



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

VALÉRIA MARTINS DE ANDRADE

BIOGEOGRAFIA DE BAIACUS NEOTROPICAIS DO GÊNERO *Colomesus*
Gill, 1884 REVELA A AÇÃO DO MIOCENO NA VICARIANCIA E
ESPECIAÇÕES CRÍPTICAS.

BELÉM - PARÁ
2023

VALÉRIA MARTINS DE ANDRADE

**BIOGEOGRAFIA DE BAIACUS NEOTROPICAIS DO GÊNERO
Colomesus Gill, 1884 REVELA A AÇÃO DO MIOCENO NA
VICARIANCIA E ESPECIAÇÕES CRÍPTICAS.**

Texto Dissertativo apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca – PPGEAP, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção de título de mestrado.

Orientador: Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales

BELÉM -PARÁ
2023

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO	6
1.1 BIOGEOGRAFIA DE PEIXES NEOTROPICAIS	6
1.2 A ORDEM TETRAODONTIFORMES: CARACTERÍSTICAS GERAIS	8
1.3 O GÊNERO <i>COLOMESUS</i> (Gill, 1884)	11
2 JUSTIFICATIVA	12
3 OBJETIVOS	13
4 REFERÊNCIAS	14

CAPÍTULO 2

SURGIMENTO E ESPECIAÇÃO DO GÊNERO <i>COLOMESUS</i> INFLUENCIADO POR EVENTOS BIOGEOGRÁFICOS DO MIOCENO E SUA ATUAL DIVERSIDADE CRÍPTICA.	20
RESUMO	21
1 INTRODUÇÃO	23
2 MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 ÁREA DE ESTUDO	24
2.2 EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO	26
2.3 ANÁLISES MOLECULARES: RECONSTRUÇÕES FILOGENÉTICAS	27
2.4 ESTIMATIVA DE TEMPO DE ANCESTRAL COMUM MAIS RECENTE DE DIVERGÊNCIA E RECONSTRUÇÃO DA ÁREA ANCESTRAL	28
3 RESULTADOS	29
3.1 PADRÕES FILOGENÉTICOS E BIOGEOGRAFIA HISTÓRICA	29
4 DISCUSSÃO	36
4.1 PADRÕES FILOGENÉTICOS E ESPECIAÇÃO EM <i>COLOMESUS</i> .	36
4.2 BIOGEOGRAFIA HISTÓRICA	38
5 CONCLUSÃO	40
6 REFERÊNCIAS	41
7 DADOS SUPLEMENTARES	46

RESUMO

A ordem Tetraodontiforme está distribuída em mares e águas doces de clima tropical e temperado. Possuem notável diversidade em forma, tamanho e estilo de vida. Esta ordem abriga peixes popularmente conhecidos como “baiacus” pertencentes as famílias, Diodontidae e Tetraodontidae. O gênero *Colomesus* está presente em parte da América do Sul, sendo atualmente constituído por apenas três espécies válidas (*C. asellus*, *C. tocantinensis* e *C. psittacus*), sendo as duas primeiras de ambiente dulcícola, e a última associada a ambientes com influência de salinidade do mar, como estuários. As espécies estão associadas a ambientes aquáticos e são consideradas como um indicativo de qualidade ambiental. Devido ao fato de sua ampla distribuição e estilo de vida, várias hipóteses sobre possíveis especiações dentro do gênero foram levantadas nos últimos anos, levando a descrição de *C. tocantinensis* limitada a uma região do Rio Tocantins, necessitando de inferências em regiões e drenagens mais distantes. O objetivo do presente estudo é, inferir o padrão biogeográfico das espécies do gênero *Colomesus* na América do Sul, investigando uma possível influência de eventos biogeográficos como o Mioceno e o Pleistoceno em moldar a distribuição atual das espécies, focando em *Colomesus asellus*, espécie com maior área de distribuição do gênero, além de verificar a presença de linhagens genéticas distintas. Foram utilizados indivíduos provenientes de várias drenagens da região Neotropical, tanto do Brasil, quanto Peru e Guiana. Foram implementadas no banco de dados, sequencias de dois genes mitocondriais (COI e ATPase 6/8) além do gene nuclear (Rodopsina) que foram amplificados para os espécimes do presente estudo, bem como sequencias adicionais presentes no portal Genbank, sendo possível realizar inferências filogenéticas e análises de tempo de divergência e origem de área ancestral. Os resultados do presente estudo indicam que, a linhagem de *C. asellus* presente em águas brasileiras é filogeneticamente distinta de sequencias provenientes da localidade tipo da espécie, bem como a existência ao menos de nove linhagens crípticas dentro de *C. asellus*. Adicionalmente, *C. tocantinensis* apresenta uma distribuição mais ao norte, também estando presente na região sul do estado do Pará, bem como a presença de uma outra linhagem críptica dentro da espécie, resultado similar também inferido para *C. psittacus*. A vicariância do ancestral do gênero em relação ao grupo de espécies marinhas ocorreu durante o Mioceno na ecoregião do Amazonas Lowlands onde diversificações posteriores ocorreram durante o Pleistoceno. Os dados aqui obtidos reforçam a importância de ampla cobertura amostral para espécies de peixes Neotropicais, fornecendo evidencias de que a biodiversidade do gênero é atualmente subestimada.

