p. 45-92, 2011.
- RODELL, M. *et al.* Emerging trends in global freshwater availability. **Nature**, v. 557, n. 7707, 2018.
- SABO, J. L. *et al.* Designing river flows to improve food security futures in the Lower Mekong Basin. **Science**, v. 358, n. 6368, 2017.
- SACCONI, C. *et al.* Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. **Gene**, v. 238, n. 1, p. 195–209, 1999.
- DANTAS, M. S. *et al.* Impact of fecal contamination on surface water quality in the São Francisco River hydrographic basin in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Water and**

- Health**, v. 18, n. 1, p. 48–59, 2020.
- SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, D. *et al.* Bias in freshwater biodiversity sampling: The case of Iberian water beetles. **Diversity and Distributions**, v. 14, n. 5, 2008.
- SANTOS, L. C. M. *et al.* Anthropogenic activities on mangrove areas (São Francisco River Estuary, Brazil Northeast): A GIS-based analysis of CBERS and SPOT images to aid in local management. **Ocean & Coastal Management**, v. 89, p. 39–50, 2014.
- SATO, Y.; GODINHO, H. P. Peixes migratórios do rio São Francisco. **CAROLSFIELD J., HARVEY B., ROSS C., BAER A.** (eds.), Peixes migratórios da América do Sul: Biologia, Pesca e Status de Conservação. World Fisheries Trust/World Bank/International Development Research Center, Washington, DC. Pp. 195 – 232, 2004
- SILVA, G. M. N. *et al.* Artisanal fisheries of the Itaparica reservoir, São Francisco River, Brazil: socioeconomic profile, environmental dynamics, and management recommendations. **Regional Environmental Change**, v. 18, p. 1889-1899, 2018.
- SILVA, M. J. *et al.* Freshwater fish richness baseline from the São Francisco Interbasin Water Transfers Project in the Brazilian Semiarid. **Neotropical Ichthyology**, v. 18, n. 4, 2020.
- SHIRAK, A. *et al.* DNA barcoding analysis of fish bones from a shipwreck found at Dor, Israel. **Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh**, v. 65, n. 1, 2013.
- SMITH, B. K.; SMITH, J.; BAECK, M. L. Flash flood–producing storm properties in a small urban watershed. **Journal of Hydrometeorology**, v. 17, n. 10, p. 2631-2647, 2016.
- STEFFEN, W. *et al.* Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. **Science**, v. 347, n. 6223, 2015.
- TAGLIACOLLO, V. A. *et al.* Biogeographical signature of river capture events in Amazonian lowlands. **Journal of Biogeography**, v. 42, n. 12, 2015.
- THOMAZ, A. T. *et al.* Geographic distributions, phenotypes, and phylogenetic relationships of Phalloceros (Cyprinodontiformes: Poeciliidae): Insights about diversification among sympatric species pools. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 132, p. 265-274, 2019.
- WANTZEN, K. M. *et al.* River Culture: An eco-social approach to mitigate the biological and cultural diversity crisis in riverscapes. **Ecohydrology and Hydrobiology**, v. 16, n. 1, 2016.
- ZAMANI, A. *et al.* The future of zoological taxonomy is integrative, not minimalist. **Systematics and Biodiversity**, v. 20, n. 1, p. 1-14, 2022.
- ZHOU, Y.; LAU, WILLIAM K. M.. The relationships between the trends of mean and extreme precipitation. **International Journal of Climatology**, v. 37, n. 10, p. 3883-3894, 2017.

### **3 DNA barcode highlights taxonomic warnings and cryptic diversity of São Francisco river basin fishes, in the Neotropical region**

*Manuscrito redigido nas normas do periódico Molecular Ecology Resources*

Denis Bruno Santos Marques Nunes<sup>1</sup>, Alany Itala Pontes<sup>1</sup>, Leandro Ferreira Santos<sup>1</sup>, Leonardo Luís Calado<sup>2</sup>, Luciano Barros-Neto<sup>3</sup>, Silvia Yasmin Silva<sup>3</sup>, Sergio Maia Queiroz Lima<sup>3</sup> & Uedson Pereira Jacobina<sup>1</sup>

1. Postgraduate Program in Biological Diversity and Conservation in the Tropics, Laboratory of Molecular Integrative Systematics, Campus Arapiraca, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Av. Manoel Severino Barbosa, no number, Bom Sucesso, Arapiraca, AL, CEP 57,72-970, Brazil.
2. National Institute of Semiarid (Federal Government of Brazil), Av. Francisco Lopes de Almeida, no number, Serrotão, Campina Grande, PB, CEP 58,434-700, Brazil.
3. Laboratory of Systematics and Evolutionary Ichthyology, Department of Botany and Zoology, Campus Lagoa Nova, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), no number, Lagoa Nova, Natal, RN, CEP 59,078-970, Brazil.

#### **Abstract**

Located in South America, São Francisco River (SFR) is distributed from the Southeast to the Brazil Northeast, is the 27th largest river in the world. This watershed is known for its diversity and endemism, with its ichthyofauna containing records of 178 species (60% endemic), but due to anthropic factors there are species that have come to be considered vulnerable, endangered and critically endangered. There are gaps in knowledge about the SFR, so that genetic knowledge is still diffuse and incipient in the submiddle (dams) and lower (silted) stretches. In this context, the present study aimed to overcome knowledge of biodiversity deficits, as well as to evaluate the SFR ichthyofauna genetic diversity, applying DNA barcode techniques. We evaluated 90 species, 74 genera, 28 families and 6 orders, including Characiformes (40 species), Cyprinodontiformes (6 species), Gymnotiformes (3 species), Perciformes (4 species), Siluriformes (36 species) and the Synbranchiformes (1 species). Distinct genetic divergence (GD) patterns were identified:  $GD < 1\%$  (74 species or 82.22%),  $1\% < GD < 2\%$  (8 species or 8.89%) and  $GD > 2\%$  (8 species or 8.89%). Furthermore, identification errors involving three species pairs were detected: *Cetopsorhamdia iheringi* and *Phenacorhamdia tenebrosa*; *Imparfinis mirini* and *I. minutus*; *Characidium fasciatum* and *C. gomesi*. Some cases of species complexes and taxonomic warnings involving the genera *Astyanax* and *Psalidodon* were also found. Deep genetic divergence was also verified for the species *Pimelodella vittata*, *Synbranchus marmoratus*, *Rhamdia quelen*, *Piabina argentea*, *Gymnotus carapo*, *Hyphessobrycon santae* and *Pamphorichthys hollandi*. Such results help to understand the SFR ichthyofauna

systematics and evolution, considering its hydrogeological formation. It is expected that the knowledge generated here will be used in the elaboration and updating of management and conservation plans for the ichthyofauna of the SFR.

**Key-words:** Neotropical fishes, mitochondrial DNA, genetic divergence, cryptic lineages, misidentifications, species complex.

### 3 DNA barcode destaca incertezas taxonômicas e diversidade críptica em peixes da bacia do rio São Francisco, na região Neotropical.

#### Resumo

Localizado na América do Sul, o rio São Francisco (RSF), que percorre desde o Sudeste até o Nordeste do Brasil, é o 27º maior do mundo. Essa bacia hidrográfica é conhecida por sua diversidade e endemismo, com sua ictiofauna contendo registros de 178 espécies (60% endêmicas), mas devido a fatores antrópicos há espécies que passaram a ser consideradas vulneráveis, em perigo e criticamente em perigo de extinção. Há lacunas de conhecimento acerca do RSF, de modo que o conhecimento genético ainda é difuso e incipiente nos trechos do submédio (barramentos) e baixo (assoreado). Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo suprir déficits de conhecimento da biodiversidade, bem como avaliar a diversidade genética da ictiofauna do RSF, por meio de técnicas de DNA barcode. Foram avaliadas 90 espécies, 74 gêneros, 28 famílias e 6 ordens, incluindo os Characiformes (40 espécies), os Cyprinodontiformes (6 espécies), os Gymnotiformes (3 espécies), os Perciformes (4 espécies), os Siluriformes (36 espécies) e os Synbranchiformes (1 espécie). Foram identificados distintos padrões de divergência genética (DG):  $DG < 1\%$  (74 espécies ou 82.22%),  $1\% < DG < 2\%$  (8 espécies ou 8.89%) e  $DG > 2\%$  (8 espécies ou 8.89%). Além disso, foram detectados erros de identificação envolvendo três pares de espécies: *Cetopsorhamdia iheringi* e *Phenacorhamdia tenebrosa*; *Imparfinis mirini* e *I. minutus*; *Characidium fasciatum* e *C. gomesi*. Também foram encontrados alguns casos de complexos de espécies e advertências taxonômicas envolvendo os gêneros *Astyanax* e *Psalidodon*. Ainda foi verificada divergência genética profunda para as espécies *Pimelodella vittata*, *Synbranchus marmoratus*, *Rhamdia quelen*, *Piabina argentea*, *Gymnotus carapo*, *Hyphessobrycon santae* e *Pamphorichthys hollandi*. Tais resultados auxiliam na compreensão da sistemática e evolução da ictiofauna do RSF, considerando sua formação hidrogeológica. Espera-se que o conhecimento aqui gerado seja utilizado na elaboração e atualização de planos de manejo e conservação da ictiofauna do RSF.

**Palavras-chave:** Peixes Neotropicais, DNA mitocondrial, divergência genética, linhagens crípticas, erros de identificação, complexo de espécies.

### 3.1 Introdução

A ictiofauna Neotropical equivale a cerca de 20 a 25% de toda a ictiofauna de água doce da Terra (Dagosta & Pinna, 2019). Avalia-se que a riqueza dessa ictiofauna alcance valores próximos a 5.160 espécies descritas, alocadas em 739 gêneros, 69 famílias e 20 ordens (Reis *et al.*, 2016). Contudo, a totalidade dessas espécies ainda é desconhecida, estimando-se que em torno de 3.000 a 4.000 delas ainda não foram descritas (Reis *et al.*, 2016).

A falta de conhecimento acerca das espécies tem sido afetada pelo impedimento taxonômico, que corresponde à falta de recursos científico-humanos, tais como escassez de taxonomistas, infraestrutura precária e necessidade de revisão taxonômica, principalmente em grupos diversos e complexos (Jörger & Schrödl, 2013). Essa falta de conhecimento se manifesta em diversos déficits, incluindo o déficit Linneano, que aponta para a ausência de conhecimento sobre a identificação de espécies, de modo que muitas delas ainda não foram sequer descritas, e o déficit Darwiniano, que indica a ausência de conhecimento sobre filogenia e evolução das espécies (Bini *et al.*, 2006; Diniz-Filho *et al.*, 2013; Hortal *et al.*, 2015). Além desses fatores, o avanço acelerado do desmatamento e a poluição dos rios, riachos e demais corpos d'água, têm impactado severamente a diversidade da ictiofauna na região Neotropical (Freitas *et al.*, 2021; Ilha *et al.*, 2019). Em todo o mundo, a atividade humana vem crescendo de forma vertiginosa, e estima-se que mais de um terço de todas as espécies de peixes de água doce estejam sujeitas à extinção (Harrison *et al.*, 2021).