Palavras-chave: Especiação, Filogeografia, OTUs, Mioceno, Amazônia.

ABSTRACT

The order Tetraodontiforme is distributed in seas and freshwaters of tropical and temperate climate. They have a remarkable diversity in shape, size and lifestyle. This order is home to fish popularly known as “puffers” belonging to the Diodontidae and Tetraodontidae families. The genus *Colomesus* is present in part of South America, currently consisting of only three valid species (*C. asellus*, *C. tocantinensis* and *C. psittacus*), the first two of which are from a freshwater environment, and the last associated with environments with influence sea salinity, such as estuaries. The species are associated with aquatic environments and are considered as an indicator of environmental quality. Due to its wide distribution and lifestyle, several hypotheses about possible speciation within the genus have been created in recent years, leading the description of *C. tocantinensis* limited to a region of the Tocantins River, requiring inferences in more distant regions and drainages. The aim of this study is to infer the biogeographic pattern of species of the genus *Colomesus* in South America, investigating a possible influence of biogeographical events such as the Miocene and Pleistocene in shaping the current distribution of species, focusing on *Colomesus asellus*, a species with the largest area distribution of the genus, in addition to verifying the presence of distinct genetic lineages. Individuals from various drainages in the Neotropical region, both in Brazil, Peru and Guyana, were used. Sequences of two mitochondrial genes (COI and ATPase 6/8) were implemented in the database, in addition to the nuclear gene (Rhodopsin) that were amplified for the specimens of the present study, as well as additional sequences present in the Genbank portal, making it possible to make inferences phylogenetic and analysis of time of divergence and ancestral area origin. The results of the present study indicate that the lineage of *C. asellus* present in Brazilian waters is phylogenetically distinct from sequences from the type locality of the species, as well as the existence of at least nine cryptic lineages within *C. asellus*. Additionally, *C. tocantinensis* has a more northerly distribution, also being present in the southern region of the state of Pará, as well as the presence of another cryptic lineage within the species, a similar result also inferred for *C. psittacus*. The ancestor vicariance with respect to marine species group occurred during the Miocene in the Amazon Lowlands ecoregion where further diversification occurred during the Pleistocene. The data obtained here reinforce the importance of wide sampling coverage for Neotropical fish species, providing evidence that the biodiversity of the genus is currently underestimated.

Keywords: Speciation, Phylogeography, OTUs, Miocene, Amazonia.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOGEOGRAFIA DE PEIXES NEOTROPICAIS

A região Neotropical abrange desde a América do Sul e América Central até ao sul do México, apresentando elevada riqueza de espécies animais e vegetais, pois compreende diferentes biomas e habitats, tais como zonas áridas e extensas florestas tropicais, como a Floresta Atlântica e Amazônica (Morrone, 2014). Ictiologistas descreveram cerca de ~6.080 espécies de peixes Neotropicais, habitando diversos locais, ecoregiões e zonas climáticas (Dagosta & de Pinna 2019). Essa vasta região, é também composta pelas bacias do Amazonas e Orinoco e bacias costeiras menores das Guianas, as quais drenam centenas de milhares de quilômetros de riachos e pequenos rios que correm sob um dossel de floresta fechada e grandes rios que se estabeleceram através de amplas planícies de inundação sazonais (Albert et al., 2020). A bacia de drenagem amazônica possui cerca de 7,05 milhões de km² (incluindo a bacia Tocantins-Araguaia) (Allen e Pavelsky, 2018), captando águas de 40% de toda a superfície continental da América do Sul, ou cerca de 5,2% da área de superfície de todas as bacias hidrográficas da Terra combinadas (Lehner et al., 2008).