No Brasil, a bacia hidrográfica do rio São Francisco (RSF) é de grande relevância socioeconômica, sendo conhecida como a bacia da integração nacional, uma vez que possui cerca de 2,700 km de extensão, e uma área de ~640,000 km<sup>2</sup> (Knoppers *et al.*, 2005). Esta bacia atravessa uma variedade de biomas (Mata Atlântica, Cerrado e a

Caatinga), com mudanças fisiográficas em suas paisagens, sendo subdividida nos trechos alto, médio, submédio e baixo (Knoppers *et al.*, 2005; O'Hanley *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2014). Os recursos hídricos do rio RSF têm aplicações em diversas atividades humanas, tais como: geração de energia, irrigação, abastecimento urbano/industrial de água, navegação, agropecuária e aquicultura (O'Hanley *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2014). As áreas de várzea do RSF proveem um dos mais importantes ambientes de pesca do interior do Brasil, e são consideradas um berçário para várias espécies de peixes (Sato & Godinho, 2004).

Apesar da grande importância socioeconômica, a bacia do RSF vem sofrendo com diversas ações antrópicas, desde barramentos, a desmatamento, poluição, introdução de espécies exóticas, e, nos últimos anos, com a transposição de suas águas (Bezerra *et al.*, 2019; Jardine *et al.*, 2015; Knoppers *et al.*, 2005; Sabo *et al.*, 2017). Essas ações negativas vêm levando algumas espécies a desaparecer em certos trechos do RSF, como é o caso de algumas espécies, a exemplo; o surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*), pirá (*Conorhynchos conirostris*) e dourado (*Salminus brasiliensis*) que não tem sido encontrado em alguns trechos do RSF. Enquanto isso, espécies não nativas, como a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e o tucunaré (*Cichla kelberi*) aumentaram suas populações substancialmente nos últimos anos (Assis *et al.*, 2017). Levando algumas espécies endêmicas que compõe a ictiofauna do RSF a entrarem na lista de extinção (PAN São Francisco, 2015).

O conhecimento sobre a ictiofauna na bacia do rio São Francisco vem sendo ampliado através de diversos estudos nos últimos anos (Carvalho *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2020). Um inventário da região resultou em registros de 178 espécies, das quais 60% foram consideradas endêmicas (Lima *et al.*, 2018). Outro estudo elaborou uma checklist para o submédio rio São Francisco, alcançando um total de 86 espécies (Silva *et al.*, 2020). Quanto aos aspectos genéticos, Carvalho *et al.* (2011), utilizando a

técnica de DNA barcode, identificaram algumas linhagens crípticas entre trechos do alto e parte do médio do RSF. No entanto, informações sobre a diversidade genética das espécies nos trechos do submédio e baixo, que sofrem com altos níveis de barramento e assoreamento, ainda são limitadas, representando uma lacuna de conhecimento na região.

Nas últimas décadas, técnicas de taxonomia molecular, utilizando o gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (*cox1*), têm se revelado particularmente útil por sua rapidez e baixo custo (Hebert *et al.*, 2003). Essa técnica tem diversas aplicações, como por exemplo no auxílio da identificação de espécies, especialmente quando existem variações sutis nas características morfológicas (Vicente *et al.*, 2020), e na detecção de complexos de espécies (Pereira *et al.*, 2021). Na região Neotropical, essa estratégia vem revelando-se bastante efetiva em peixes (Gomes *et al.*, 2015; Jacobina *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2011; Ramirez *et al.*, 2017). Entretanto, alguns desses estudos que visam avaliar a ictiofauna das bacias hidrográficas, em boa parte têm sido limitados, concentrando-se em avaliar apenas um ou poucos trechos dos rios, o que pode resultar em lacunas de conhecimento sobre a diversidade genética ao longo de toda a sua extensão (Carvalho *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2011, 2013; Pugedo *et al.*, 2016). Para a bacia do rio SF, esses estudos foram realizados apenas nos trechos do alto e parte médio, cujas sequências têm sido depositadas nos principais bancos de dados de domínio público (Bold Systems e NCBI). No entanto, as áreas do submédio e baixo RSF, altamente impactadas por diversos fatores antrópicos, são áreas de conhecimento genético ainda escasso. Nesse contexto, a utilização de técnicas de sistemática molecular, com o gene *cox1*, pode contribuir para preencher essas lacunas de conhecimento, visando investigar a identidade taxonômica das espécies (déficit linneano), bem como entender os possíveis processos vicariantes (déficit darwiniano) que podem ter moldado a diversidade genética da ictiofauna ao longo da bacia do RSF. Nesse contexto,

o presente estudo teve como objetivo preencher essas lacunas de conhecimento Linneano e Darwiniano, avaliando a identidade taxonômica e a coesão evolutiva dos peixes do rio São Francisco, por meio de técnicas de sistemática molecular com o gene *cox1*.

## **3.2 Material e Métodos**

### **3.2.1 Coletas**

As coletas na bacia do RSF foram realizadas entre 2018 e 2020 nos trechos baixo e submédio, ao longo do canal principal do rio e afluentes. As coletas foram realizadas contemplando a maior diversidade de habitats possíveis, com dois tipos de petrechos: ativos (redes tipo redes-de-mão, e redes-de-arrasto), e passivos (redes de espera e armadilhas tipo covos), a fim de evitar a seletividade de cada arte de pesca, onde geralmente, apenas um determinado grupo de organismos é capturado, de acordo com o tamanho, hábitos e profundidade de ocorrência. As redes de espera, sempre que possível, foram deixadas de um dia para o outro. Um total de 122 espécimes, pertencentes a 33 espécies, foram coletadas, identificadas e depositadas pelos taxonomistas na coleção ictiológica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) (Tabela S1). Todos os exemplares foram georreferenciados e identificados até o menor nível taxonômico a partir de chaves de identificação ou trabalhos previamente publicados (Vari, 1992; Albert *et al.*, 1999; Castro & Vari, 2004; Zanata e Camelier, 2009).

Todos os peixes analisados neste estudo foram coletados sob a licença número 32656-1/2012, emitida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Os animais foram recolhidos e anestesiados por imersão em benzocaína 1% em água. Amostras de nadadeiras de cada indivíduo foram coletadas e armazenadas em

etanol absoluto para análise molecular, sendo depositadas no banco de tecidos do Laboratório de Sistemática Integrativa Molecular. Os exemplares foram posteriormente fixados em formol a 4% e armazenadas em etanol 70% na coleção da UFRN.

### **3.2.2 Amostras de DNA, PCR e sequenciamento**

O DNA genômico de todas as amostras foi extraído utilizando o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento do gene *cox1* foi amplificado via PCR usando primers universais *BarcFish1* e *BarcFish2* (Ward *et al.*, 2005). Todas as reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µl, contendo 12µl de 2X Taq master mix (Vivantis), 2µl de solução de DNA genômico com concentração variando entre 10 e 20ng/µl, 0,5µl de cada um dos primers (10mM) e 15µl de água ultrapura. As reações consistiram em uma etapa inicial de 2 minutos a 95°C, 35 ciclos de 30s a 94°C, 30 segundos a 57°C e 2 minutos a 72°C, com uma extensão final de 7 minutos nesta mesma temperatura, adaptado de Ward *et al.* (2005). Os produtos de PCR foram purificados com polietilenoglicol a 20% (PEG). O sequenciamento foi realizado com o kit *Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems) com primer M-13 e lido em um sequenciador Modelo ABI 3130 (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Bahia.

### **3.2.3 Obtenção de sequências do RSF em bancos de dados de domínio público**

A priori, foi realizada uma busca de espécies com ocorrência no RSF, baseada nas informações de Lima *et al.* (2017). Ao total, 598 sequências georreferenciadas do gene *cox1* das espécies provenientes da bacia do RSF foram obtidas no Bold Systems e no NCBI. Essas sequências foram obtidas e incorporadas ao nosso *dataset* para fins

comparativos. Para maiores detalhes sobre a distribuição das espécies, todas as coordenadas geográficas foram plotadas em um *shapefile* específico da bacia do RSF. Nesse arquivo, a bacia está subdivida em seus trechos alto, médio, submédio e baixo, de acordo com a Agência Nacional das Águas (Catálogo de metadados – Base Hidrográfica Ottocodificada da Bacia do Rio São Francisco).

### **3.2.4 Alinhamento, edição de sequências e cálculo de divergências genéticas intraespecíficas (DGIs)**

As sequências de cada espécie foram editadas e alinhadas separadamente utilizando o software *Geneious* (Kearse *et al.*, 2012). O alinhamento foi realizado por meio do pacote *Clustal Ômega* (Sievers & Higgins, 2014). As DGIs foram calculadas utilizando a *Nearest Neighbor Distance* (NND) com o modelo K2P, no software *MEGA11* (Tamura *et al.*, 2021), seguindo a rotina analítica do BOLD SYSTEMS, utilizando, *a priori*, um limiar de 2% (Ratnasingham & Hebert, 2007).

### **3.2.5 Filtro de divergências genéticas intraespecíficas máximas (DGIMAXs)**

No filtro de DGIMAXs, as variações genéticas intraespecíficas que apresentaram valores discrepantes, ou seja, acima de 2% pelo método de Distância do Vizinho Mais Próximo (NND, *Nearest-Neighbour Distance*), foram reavaliadas. Tal método considera a distância genética mínima entre uma espécie e sua espécie vizinha mais próxima para analisar os níveis da divergência genética (Pereira *et al.*, 2011). O principal objetivo foi investigar possíveis erros de identificação ou linhagens crípticas. Nesse contexto, utilizamos uma análise filogenética bayesiana com todos os congêneres com sequências disponíveis no Bold Systems e NCBI, pertencentes aquele táxon. *A priori*, assumimos como erros de identificação, sequências que se misturavam, agrupando-se com outras

espécies, com probabilidade posterior (PP) abaixo de 0.9, ou *clusters* relacionados àquela espécie que eram parafiléticos. Estes possíveis erros de identificação foram listados e então excluídos do nosso *dataset*. Por outro lado, agrupamentos com monofiletismo recíproco apresentando valores de PP acima de 0.9 e com divergências genéticas acima de 2% foram considerados linhagens crípticas. Aliados a esse limiar, também utilizamos alguns métodos de delimitação de linhagens.

### 3.2.6 Métodos de delimitação de linhagens

Para cada espécie com DGIMAX maior que 2%, foi estimado o melhor modelo evolutivo seguindo os valores do Critério de Informação Akaike (AIC, do inglês *Akaike Information Criterion*) no software *MEGA11* (Tamura *et al.*, 2021). Foi utilizado dois métodos de delimitação de linhagens, um método de delimitação baseado em árvore, o *Generalized Model Yule Coalescent* (GMYC) (Pons *et al.*, 2006), usando o servidor web GMYC (<http://species.h-its.org/gmyc/>), assumindo um único limiar. Para o GMYC, usamos uma árvore de *Maximum Clade Credibility* (MCC) não calibrada obtida no BEAST 1.10.4 (Suchard *et al.*, 2018), contendo apenas os haplótipos além de utilizar a árvore de Yule com relógio molecular lognormal relaxado. A análise compreendeu duas corridas independentes com 100 milhões de gerações para cada corrida. Os parâmetros foram amostrados a cada 5,000 gerações, e foi utilizado um *burn-in* de 10%. A convergência e o desempenho foram inspecionados usando o *Tracer 1.5* (Rambaut *et al.*, 2018), certificando-se de que todos os valores de *Effective Sample Size* (ESS) fossem superiores a 200.

O segundo método de delimitação de espécies utilizado foi baseado nos alinhamentos das sequências, sendo este o *Assemble Species by Automatic Partitioning* (ASAP) (Puillandre *et al.*, 2021), pela interface da web

(<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/>), utilizando o modelo de substituição de nucleotídeos K2P e os demais parâmetros foram definidos como padrão. O ASAP divide partições de espécies com base em distâncias genéticas de pares, e também calcula uma probabilidade de panmixia (p-val), uma métrica de largura de lacuna relativa (W) e classifica os resultados pela pontuação ASAP: quanto menor a pontuação, melhor a partição (Puillandre *et al.*, 2021). Os números de *Molecular Operational Taxonomic Units* (MOTUs), previstos pelos 1º e 2º ASAP scores, foram selecionados e comparados com outros métodos.

### 3.3 Resultados

Foram obtidas sequências do gene *cox1* de 720 espécimes da ictiofauna do RSF sendo 122 inéditas (dados primários) e 598 estando depositadas no Bold Systems/NCBI (dados secundários) (Tabela S1). A Figura 1 (Fig. 1) mostra o mapa de amostragem dessas espécies no RSF. O total de indivíduos pertencem a 90 espécies, hierarquizadas dentro de 74 gêneros, 28 famílias e seis ordens, Characiformes (40 espécies), Cyprinodontiformes (6 espécies), Gymnotiformes (3 espécies), Perciformes (4 espécies), Siluriformes (36 espécies) e Synbranchiformes (1 espécie). Os dados inéditos, são representados por 33 espécies, das quais 9 delas são endêmicas do RSF. O tamanho das sequências variou de 540 a 650 pb. As DGIMAXs obtidas pelo método K2P variaram de 0 a 9.3% (Tabela S2). Foi possível classificar as espécies de acordo com as DGIMAXs, de modo que o *dataset* foi dividido em três grupos: 74 espécies (82.22%) foram categorizadas em um grupo com valores inferiores a 1%; em outro grupo foram classificadas oito espécies (8.89%), variando entre 1% e 2%; e no terceiro grupo oito espécies (8.89%), com valores superiores a 2%.

Nossos resultados também detectaram prováveis erros de identificação que inflaram as DGIMAXs para algumas espécies. Além disso, tais espécies foram discriminadas por meio dos seus respectivos *Barcode Index Number* (BINs), onde algumas espécies se misturavam com outras, considerando que todos os pares são morfologicamente semelhantes entre si: *Phenacorhamdia tenebrosa* que foi erroneamente atribuída à *Cetopsorhamdia iheringi* (BIN AAD2018); *Imparfinis mirini*, em que houve confusão com *I. minutus* (BIN AAC2103); e *Characidium gomesi* confundida por *C. fasciatum* (BIN AAO5269).

A DGIMAX dentro de alguns táxons também foi superestimada, além dos casos de erros de identificação de espécies. Como ocorreu para o complexo de espécies envolvendo representantes do gênero *Astyanax* (*A. fasciatus* e *A. bimaculatus/lacustris*) e o ressurto gênero *Psalidodon* (*P. rivularis* e *P. fasciatus*). Análises filogenéticas e de divergência genética envolvendo representantes desses gêneros indicaram a presença de três clados (PP=1) (Fig. 2). Um clado constituído por representantes apenas de *Astyanax bimaculatus* (vermelho), que também tem sido sinonimizado como *A. lacustris*, com divergência genética de 7.1%. Um outro representado por *Astyanax fasciatus* (1%) (verde), e por fim um outro clado agrupando representantes de *A. bimaculatus*, *A. fasciatus*, *P. rivularis* e *P. fasciatus* (2.6%) (azul). Todos os três clados representados pelos trechos do alto ao baixo RSF. Esses clados detectados foram congruentes com os métodos de delimitação de linhagens (ASAP e GMYC).

Tendo em vistas que a bacia do RSF possui uma conexão artificial com a bacia do alto Paraná (rio Piumhi) (Moreira-Filho & Buckup, 2005), incluímos no nosso *dataset* sequências georreferenciadas do alto Paraná, visando detectar um possível caso de introdução de espécies, devido à alta divergência genética indicada no clado 1. Nossas análises revelaram a existência do agrupamento da sequência BAST412-12, do alto RSF,

com as sequências do alto Paraná, apresentando divergência genética de 0.09%, ao passo que, as sequências BAST463-12, BAST464-12 e BAST1111-13 agrupam-se junto com a sequência FUR1136-10 tendo divergência genética de 0.03%, originária do alto Paraná. Desse modo o clado 1 apresenta divergência elevada devido à presença das sequências do alto RSF, BAST412-12, BAST463-12, BAST464-12 e BAST1111-13. Além disso, nossas análises revelaram DGIMAXs acima de 2% em sete táxons (Fig. 3), sugerindo a presença de linhagens crípticas (Tab. 1). Avaliamos a diversidade genética da ictiofauna ao longo dos trechos do RSF para diversas espécies, de modo que sete delas apresentaram divergências entre 1 e 2% (Tab. 1), embora essas divergências não foram na maior parte detectadas entre os trechos, mas sim entre regiões adjacentes.

Para a análise de *S. hilarii* (2%), tendo em vista que espécimes do alto RSF apresentaram possíveis casos de introdução de espécies, foram incluídos em nosso *dataset* um conjunto de sequências georreferenciadas provenientes da bacia do alto Paraná. Dessa forma, visamos avaliar, para *S. hilarii*, uma conexão artificial da bacia do alto RSF com a bacia do alto Paraná (rio Piumhi) (Moreira-Filho & Buckup, 2005). Assim, ao retirar as sequências ANGBF14426-19, ANGBF14427-19, PBS025-15, PBS027-15 e PBS029-15, que agruparam em conjunto com sequências do alto Paraná, a divergência foi reduzida de 2% para 0.8%.

## **3.4 Discussão**

### **3.4.1 Eficácia do DNA barcode**

Considerando o número total de sequências analisadas em nosso estudo, a metodologia de DNA barcode foi muito eficaz em permitir a correta discriminação de

aproximadamente 98% das espécies da ictiofauna do RSF avaliada neste estudo. Considerando que foram excluídos os erros de identificação, confirmando, assim, a utilidade do DNA barcode como uma ferramenta efetiva para identificação de espécies. Essa eficiência tem sido também detectada em outros estudos com peixes neotropicais (Carvalho *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2011; Pugedo *et al.*, 2016). De um total de 178 espécies descritas para a bacia do rio São Francisco, 90 já possuem informações genéticas em bancos de dados de domínio público. Nesse contexto, nossos dados ampliam o conhecimento genético das espécies do RSF, contribuindo com informações genéticas inéditas de 33 espécies diferentes, sendo 25% delas endêmicas.

Quanto a distribuição das divergências genéticas intraespecíficas dentro das ordens, aquelas com maiores variações foram: Siluriformes (9.3% - *Pimelodela vittata*), seguida por Characiformes (7.1% - *Astyanax bimaculatus*) e por fim Gymnotiformes (4.8% - *Gymnotus carapo*). Nesse contexto, nossos dados revelaram distintos padrões de divergência genética em espécies de peixes que habitam diferentes trechos da bacia hidrográfica do RSF. Além dessas divergências, foi possível sinalizar potenciais erros de identificação que inflaram algumas distâncias genéticas, sugerindo incertezas taxonômicas, possivelmente relacionadas a complexos de espécies.

### **3.4.2 Erros de identificação de espécies**

Um dos casos de erros de identificação envolveu as espécies *C. iheringi* e *P. tenebrosa* que são morfologicamente similares e têm sido encontradas no alto e médio RSF (Bagley *et al.*, 2019; Carvalho *et al.*, 2011; Horodesky *et al.*, 2020). Esses bagres pertencem à família Heptapteridae, que possui dúvidas taxonômicas devido à presença de caracteres sobrepostos, além de contar com espécies que hibridizam em cativeiro

(Bockmann, 1998; Bockmann & Miquelarena, 2008; Bockmann & Slobodian, 2017; De Borba *et al.*, 2012; Ribolli *et al.*, 2017). De fato, essa família apresenta uma ampla diversidade, o que tem como consequência inúmeras proposições de complexos de espécies. Em destaque, estão as espécies ou gêneros mais especiosos, e com uma ampla distribuição geográfica, como é o caso dos gêneros *Cetopsorhamdia* e *Phenacorhamdia* (De Almeida *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2010). Apesar de tal dificuldade taxonômica, nosso estudo foi capaz de discernir sequências mal depositadas, em que espécimes de *C. iheringi* correspondem a espécimes de *P. tenebrosa*.

Outro gênero que pertence à família Heptapteridae, também taxonomicamente problemático, é *Imparfinis* (Bockmann & Guazzelli, 2003). Por exemplo, foi encontrada semelhanças citogenéticas e filogenéticas entre *I. minutus* e *I. mirini* oriundos dos rios Paraíba do Sul e Tietê. Também foi identificado um valor extremamente baixo de divergência genética entre as espécies *I. minutus* e *I. mirini*, variando de 0.8 a 1.2% para o *cox1* (Ferreira *et al.*, 2014). Esses resultados sugerem que estas espécies tenham passado por eventos históricos relacionados às conexões entre as bacias supracitadas, ocorrendo possível divergência populacional profunda, ou uma possível especiação recente (Ferreira *et al.*, 2014). Sendo assim, aliado às dificuldades morfológicas envolvendo a taxonomia de ambas as espécies, as divergências genéticas baixas podem também culminar em atribuições taxonômicas errôneas, como ocorreu para a família Loricariidae (Berbel-Filho *et al.*, 2018).