Como bacia mega diversa, uma grande parte desta biodiversidade Amazônica foi formada por eventos biogeográficos passados, onde desde o período do Paleoceno, eventos de especiação ocorreram em drenagens e em ambientes de floresta tropical, mostrando-a como fonte primária da biodiversidade Neotropical, tendo gerado diversidade não apenas local, como também especiação de linhagens para outras regiões dentro da zona Neotropical (Antonelli et al., 2018). Entre suas grandes linhagens, destacam-se os peixes de água doce, sendo a grande maioria das linhagens atuais, distribuídas em apenas cinco famílias principais: Siluriformes, Characiformes, Cyprinodontiformes, Cichliformes e Gymnotiformes. Juntos, esses clados representam 87% de todas as espécies de peixes de água doce neotropicais e 96% das espécies de peixes amazônicos (Reis et al., 2016, van der Sleen & Albert 2017, Dagosta & de Pinna 2019; Albert et al., 2020).

Essas diferentes linhagens evolutivas são resultantes de interações de processos geológicos, que ocasionaram: constantes mudanças de sistemas de drenagem, vicariância, divergência alopátrica e especiações (Dagosta e Pinna, 2017; Lundberg et al., 1998). Mesmo que os estudos sobre a biodiversidade na região Neotropical sejam crescentes, o conhecimento sobre a diversidade de peixes dessa região bem como sobre os processos evolutivos que a geraram, ainda são iniciais. Assim, estudos que investigam os eventos que influenciaram no padrão de distribuição biogeografia associados à filogenia tem resultado em contribuições para o entendimento da evolução das populações, espécies e comunidades de peixes em distintos ambientes neotropicais (Lundberg et al., 1998; Albert et al., 2020; Cassemiro et al., 2021).

Peixes de água doce neotropicais também incluem espécies que surgiram devido a incursões marinhas durante o Mioceno, como arraias derivadas de ancestral marinho, além de espécies de linguados e baiacus (Lovejoy et al., 2006; Yamanoue et al., 2011; Albert et al., 2020; Fontenelle et al., 2021; Bitencourt et al., 2023).

Entender a causa dessa variedade de táxons requer conhecimento a nível de espécie, distribuição geográfica e relações filogenéticas, assim, para peixes de água doce, essas informações devem ser interpretadas dentro do contexto geológico e geográfico da história da bacia Amazônica (Reis et al., 2016). Várias hipóteses foram levantadas com o objetivo de explicar essa variedade, cada uma com seu grau de relevância, entre algumas, temos: o efeito de barreiras dos rios amazônicos (hipótese de Rios) (Sick, 1967; Hershkovitz, 1977; Capparella 1988); o isolamento dos blocos de floresta úmida das áreas de relevo de superfície na periferia da Amazônia durante os períodos climáticos secos do Terciário e Quaternário (hipótese de Refúgios) (Haffer, 1969, 1970; Vanzolini e Williams; 1970; Vrba, 1992), o isolamento e especiação de populações em pequenas áreas montanhosas na Amazônia devido a flutuações climáticas sem maiores mudanças vegetacionais (hipótese de Museu) (Roy et al., 1997; Fjeldsa et al., 1999), e especiação parapátrica através de acentuados gradientes ambientais sem separação das respectivas populações (hipótese de Gradiente) (Endler, 1982).

Haffer (1969), com base na distribuição atual das florestas tropicais da Amazônia, avifauna e a possibilidade de seca durante variações climáticas do Pleistoceno propôs que a

Amazônia teria se fragmentado em manchas isoladas, ou refúgios, que favoreceram a especiação por vicariância. Enquanto fases interglaciais mais úmidas teriam causado a reconexão da floresta e rios locais, promovendo assim, especiação simpátrica e hibridização ao longo de zonas de contato secundárias (Rull, 2020). Na época, algumas espécies podem ter permanecido mais ou menos restritas às suas áreas de origem, sem expandir amplamente sua distribuição pelas regiões adjacentes, assim caracterizando hoje uma série de “zonas de endemismo”.

Contudo, sabe-se que não apenas um, mas vários eventos foram responsáveis pelo estabelecimento das espécies, rios e florestas atuais. Um estudo feito com 601 espécies de 14 famílias de Characiformes, algumas com alto nível de endemismo, mostrou que pelo menos quatro eventos paleo históricos contribuíram predominantemente para a formação da ictiofauna primária da Amazônia: ascensão de paleo arcos, mudanças hidromorfológicas, incursões marinhas durante o Mioceno, eventos de capturas hidrúcas e estabelecimento de novas rotas de dispersão (Hubert & Renno, 2006).