Dentro do grupo de erros de identificação que foram avaliados por nosso estudo, estão também as espécies *Characidium fasciatum* e *C. gomesi* (0.001%), de modo que nossas análises indicaram que elas se agrupam em um único clado. Dessa maneira, nossos resultados foram concordantes com um trabalho que utilizou sequências mitocondriais, dados cromossômicos e morfológicos para avaliar espécies de

*Characidium*, indicando a necessidade de revisões taxonômicas para esse grupo (Serrano *et al.*, 2019).

### 3.4.3 O caso do complexo de espécies *Astyanax/Psalidodon*

Além dos erros de identificação, nossos dados foram capazes de discriminar alguns grupos enigmáticos, como é o caso de um complexo envolvendo representantes dos gêneros *Astyanax/Psalidodon*. Um dos clados foi representado apenas por espécimes de *Astyanax bimaculatus/lacustris* com ocorrência desde o alto até o baixo RSF. Este clado apresentou uma divergência genética intraespecífica profunda (7.1%). Contudo tal divergência deve-se ao fato de que espécimes do alto RSF, na verdade, são geneticamente mais próximas de representantes da bacia do rio alto Paraná (0.009%).

O contato artificial entre o alto Paraná e o alto RSF remonta ao início da década de 1960, quando o rio Piumhi, afluente da bacia do Alto Paraná, foi transposto para a bacia do RSF, com a construção da Hidrelétrica de Furnas, no Estado de Minas Gerais (Moreira-Filho & Backup, 2005). Desse modo, têm sido documentados estudos genéticos envolvendo espécies do rio Paraná, ocorrendo agora na bacia do rio São Francisco. Um desses trabalhos detectou alguns citótipos intermediários em populações de *A. bimaculatus* que habitam a região de quebra de isolamento geográfico causada pela transposição (no rio Piumhi), formando uma zona híbrida (Peres *et al.*, 2012). Sob esse âmbito, a ocorrência desse espécime com alta divergência genética encontrado nos nossos resultados pode se dar devido uma possível introdução de espécies advindas dos efeitos dessa transposição. Esses efeitos de conexões artificiais podem propiciar tanto introdução de espécies exóticas, quanto afetar a diversidade genética de algumas espécies, principalmente aquelas de baixa vagilidade (Berbel-Filho *et al.*, 2016). Como foi o caso de *Parauchenipterus galeatus*, que sofreu um efeito de gargalo genético devido a

perda de seu habitat no local onde a transposição foi realizada (Lui *et al.*, 2012). Por outro lado, ao excluir a sequência que tem proximidade genética com a bacia do alto Paraná, a diversidade genética de *Astyanax bimaculatus/lacustris* foi reduzida para 3.7%.

A divergência genética profunda (3.7%), aqui detectada em *A. bimaculatus/lacustris*, revela a presença de linhagens crípticas envolvendo esse táxon, principalmente no alto RSF. Nessa região, existe uma reativação de falhas geológicas, presentes entre as cabeceiras da bacia do RSF, conhecidas por Descontinuidade Crustal do Alto São Francisco - DCARSF (Albert & Reis, 2011). Esses movimentos orogênicos podem ter culminado em eventos de captura de cabeceiras entre alguns afluentes que drenam a bacia do RSF, permitindo o isolamento de algumas populações, culminando em linhagens discrepantes que acumularam mutações genéticas acentuadas. Essas contínuas reativações da DCARSF, têm sido associadas a processos de diversificação nos gêneros *Salminus* e *Hyspostomus* (Hubert *et al.*, 2007; Montoya-Burgos, 2003), e pode ter ocorrido com *Astyanax bimaculatus/lacustris*.

Já o outro clado, foi constituído apenas por espécimes de *A. fasciatus* do alto ao baixo RSF. Sua divergência genética de 1%, nos leva a sugerir que esse táxon ocorre de maneira evolutivamente coesa, sem divergência genética acentuada. Os estudos morfológicos de *A. fasciatus* indicam que a aplicação desse epíteto específico ocorre somente nos casos de espécimes provenientes da bacia do RSF, como na descrição original de Cuvier (1819). Contudo, De Melo & Buckup (2006) relataram a existência de um complexo de espécies que engloba *A. fasciatus* ocorrendo fora da bacia do RSF, na bacia do rio Paraná. Além disso, nosso estudo detectou um caso emblemático envolvendo as espécies *A. fasciatus* e *A. bimaculatus* com as do gênero *Psalidodon* (*P. rivularis* e *P. fasciatus*). A divergência genética entre os clados variou de 2.9 a 7%. Sendo o clado vermelho o mais divergente. Já a divergência entre os clados verde e amarelo foi de 3.4%.

Nesse contexto, nossos dados revelam a presença de um complexo de espécies envolvendo os gêneros *Astyanax* e *Psalidodon*.

O gênero *Astyanax* já tem sido reconhecido por sua alta diversidade de espécies e diversidade críptica envolvendo diversos táxons, como é o caso dos complexos de espécies envolvendo *A. bimaculatus*, *A. fasciatus* e *A. scabripinnis* (De Melo & Buckup, 2006; Garutti & Langeani, 2009; Moreira-Filho & Bertollo, 1991). Assim, as espécies de *Astyanax* são reconhecidas como complexos de espécies em diversos trabalhos, pois são morfologicamente indistinguíveis entre si (De Melo & Buckup, 2006; Garutti & Langeani, 2009; Moreira-Filho & Carlos Bertollo, 1991; Zanata *et al.*, 2018). Já o gênero *Psalidodon* foi ressuscitado por Terán *et al.* (2020), como gênero monofilético válido, incluindo muitos táxons anteriormente classificados em *Astyanax*, constando a maioria das espécies dos grupos *A. eigenmanniorum*, *A. fasciatus*, *A. scabripinnis* e *A. dissimilis*. Dessa forma, nossos dados indicam algumas advertências taxonômicas e a necessidade de revisão envolvendo essas espécies na bacia do RSF, corroborando a dificuldade de identificar as espécies dos complexos *Astyanax* e *Psalidodon* (Rossini *et al.*, 2016; Terán *et al.*, 2020).

#### **3.4.4 Divergências genéticas entre 1 e 2%**

A menor distância desse grupo foi de 1% (*Leporinus piau*), já a maior foi de 1.9% (*Geophagus brasiliensis*). Casos de variações genéticas dentro desse limiar entre 1 e 2% podem indicar possíveis processos de estruturação populacional ao longo da bacia, como apontado em algumas espécies das bacias Neotropicais, a exemplo das da Amazônia, do Paraná e do Paranaíba, assim como dentro da bacia do RSF. Embora o *cox1* não seja a região mitocondrial mais indicada para detectar esses processos (De Abreu *et al.*, 2009; Hrbek *et al.*, 2018; Jacobina *et al.*, 2018; Pazza *et al.*, 2016).

Um outro caso de divergência populacional foi encontrado em *Salminus hilarii* que apresenta divergência genética, em nossos resultados do RSF, em torno de 2%. Alguns estudos têm relatado uma divergência genética de 1.7%, mas vale ressaltar que essa distância genética foi calculada entre duas linhagens distintas, uma exclusiva da bacia do RSF e outra formada por espécies da bacia do alto Paraná (Machado *et al.*, 2017). Dessa forma, sugerimos que possivelmente, a existência de uma baixa diversidade genética entre os espécimes de *S. hilarii* do alto RSF e do alto Paraná detectadas em nosso estudo pode ter ocorrido, ou por conexão artificial entre essas bacias, com a transposição do rio Piumhi, ou por processos de repovoamento do rio São Francisco (Moreira-Filho & Backup, 2005; Coimbra *et al.*, 2020; Honji *et al.*, 2011).

No RSF, avaliações da diversidade genética com outros marcadores mais variáveis, tais quais os microssatélites, têm sido acessadas em algumas espécies de peixes migradores, detectando estruturas populacionais ao longo da bacia. Tal diversidade detectada tem sido associada tanto a processos históricos, como mudanças no curso do RSF, bem como a processos antrópicos por meio dos barramentos (Coimbra *et al.*, 2020; Farias *et al.*, 2020; Oliveira-Farias *et al.*, 2022). A bacia do RSF possui uma geomorfologia complexa, devido à ocorrência de capturas de cabeceira e remodelações que levaram a mudanças em seu curso, o que culminou em conexões com outras bacias em determinados momentos, e em isolamentos em outros períodos, o que pode ter levado as divergências genéticas em diferentes táxons, como as apontadas por nosso estudo (Fernandes *et al.*, 2022; Machado *et al.*, 2018).

### **3.4.5 Biodiversidade oculta (divergências genéticas superiores a 2%)**

Possíveis casos de linhagens crípticas (espécies pouco estudadas, e por isso não distinguíveis morfológicamente, mas com grande diferenciação genética) com

DGIMAX>2% foram detectados em sete espécies dentro da bacia do RSF. Inserido nesse grupo estão *Synbranchus marmoratus*, *Rhamdia quelen* e *Gymnotus carapo*, que constituem espécies com ampla distribuição geográfica na região Neotropical, tendo passado por reformulações taxonômicas, de modo que são consideradas complexos de espécies (Martinez *et al.*, 2011; Milhomem *et al.*, 2008; Utsunomia *et al.*, 2014), o que poderia explicar suas divergências genéticas profundas no RSF. A exemplo, recentemente uma nova espécie, *G. darwini*, foi descrita para as bacias costeiras do Nordeste (Campos-Da-Paz & Santana, 2019). Possivelmente, a distância elevada encontrada em *G. carapo* pode estar relacionada a presença dessas duas espécies nessa bacia.

A especiação críptica descrita para *Piabina argentea* por Carvalho *et al.* (2011) ainda permanece um caso singular a ser melhor esclarecido sob o ponto de vista evolutivo. Em relação a essa espécie, foram adicionadas sequências do *cox1* além daquelas disponibilizadas pelo trabalho citado anteriormente, de modo que foram incluídos outros estudos no RSF. Ainda, Carvalho *et al.* (2011), citam os casos de *P. vittata* e *P. hollandi* como espécies com divergências genéticas profundas de 9.3% e 2.2%, respectivamente, corroboradas em nossas análises. O *dataset* de *P. vittata* aqui avaliado foi o mesmo do trabalho anterior, já para *P. hollandi* foram adicionados espécimes inéditos do baixo e submédio RSF. As divergências genéticas elevadas aqui observadas têm como justificativa mais plausível uma provável relação com a baixa vagilidade dessas duas últimas espécies.

Costa *et al.* (2012, 2018), por exemplo, utilizando abordagens taxonomia integrativa, encontraram um caso de complexo de espécies envolvendo peixes anuais do gênero *Hypsolebias*, endêmicos do rio São Francisco. Embora nossos dados não apontem para espécies anuais com divergências elevadas, houve a detecção de um outro caso de divergência profunda (2.2 %) envolvendo *Hyphessobrycon santae*, uma espécie também

com baixa vagilidade entre os trechos do alto, submédio e baixo RSF. Nesse contexto, nossos resultados destacam que processos de especiação podem ocorrer dentro do RSF. Algumas evidências em outras bacias Neotropicais têm sugerido processos de especiação advindos de múltiplas invasões de bacias distintas, ou segmentação de populações em uma mesma bacia (Abreu *et al.*, 2020). Estes processos foram encontrados na Amazônia (gênero *Nannostomus*) e na bacia do Paraná-Paraguai (Benzaquem *et al.*, 2015; Díaz *et al.*, 2016; Guimarães *et al.*, 2018), o que pode ocorrer também para o RSF. No ambiente de água doce, assim como no marinho, a conectividade hídrica não indica que haja necessariamente dispersão facilitada para organismos aquáticos (Bessonart *et al.*, 2021; Hirschmann *et al.*, 2015; Winemiller *et al.*, 2008). Portanto, existem sinais genéticos específicos gerados pela ação de barreiras e pelas dinâmicas geohidrológicas entre as bacias, que são de difícil detecção apenas pela morfologia (Bignotto *et al.*, 2020; Machado *et al.*, 2018).

### **3.5 Considerações Finais**

As informações obtidas por este estudo contribuem significativamente para o preenchimento de lacunas de conhecimento Linneano e Darwiniano, fornecendo importantes informações sobre a diversidade genética evolutiva e taxonômica da ictiofauna da bacia do rio São Francisco. Além disso, os resultados também indicam que múltiplos processos históricos e antrópicos afetaram a diversificação dos táxons ao longo da bacia. A alta divergência genética encontrada em algumas espécies, sugere que eventos geológicos e hidrológicos podem ter influenciado a diversificação em alguns táxons, principalmente aqueles com baixa vagilidade. Além disso, vale destacar que as ações antrópicas, como as conexões artificiais também tem afetado a diversidade genética dessa ictiofauna. Nesse contexto, espera-se que o conhecimento gerado por este estudo possa ser utilizado como auxílio na elaboração e atualização de planos de manejo

e conservação da ictiofauna do RSF, considerando especialmente a importância das linhagens crípticas aqui detectadas. Dessa forma, espera-se contribuir para a conservação da biodiversidade dessa importante bacia hidrográfica neotropical.

## **Conclusões**

Esta Dissertação contribui para a compreensão do conhecimento atual sobre a ictiofauna do RSF, resumindo as principais lacunas de conhecimento e processos que afetam a diversidade de peixes na bacia. Com base no mapa de amostragem das espécies obtido, podemos sugerir a priorização de esforços de amostragem em áreas ainda pouco estudadas, como o trecho médio do RSF. Além disso, as diversidades genéticas e evolutivas identificadas na ictiofauna podem ser valiosas para a elaboração de planos de manejo e conservação específicos para as espécies de peixes em diferentes trechos do RSF. Esperamos que essas informações possam ser utilizadas de forma efetiva na conservação dessa biodiversidade negligenciada, como é o caso da bacia hidrográfica do rio São Francisco.

## REFERÊNCIAS

- Abreu, J. M. S., Waltz, B. T., Albert, J. S., & Piorski, N. M. (2020). Genetic differentiation through dispersal and isolation in two freshwater fish species from coastal basins of northeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 18(3). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2019-0114>
- Albert, J. S., & Reis, R. E. (2011). Historical biogeography of neotropical freshwater fishes. In *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01766.x>
- Allen, G. H., & Pavelsky, T. M. (2018). Global extent of rivers and streams. *Science*, 361(6402), 585-588. <https://doi.org/10.1126/science.aat0636>
- Assis, D. A. S. de, Dias-Filho, V. A., Magalhães, A. L. B., & Brito, M. F. G. (2017). Establishment of the non-native fish *Metynnis lippincottianus* (Cope 1870) (Characiformes: Serrasalminidae) in lower São Francisco River, northeastern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 52(3), 228–238. <https://doi.org/10.1080/01650521.2017.1348057>
- Bagley, J. C., de Aquino, P. D. P. U., Breitman, M. F., Langeani, F., & Colli, G. R. (2019). DNA barcode and minibarcode identification of freshwater fishes from Cerrado headwater streams in Central Brazil. *Journal of Fish Biology*, 95(4). <https://doi.org/10.1111/jfb.14098>
- Benzaquem, D. C., Oliveira, C., Da Silva Batista, J., Zuanon, J., & Porto, J. I. R. (2015). DNA barcoding in pencilfishes (Lebiasinidae: Nannostomus) reveals cryptic diversity across the Brazilian Amazon. *PLoS ONE*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112217>
- Berbel-Filho, W. M., Martinez, P. A., Ramos, T. P. A., Torres, R. A., & Lima, S. M. Q. (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(1). <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2440-9>
- Berbel-Filho, W. M., Ramos, T. P. A., Jacobina, U. P., Maia, D. J. G., Torres, R. A., & Lima, S. M. Q. (2018). Updated checklist and DNA barcode-based species delimitations reveal taxonomic uncertainties among freshwater fishes from the mid-north-eastern Caatinga ecoregion, north-eastern Brazil. *Journal of Fish Biology*, 93(2). <https://doi.org/10.1111/jfb.13758>
- Bessonart, J., Loureiro, M., Guerrero, J. C., & Szumik, C. (2021). Distribution of freshwater fish from the Southern Neotropics reveals three new areas of endemism and show diffuse limits among freshwater ecoregions. *Neotropical Ichthyology*, 19(4). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2020-0153>
- Bezerra, L. A. V., Freitas, M. O., Daga, V. S., Occhi, T. V. T., Faria, L., Costa, A. P. L., Padial, A. A., Prodocimo, V., & Vitule, J. R. S. (2019). A network meta-analysis of threats to South American fish biodiversity. *Fish and Fisheries*, 20(4), 620–639.

<https://doi.org/10.1111/FAF.12365>

- Bignotto, T. S., Maniglia, T. C., Gomes, V. N., de Oliveira, I. J., Agostinho, C. S., Prioli, S. M. A. P., & Prioli, A. J. (2020). Genetic evidence for a species complex within the piranha *Serrasalmus maculatus* (Characiformes, serrasalmidae) from three neotropical river basins based on mitochondrial DNA sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 43(1). <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2018-0131>
- Bini, L. M., Diniz-Filho, J. A. F., Rangel, T. F., Bastos, R. P., & Pinto, M. P. (2006). Challenging Wallacean and Linnean shortfalls: knowledge gradients and conservation planning in a biodiversity hotspot. *Diversity and distributions*, 12(5), 475-482. <https://doi.org/10.1111/j.1366-9516.2006.00286.x>
- Bockmann, F. A. (1998). *Análise filogenética da família heptapteridae (Teleostei, Ostariophysi, Siluriformes) e redefinição de seus gêneros*. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Bockmann, F. A., & Miquelarena, A. M. (2008). Anatomy and phylogenetic relationships of a new catfish species from northeastern Argentina with comments on the phylogenetic relationships of the genus *Rhamdella* Eigenmann and Eigenmann 1888 (Siluriformes, Heptapteridae). *Zootaxa*, 1780(1), 1-54. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1780.1.1>
- Bockmann, F. A., & Slobodian, V. (2017). Family Heptapteridae – Three-barbeled catfishes. In P. van der Sleen, & J. S. Albert (Eds.). *Field guide to the fishes of the Amazon, Orinoco, and Guianas* (pp. 233–252). Princeton University Press.
- Campos-Da-Paz, R., & Santana, C. D. De. (2019). A New Species of the Electric Knifefish *Gymnotus Linnaeus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) from Northeastern Brazil. *Copeia*, 107(1). <https://doi.org/10.1643/CI-18-141>
- Cardoso, P., Erwin, T. L., Borges, P. A., & New, T. R. (2011). The seven impediments in invertebrate conservation and how to overcome them. *Biological Conservation*, 144(11), 2647-2655. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.07.024>
- Carvalho, D. C., Oliveira, D. A., Pompeu, P. S., Leal, C. G., Oliveira, C., & Hanner, R. (2011). Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial Dna*, 22(sup1), 80-86. <https://doi.org/10.3109/19401736.2011.588214>
- Coimbra, M. R. M., Dantas, H. L., Luna, M. M. S., Lima, M. A., Sales, M., da Silva, B. C. N. R., & Lima, A. P. S. (2020). High gene flow in two migratory Neotropical fish species, *Salminus franciscanus* and *Brycon orthotaenia*, and implications for conservation aquaculture. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 30(6). <https://doi.org/10.1002/aqc.3336>
- Collen, B., Ram, M., Zamin, T., & McRae, L. (2008). The tropical biodiversity data gap: addressing disparity in global monitoring. *Tropical Conservation Science*, 1(2), 75-88. <https://doi.org/10.1177/194008290800100202>
- Costa, W. J. E. M., Amorim, P. F., & Mattos, J. L. O. (2012). Species delimitation in annual killifishes from the Brazilian Caatinga, the *Hypsolebias flavicaudatus* complex

- (Cyprinodontiformes: Rivulidae): Implications for taxonomy and conservation. *Systematics and Biodiversity*, 10(1). <https://doi.org/10.1080/14772000.2012.664177>
- Costa, W. J. E. M. (2014). Six new species of seasonal killifishes of the genus *Cynolebias* from the São Francisco river basin, Brazilian Caatinga, with notes on *C. porosus*. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 25(1), 79-96.
- Costa, W. J. E. M., Amorim, P. F., & Mattos, J. L. O. (2018). Cryptic species diversity in the *Hypsoblebias magnificus* complex, a clade of endangered seasonal killifishes from the São Francisco River Basin, Brazilian Caatinga (Cyprinodontiformes, Aplocheilidae). *ZooKeys*, 2018(777). <https://doi.org/10.3897/zookeys.777.25058>
- De Abreu, M. M., Pereira, L. H. G., Vila, V. B., Foresti, F., & Oliveira, C. (2009). Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguay River Basin. *Genetics and Molecular Biology*, 32(4). <https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000075>
- De Almeida, F. S., Koelblinger Sodre, L. M., & Betioli Contel, E. P. (2003). Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). *Genetics and Molecular Biology*, 26(3). <https://doi.org/10.1590/s1415-47572003000300014>
- De Borba, R. S., da Silva, E. L., Pacheco, A. C. S., Parise-Maltempi, P. P., & Alves, A. L. (2012). Trends in the karyotypic evolution of the Neotropical catfish family Heptapteridae Bockmann 1998 (Teleostei: Siluriformes). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22(2). <https://doi.org/10.1007/s11160-011-9245-3>
- De Melo, F. A. G., & Buckup, P. A. (2006). *Astyanax henseli*, a new name for *Tetragonopterus aeneus* Hensel, 1870 from southern Brazil (Teleostei: Characiformes). *Neotropical Ichthyology*, 4(1). <https://doi.org/10.1590/s1679-62252006000100003>
- Díaz, J., Villanova, G. V., Brancolini, F., Pazo, F. Del, Posner, V. M., Grimberg, A., & Arranz, S. E. (2016). First DNA barcode reference library for the identification of south American freshwater fish from the lower paraná river. *PLoS ONE*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157419>
- Farias, R. S., Silva, B. C. N. R., Nascimento, W. V. G., Silva, G. C., Luz, R. K., Prosdocimi, F., Figueiredo, R. A. C. R., Carvalho, D. C., & Coimbra, M. R. M. (2020). Genetic diversity and aquaculture conservation for a threatened Neotropical catfish. *Neotropical Ichthyology*, 18(3), 1–22. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2020-0028>
- Fernandes, M. F., Cardoso, D., Pennington, R. T., & de Queiroz, L. P. (2022). The Origins and Historical Assembly of the Brazilian Caatinga Seasonally Dry Tropical Forests. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.723286>
- Ferreira, M., Kavalco, K. F., De Almeida-Toledo, L. F., & Garcia, C. (2014). Cryptic diversity between two imparfinis species (siluriformes, heptapteridae) by cytogenetic analysis and DNA barcoding. *Zebrafish*, 11(4). <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.0981>
- Freitas, P. V., Montag, L. F. A., Ilha, P., Torres, N. R., Maia, C., Deegan, L., Nascimento, A. T., & Silva, K. D. (2021). Local effects of deforestation on stream fish assemblages