1.2 A ORDEM TETRAODONTIFORMES: CARACTERÍSTICAS GERAIS

A ordem Tetraodontiformes compreende 434 espécies divididas em 10 famílias com 105 gêneros (Fricke et al., 2023), distribuída em ambientes marinhos e de águas doces de clima tropical e temperado (Figura 1) e possuem uma notável diversidade em forma, tamanho e estilo de vida (Figura 2) (Matsuura, 2014). Além disso, Tetraodontiformes apresentam mecanismos de defesa (Brainerd, 1984; Wainwright et al., 1995; Brainerd & Patek, 1998), onde várias linhagens possuem elaborados mecanismos de inflação, escamas resistentes, toxinas e/ou espinhos na pele e nadadeiras dorsais.

Adicionalmente, esse grupo também apresenta informações moleculares peculiares, tais como, menor tamanho de genoma conhecido encontra-se em baiacus (Hinegardner, 1968) e várias outras linhagens no grupo possuem genoma com tamanho reduzido (Hinegardner, 1968; Brainerd et al., 2001). As espécies de baiacus estão divididas em duas famílias, Diodontidae (Bonaparte, 1835), Tetraodontidae (Bonaparte, 1831). De acordo com análises que mostram sua

relação filogenética, esses grupos foram considerados por Santini e Tyler (2003), como grupos irmãos.

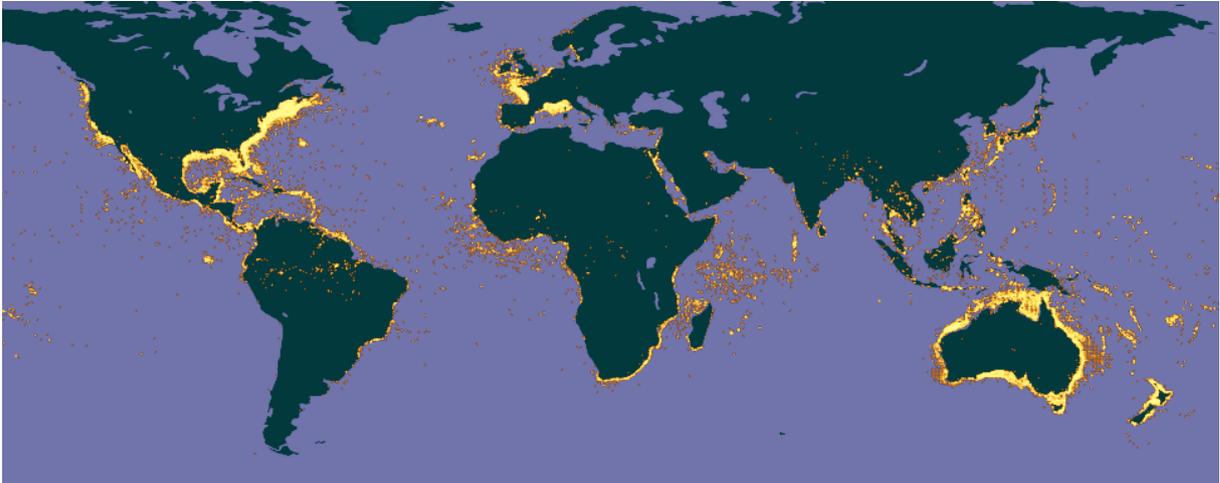


Figura 1: Mapa de distribuição da Ordem Tetraodontiformes. Fonte: Gbif (<https://www.gbif.org>).