- in the amazon-savannah transitional area. *Neotropical Ichthyology*, 19(3). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2021-0098>
- Freitas, T. M. D. S., Stropp, J., Calegari, B. B., Calatayud, J., De Marco Jr, P., Montag, L. F. D. A., & Hortal, J. (2021). Quantifying shortfalls in the knowledge on Neotropical Auchenipteridae fishes. *Fish and Fisheries*, 22(1), 87-104. <https://doi.org/10.1111/faf.12507>
- Garcia, C., Oliveira, C., & Almeida-Toledo, L. F. (2010). Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. *Genetics and Molecular Research : GMR*, 9(1). <https://doi.org/10.4238/vol9-1gmr750>
- Garutti, V., & Langeani, F. (2009). Redescription of *Astyanax goyacensis* Eigenmann, 1908 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 7(3). <https://doi.org/10.1590/S1679-62252009000300003>
- Gomes, L. C., Pessali, T. C., Sales, N. G., Pompeu, P. S., & Carvalho, D. C. (2015). Integrative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a neotropical river basin. *Genetica* 2015 143:5, 143(5), 581–588. <https://doi.org/10.1007/S10709-015-9856-Z>
- Harrison, I., Darwall, W., Lee, R. R., Muruven, D., Revenga, C., Claussen, J., Lynch, A., Pinder, A., Abell, R., Martinelli, P., Baltzer, M., Thieme, M., Jähnig, S., Opperman, J., Wanningen, H., Monroe, J., Patricio, H., Fish, F., Freefall, I. N., ... Gollock, M. (2021). The World's Forgotten Fishes. *World Wide Fund for Nature (WWF)*, 48. [www.panda.org](http://www.panda.org)
- Hirschmann, A., Malabarba, L. R., Thomaz, A. T., & Fagundes, N. J. R. (2015). Riverine habitat specificity constrains dispersion in a Neotropical fish (Characidae) along Southern Brazilian drainages. *Zoologica Scripta*, 44(4). <https://doi.org/10.1111/zsc.12106>
- Honji, R. M., Mello, P. H., Araújo, B. C., Rodrigues-Filho, J. A., Hilsdorf, A. W. S., & Moreira, R. G. (2011). Influence of spawning procedure on gametes fertilization success in *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae): Implications for the conservation of this species. *Neotropical Ichthyology*, 9(2). <https://doi.org/10.1590/S1679-62252011005000012>
- Horodesky, A., Castilho-Westphal, G. G., Hungria, D. B., Nascimento, D., Ratton, E., Abilhoa, V., & Ostrensky, A. (2020). Fish diversity in three tributaries of the São Francisco river, Brazil. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 8(2). <https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v8n2.horodesky>
- Hortal, J., de Bello, F., Diniz-Filho, J. A. F., Lewinsohn, T. M., Lobo, J. M., & Ladle, R. J. (2015). Seven shortfalls that beset large-scale knowledge of biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 46, 523-549. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-112414-054400>
- Hrbek, T., Meliciano, N. V., Zuanon, J., & Farias, I. P. (2018). Remarkable geographic structuring of rheophilic fishes of the lower Araguaia River. *Frontiers in Genetics*,

- 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00295>
- Hubert, N., Duponchelle, F., Nuñez, J., Garcia-Davila, C., Paugy, D., & Renno, J. F. (2007). Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: Implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, *16*(10). <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03267.x>
- Ilha, P., Rosso, S., & Schiesari, L. (2019). Effects of deforestation on headwater stream fish assemblages in the Upper Xingu River Basin, Southeastern Amazonia. *Neotropical Ichthyology*, *17*(1), 180099. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20180099>
- Jacobina, U. P., Lima, S. M. Q., Maia, D. G., Souza, G., Batalha-Filho, H., & Torres, R. A. (2018). DNA barcode sheds light on systematics and evolution of neotropical freshwater trahiras. *Genetica* *2018* *146*:6, *146*(6), 505–515. <https://doi.org/10.1007/S10709-018-0043-X>
- Jardine, T. D., Woods, R., Marshall, J., Fawcett, J., Lobegeiger, J., Valdez, D., & Kainz, M. J. (2015). Reconciling the role of organic matter pathways in aquatic food webs by measuring multiple tracers in individuals. *Ecology*, *96*(12), 3257–3269. <https://doi.org/10.1890/14-2153.1>
- Jörger, K. M., & Schrödl, M. (2013). How to describe a cryptic species? Practical challenges of molecular taxonomy. *Frontiers in Zoology*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-59>
- Knoppers, B., Medeiros, P. R. P., Souza, W. F. L. de, & Jennerjahn, T. (2005). *The São Francisco Estuary, Brazil*. 51–70. [https://doi.org/10.1007/698\\_5\\_026](https://doi.org/10.1007/698_5_026)
- Lévêque, C., Balian, E. V., & Martens, K. (2005). An assessment of animal species diversity in continental waters. *Hydrobiologia*, *542*, 39-67. <https://doi.org/10.1007/s10750-004-5522-7>
- Lima, S. M. Q., Ramos, T. P. A., da Silva, M. J., & Rosa, R. de S. (2018). Diversity, distribution, and conservation of the Caatinga fishes: Advances and challenges. In *Caatinga: The Largest Tropical Dry Forest Region in South America* (pp. 97–131). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-68339-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-68339-3_4)
- Lima, L. B., De Marco Junior, P., & Lima-Junior, D. P. (2021). Trends and gaps in studies of stream-dwelling fish in Brazil. *Hydrobiologia*, *848*(17), 3955-3968. <https://doi.org/10.1007/s10750-021-04616-8>
- Lobo, J. M., Baselga, A., Hortal, J., Jiménez-Valverde, A., & Gómez, J. F. (2007). How does the knowledge about the spatial distribution of Iberian dung beetle species accumulate over time? *Diversity and Distributions*, *13*(6), 772-780. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2007.00383.x>
- Lui, R. L., Blanco, D. R., Margarido, V. P., Campos E Silva Kuhn, G., Gomes, V. N., Prioli, A. J., & Moreira-Filho, O. (2012). A recent transposition of river involving Paraná and São Francisco basins: Effects on the genetic variability and structure of the neotropical fish *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes, Auchenipteridae). *Mitochondrial DNA*, *23*(5). <https://doi.org/10.3109/19401736.2012.690747>

- Machado, C. B., Galetti, P. M., & Carnaval, A. C. (2018). Bayesian analyses detect a history of both vicariance and geodispersal in Neotropical freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, 45(6). <https://doi.org/10.1111/jbi.13207>
- Machado, C. D. B., Ishizuka, T. K., Freitas, P. D. De, Valiati, V. H., & Galetti, P. M. (2017). DNA barcoding reveals taxonomic uncertainty in Salminus (Characiformes). *Systematics and Biodiversity*, 15(4). <https://doi.org/10.1080/14772000.2016.1254390>
- Machado, V. N., Collins, R. A., Ota, R. P., Andrade, M. C., Farias, I. P., & Hrbek, T. (2018). One thousand DNA barcodes of piranhas and pacus reveal geographic structure and unrecognised diversity in the Amazon. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26550-x>
- Martinez, J. F., Lui, R. L., Blanco, D. R., Traldi, J. B., Silva, L. F., Venere, P. C., Souza, I. L., & Moreira-Filho, O. (2011). Comparative cytogenetics of three populations from the Rhamdia quelen species complex (Siluriformes, Heptapteridae) in two Brazilian hydrographic basins. *Caryologia*, 64(1). <https://doi.org/10.1080/00087114.2011.10589772>
- Milhomem, S. S. R., Pieczarka, J. C., Crampton, W. G. R., Silva, D. S., De Souza, A. C. P., Carvalho, J. R., & Nagamachi, C. Y. (2008). Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the Gymnotus carapo species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). *BMC Genetics*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-9-75>
- Montoya-Burgos, J. I. (2003). Historical biogeography of the catfish genus Hypostomus (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, 12(7). <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01857.x>
- Moreira-Filho, O., & Carlos Bertollo, L. A. (1991). Astyanax scabripinnis (Pisces, Characidae): A species complex. *Revista Brasileira de Genetica*, 14(2).
- Moreira-Filho, O., & Buckup, P. A. (2005). A poorly known case of watershed transposition between the São Francisco and upper Paraná river basins. *Neotropical Ichthyology*, 3(3). <https://doi.org/10.1590/s1679-62252005000300015>
- O'Hanley, J. R., Pompeu, P. S., Louzada, M., Zambaldi, L. P., & Kemp, P. S. (2020). Optimizing hydropower dam location and removal in the São Francisco river basin, Brazil to balance hydropower and river biodiversity tradeoffs. *Landscape and Urban Planning*, 195, 103725. <https://doi.org/10.1016/J.LANDURBPLAN.2019.103725>
- Oliveira, U., Paglia, A. P., Brescovit, A. D., de Carvalho, C. J., Silva, D. P., Rezende, D. T., ... & Santos, A. J. (2016). The strong influence of collection bias on biodiversity knowledge shortfalls of Brazilian terrestrial biodiversity. *Diversity and Distributions*, 22(12), 1232-1244. <https://doi.org/10.1111/ddi.12489>
- Oliveira-Farias, K. K. C., Farias, R. S., Neto, M. A. S., de Souza, M. E., Calado, L. L., Montes, M. A., Lima, A. P. S., Martinez, P., & Coimbra, M. R. M. (2022). Genetic structure and management of the Neotropical migratory fish Megaleporinus obtusidens on a highly impacted river basin. *Hydrobiologia*, 849(7). <https://doi.org/10.1007/s10750->

022-04808-w

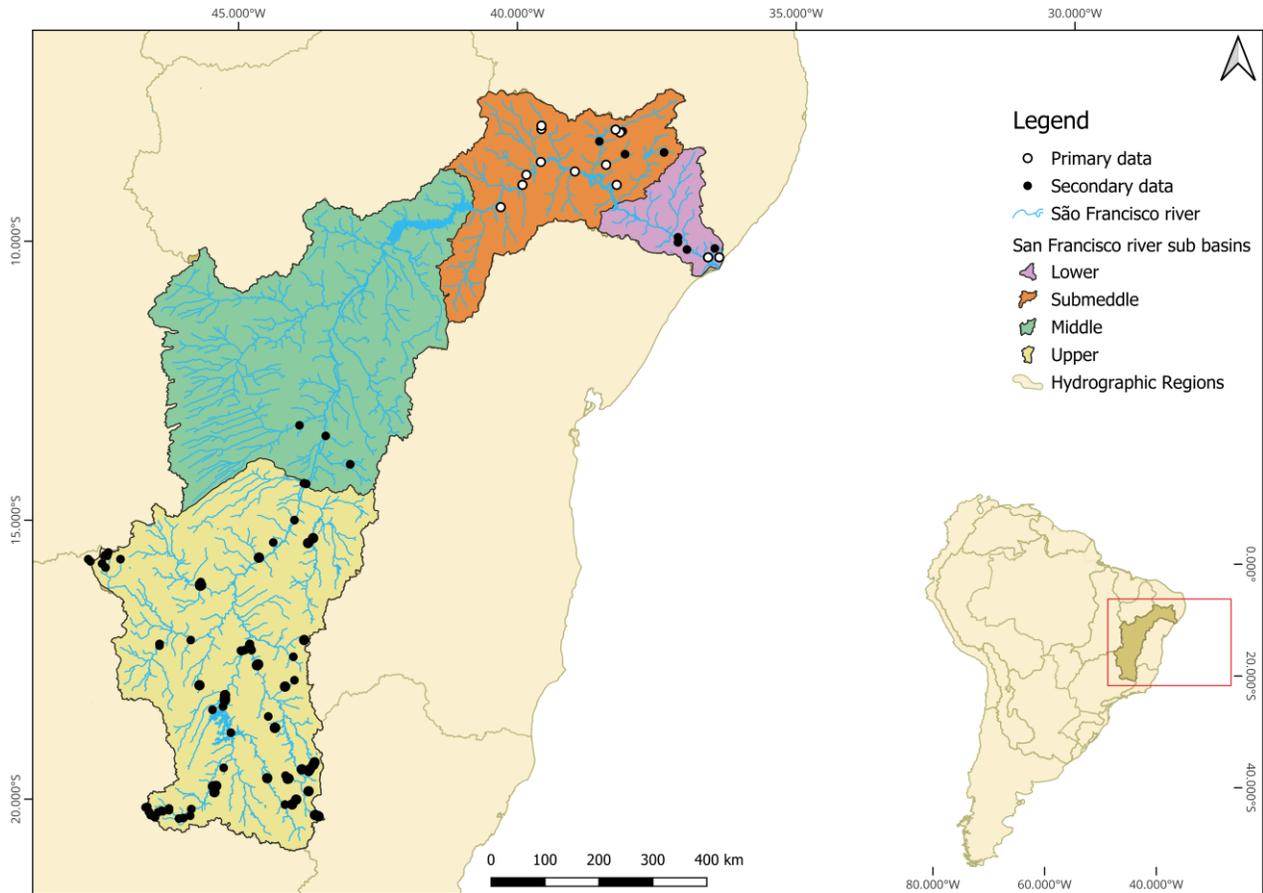
- Pazza, R., Argento, R. F. M., Mariano, I. H. S., & Kavalco, K. F. (2016). Phenotypic plasticity and karyotype conservation in allopatric populations of *Astyanax aff. fasciatus* (Teleostei, Characiformes) at the Upper Paraná river basin. *Acta Zoologica*, *97*(2). <https://doi.org/10.1111/azo.12120>
- Pereira, L. H. G., Castro, J. R. C., Vargas, P. M. H., Gomez, J. A. M., & Oliveira, C. (2021). The use of an integrative approach to improve accuracy of species identification and detection of new species in studies of stream fish diversity. *Genetica*, *149*(2). <https://doi.org/10.1007/s10709-021-00118-6>
- Pereira, L. H. G., Maia, G. M. G., Hanner, R., Foresti, F., & Oliveira, C. (2011). DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. <Http://Dx.Doi.Org/10.3109/19401736.2010.532213>, *22*(SUPPL. 1), 71–79. <https://doi.org/10.3109/19401736.2010.532213>
- Pereira, L. H., Hanner, R., Foresti, F., & Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics* *2013* *14*:1, *14*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-20>
- Peres, W. A. M., Bertollo, L. A. C., Buckup, P. A., Blanco, D. R., Kantek, D. L. Z., & Moreira-Filho, O. (2012). Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition: Karyotypic evidence in *Astyanax* “bimaculatus group” (Characiformes: Characidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, *22*(2). <https://doi.org/10.1007/s11160-011-9246-2>
- Plano de Ação Nacional para a Conservação das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna Aquática da bacia do rio São Francisco - PAN São Francisco. Serviço Público Federal, Ministério do Meio Ambiente, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Portaria Nº 34, de 27 de maio de 2015.
- Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W. D., & Vogler, A. P. (2006). Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, *55*(4). <https://doi.org/10.1080/10635150600852011>
- Pugedo, M. L., Neto, F. R. de A., Pessali, T. C., Birindelli, J. L. O., & Carvalho, D. C. (2016). Integrative taxonomy supports new candidate fish species in a poorly studied neotropical region: the Jequitinhonha River Basin. *Genetica* *2016* *144*:3, *144*(3), 341–349. <https://doi.org/10.1007/S10709-016-9903-4>
- Puillandre, N., Brouillet, S., & Achaz, G. (2021). ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, *21*(2). <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281>
- Ramirez, J. L., Birindelli, J. L., Carvalho, D. C., Affonso, P. R. A. M., Venere, P. C., Ortega, H., Carrillo-Avila, M., Rodríguez-Pulido, J. A., & Galetti, P. M. (2017). Revealing hidden diversity of the underestimated neotropical ichthyofauna: DNA barcoding in the recently described genus *Megaleporinus* (characiformes: Anostomidae). *Frontiers in Genetics*,

- 8(OCT). <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00149>
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355–364. <https://doi.org/10.1111/J.1471-8286.2007.01678.X>
- Ribolli, J., Scaranto, B. M., Shibatta, O. A., Bombardelli, R. A., & Zaniboni-Filho, E. (2017). DNA barcoding confirms the occurrence of *Rhamdia branneri* and *Rhamdia voulezi* (Siluriformes: Heptapteridae) in the Iguaçu River Basin. *Neotropical Ichthyology*, 15.
- Rossini, B. C., Oliveira, C. A. M., Gonçalves De Melo, F. A., De Araújo Jo Bertaco, V., Díaz De Astarloa, J. M., Rosso, J. J., Foresti, F., & Oliveira, C. (2016). Highlighting *Astyanax* species diversity through DNA barcoding. *PLoS ONE*, 11(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167203>
- Sabo, J. L., Ruhi, A., Holtgrieve, G. W., Elliott, V., Arias, M. E., Ngor, P. B., Räsänen, T. A., & Nam, S. (2017). Designing river flows to improve food security futures in the Lower Mekong Basin. *Science*, 358(6368). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAO1053>
- Sánchez-Fernández, D., Lobo, J. M., Abellán, P., Ribera, I., & Millán, A. (2008). Bias in freshwater biodiversity sampling: the case of Iberian water beetles. *Diversity and Distributions*, 14(5), 754-762. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2008.00474.x>
- Santos, L. C. M., Matos, H. R., Schaeffer-Novelli, Y., Cunha-Lignon, M., Bitencourt, M. D., Koedam, N., & Dahdouh-Guebas, F. (2014). Anthropogenic activities on mangrove areas (São Francisco River Estuary, Brazil Northeast): A GIS-based analysis of CBERS and SPOT images to aid in local management. *Ocean & Coastal Management*, 89, 39–50. <https://doi.org/10.1016/J.OCECOAMAN.2013.12.010>
- Serrano, É. A., Melo, B. F., Freitas-Souza, D., Oliveira, M. L. M., Utsunomia, R., Oliveira, C., & Foresti, F. (2019). Species delimitation in Neotropical fishes of the genus *Characidium* (Teleostei, Characiformes). *Zoologica Scripta*, 48(1). <https://doi.org/10.1111/zsc.12318>
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal Omega. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2014. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0313s48>
- Silva, M. J., Ramos, T. P. A., Carvalho, F. R., Brito, M. F. G., Ramos, R. T. C., Rosa, R. S., Sánchez-Botero, J. I., Novaes, J. L. C., Costa, R. S., & Lima, S. M. Q. (2020). Freshwater fish richness baseline from the São Francisco Interbasin Water TranRSFer Project in the Brazilian Semiarid. *Neotropical Ichthyology*, 18(4). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2020-0063>
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*, 4(1). <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAB120>
- Terán, G. E., Benitez, M. F., & Mirande, J. M. (2020). Opening the Trojan horse: Phylogeny

of *Astyanax*, two new genera and resurrection of *Psalidodon* (Teleostei: Characidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 190(4). <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlaa019>