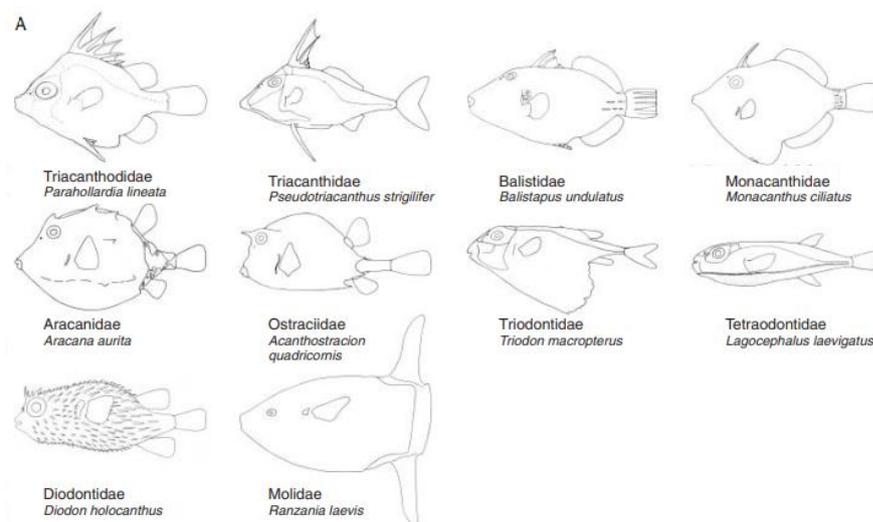


Figura 2: Representantes de famílias da ordem Tetraodontiformes. Adaptado. Fonte: Santini e Tyler (2003).

Investigações das relações filogenéticas de Tetraodontiformes começaram com análises morfológicas, realizadas com 75 características musculares de 46 espécies onde sinapomorfias foram usadas para inferir filogenias (Winterbottom's, 1974). Outro estudo mostrou que alguns clados da ordem provavelmente passaram por processos de extinção durante o Paleoceno, influenciando na formação e organização das linhagens atuais (Arcila e Tyler, 2017). Santini et

al. (2013), propuseram uma nova topologia (Figura 3), que corrobora com a monofilia da ordem e todas as suas famílias, com sugestão de novas relações entre as maiores linhagens.

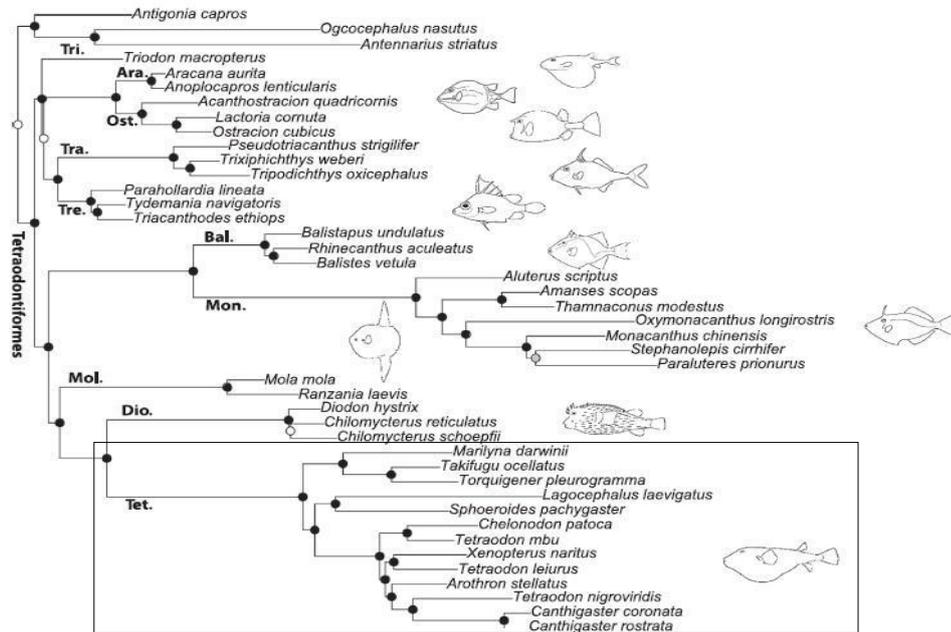


Figura 3: Relações filogenéticas mais recente proposta para a ordem Tetraodontiformes. Fonte: Santini et al., (2013)

Dentro dessa ordem, a família Tetraodontidae é uma das mais especiosas, possuindo ~192 espécies de baiacus distribuídas em 28 gêneros (Fricke et al., 2023). Podem ocorrer em habitats como o litoral e estuários, mas aproximadamente 29 espécies de tetraodontidae passam seu ciclo de vida completo em águas doces localizadas na América do Sul, África Central e no sudeste da Ásia (Figura 4) (Yamanoue et al., 2011).