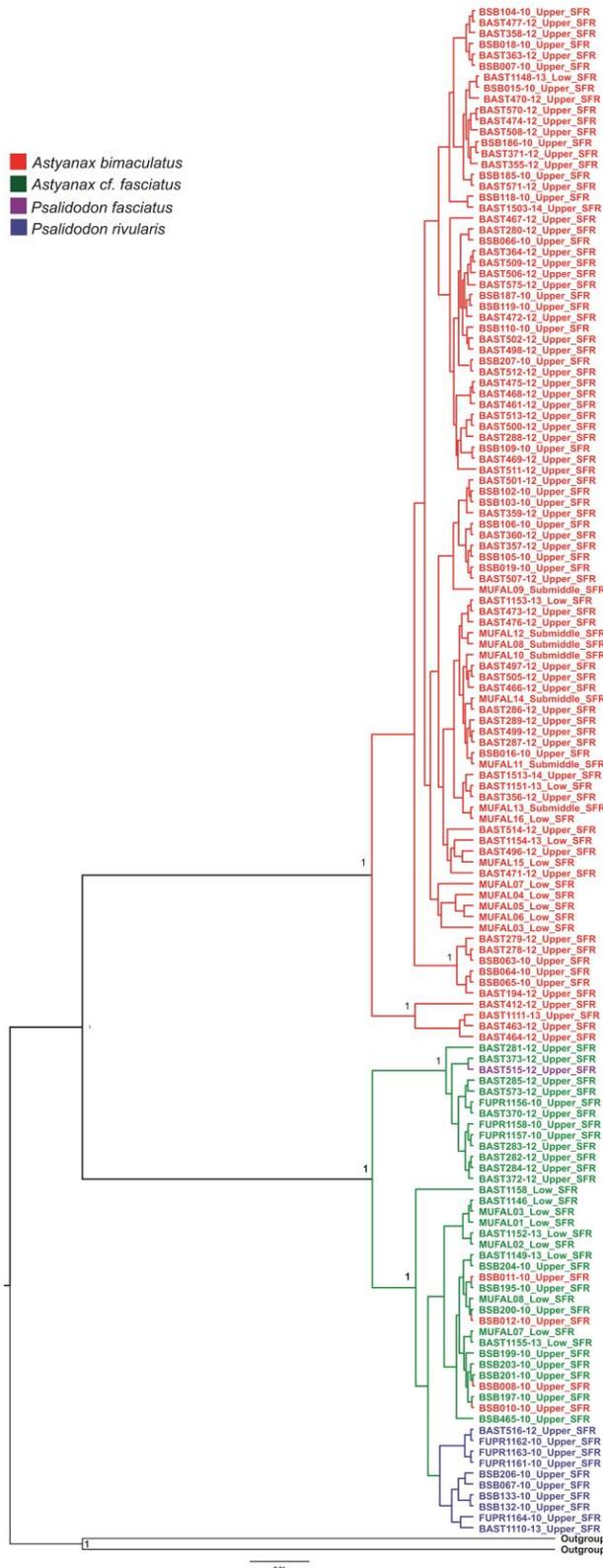
- Utsunomia, R., Pansonato-Alves, J. C., Costa-Silva, G. J., Mendonça, F. F., Scacchetti, P. C., Oliveira, C., & Foresti, F. (2014). Molecular and cytogenetic analyses of cryptic species within the *Synbranchus marmoratus* Bloch, 1795 (Synbranchiformes: Synbranchidae) grouping: Species delimitations, Karyotypic evolution and intraspecific diversification. *Neotropical Ichthyology*, 12(4). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140039>
- Vicente, F., Loeb, M. V., de Paiva, A. C. G., Sampaio, C. L. S., Argolo, L. A., & Jacobina, U. P. (2020). Integrative systematics unveils the controversial identity of Engraulidae fishing stocks in a Neotropical estuary, northeast Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 18(4). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2020-0037>
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. . (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847–1857. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2005.1716>
- Winemiller, K. O., López-Fernández, H., Taphorn, D. C., Nico, L. G., & Duque, A. B. (2008). Fish assemblages of the Casiquiare River, a corridor and zoogeographical filter for dispersal between the Orinoco and Amazon basins. *Journal of Biogeography*, 35(9). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.01917.x>
- Zanata, A. M., Burger, R., & Camelier, P. (2018). Two new species of *astyanax baird & girard* (characiformes: Characidae) from the upper rio paraguaçu basin, chapada diamantina, bahia, Brazil. In *Zootaxa* (Vol. 4438, Issue 3). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4438.3.3>

## FIGURAS



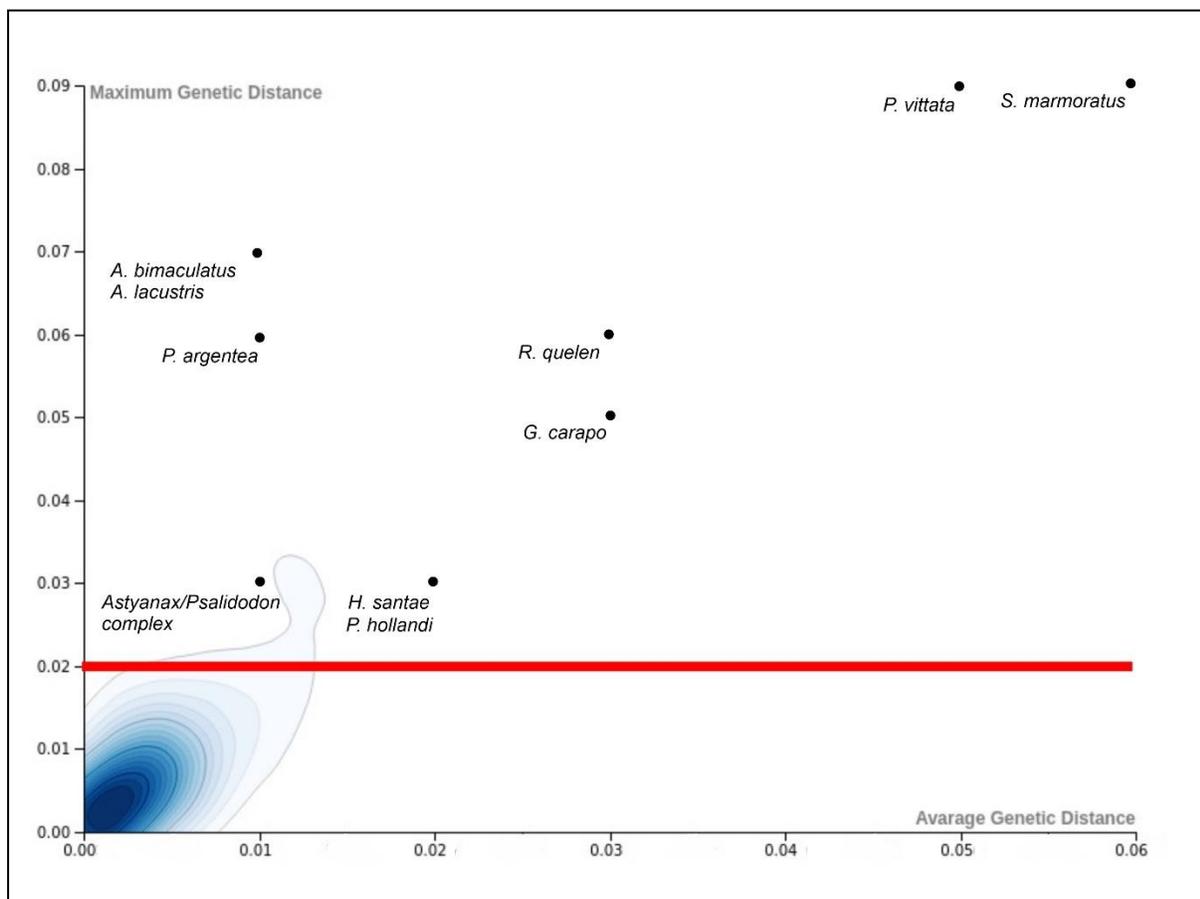
**Figura 1.** Mapa de amostragem da ictiofauna da bacia do rio São Francisco representando 90 espécies que contém 720 espécimes. As localizações foram georreferenciadas, tanto para dados primários (122 espécimes inéditos), quanto para dados secundários (598 espécimes com sequências já depositadas no BOLD SYSTEMS ou no NCBI). Os locais de coleta de diversos espécimes muitas vezes são os mesmos, portanto os pontos de distribuição das espécies se sobrepõem.

- *Astyanax bimaculatus*
- *Astyanax cf. fasciatus*
- *Psalidodon fasciatus*
- *Psalidodon rivularis*



ASAp  
GM7C

**Figura 2.** Reconstrução filogenética bayesiana utilizando o gene *cox1* para as espécies dos gêneros *Astyanax*/*Psalidodon* da bacia do rio São Francisco. É possível identificar a presença de três clados bem suportados (PP=1). Um clado constituído por representantes apenas de *Astyanax bimaculatus/lacustris* (vermelho), com divergência genética de 7.1%. Um outro representado por *Astyanax fasciatus* (1%) (verde), e por fim um outro clado agrupando representantes de *A. bimaculatus*, *A. fasciatus*, *P. rivularis* e *P. fasciatus* (2.6%) (azul).



**Figura 3.** Gráfico de contorno mostrando a distribuição das divergências genéticas do *cox1* para as espécies da ictiofauna da bacia do São Francisco. Percebe-se que a grande maioria das espécies se concentra próximo a 0, e uma pequena parte se distribui acima do limiar coespecífico (linha vermelha) utilizado para DNA *barcode*, ou seja, acima de 0.02 (2%).

## TABELA

**Tabela 1.** DGIMAXs (Divergências Genéticas Máximas) de algumas espécies do RSF que são crípticas e de outras que apresentam estruturação populacional.

Espécie	Trecho(s)	Resultado detectado pelo presente estudo	n	DGIMAX (%)
<i>Pimelodella vittata</i>	alto		6	9.3
<i>Synbranchus marmoratus</i>	alto		3	8.9
<i>Rhamdia quelen</i>	alto/baixo		7	6.1
<i>Piabina argentea</i>	alto	Linhagem críptica	17	6
<i>Gymnotus carapo</i>	alto		4	4.8
<i>Hyphessobrycon santae</i>	alto/submédio/baixo		8	3.3
<i>Pamphorichthys hollandi</i>	alto/submédio/baixo		9	2.7
<i>Salminus hilarii</i>	alto		16	2.0
<i>Geophagus brasiliensis</i>	alto/baixo		3	1.9
<i>Prochilodus argenteus</i>	alto/submédio		13	1.6
<i>Trachelyopterus galeatus</i>	alto/baixo	Estruturação populacional	7	1.4
<i>Pygocentrus piraya</i>	alto/médio/submédio		16	1.2
<i>Hoplias malabaricus</i>	alto		11	1.1
<i>Phenacogaster franciscoensis</i>	alto/submédio		2	1.1

## **MATERIAL SUPLEMENTAR**

**Tabela S1.** Informações sobre as sequências do gene *cox1*, incluindo as respectivas coordenadas geográficas de coletas dos espécimes que têm sequências disponíveis no BOLD SYSTEMS e/ou no NCBI e dos espécimes coletados durante este estudo. Consultar o arquivo XLSX em anexo.

**Tabela S2.** Divergências genéticas calculadas, para o gene *cox1*, da ictiofauna do rio São Francisco para dados coletados no presente trabalho e também aqueles disponíveis apenas no BOLD SYSTEMS e NCBI. Esta tabela conta ainda com as ordens e famílias a que cada espécie pertence, além de dados de conservação, endemismo e distribuição nos diferentes trechos desse rio. Consultar o arquivo XLSX em anexo.