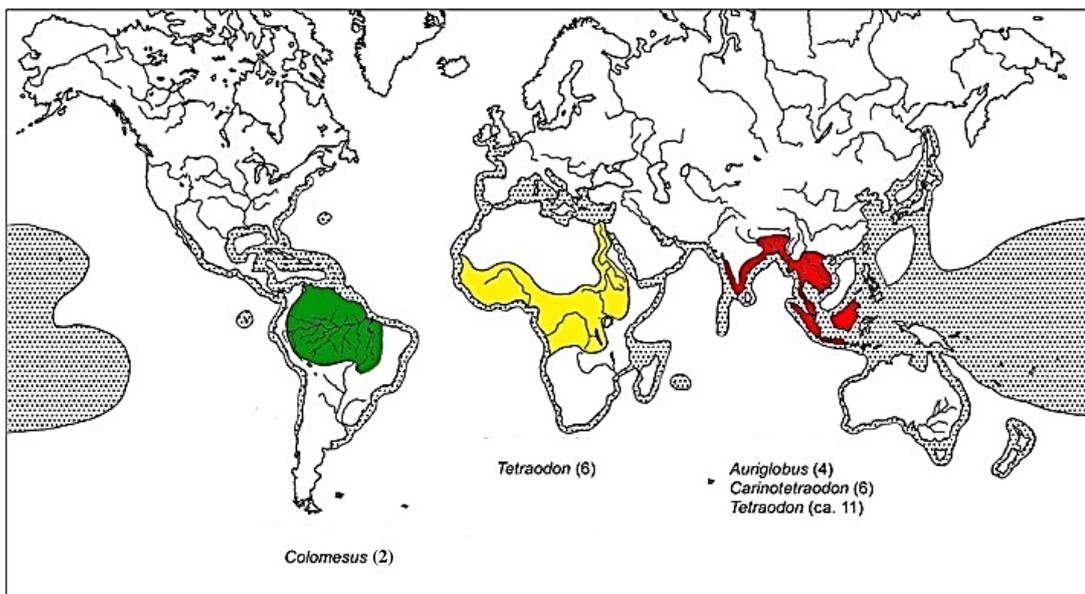


Figura 4: Padrões de distribuição de espécies da família Tetraodontidae de ocorrência marinha (sombreado) e de água doce (verde – América do Sul, amarelo – África Central, vermelho – Sudeste da Ásia). Fonte: Yamanoue et al. (2011) com modificações.

1.3 O GÊNERO *COLOMESUS* (Gill, 1884)

O gênero *Colomesus* contém três espécies válidas (Figura 5). *Colomesus psittacus* (Bloch & Schneider, 1801), pode ser encontrado em águas marinhas ou salobras, distribuídas entre Caribe, costa norte da América do Sul e Sergipe. Essa espécie marinha possui seis bandas nas costas entre os olhos e o pedúnculo caudal, 17 a 19 raios na nadadeira peitoral. Enquanto *Colomesus asellus* (Müller & Troschel, 1849), de água doce, encontra-se em toda a Amazônia, drenagens do Tocantins-Araguaia e águas costeiras da boca do Amazonas até a Venezuela, possuindo cinco bandas, 13 a 16 raios na nadadeira peitoral. A espécie mais recente do gênero a ser descrita, *Colomesus tocantinensis* (Amaral, Brito, Silva & Carvalho, 2013), está distribuída ao longo do Rio Tocantins, também possui cinco bandas e opérculo em contraste com os outros, em formato de ‘V’ invertido (Amaral *et al.*, 2013).

Podemos supor que *C. asellus* realiza desova em rios e locais de margens perto da foz de lagos de várzea e afluentes, principalmente durante as cheias, esta estratégia de desova difere de outros peixes secundários de água doce amazônicos (cianídeos, engraulídeos) e de outros tetraodontídeos de água doce, no entanto, assemelha-se à estratégia de Characiformes, Siluriformes e dos tetraodontídeos marinhos (Araújo-Lima *et al.*, 1994). A dieta de *C. asellus* coletados no rio Tocantins (Bartolette *et al.*, 2018), apresentou conteúdo estomacal com uma dieta predominantemente insetívora, baseada em diversas espécies bentônicas, principalmente ninfas de Ephemeroptera (Insecta). Para *C. psittacus* coletados na zona costeira amazônica, em geral, foi observado que possuem dieta macrobentívora, baseada principalmente em crustáceos, mas regulada pela variação espaço-temporal da disponibilidade de presas (Lobato *et al.*, 2018).

A origem de *C. asellus* e *C. psittacus* foi estimada como sendo de ~10mya, coincidente com incursões marinhas na região Neotropical (Yamanoue *et al.*, 2011).

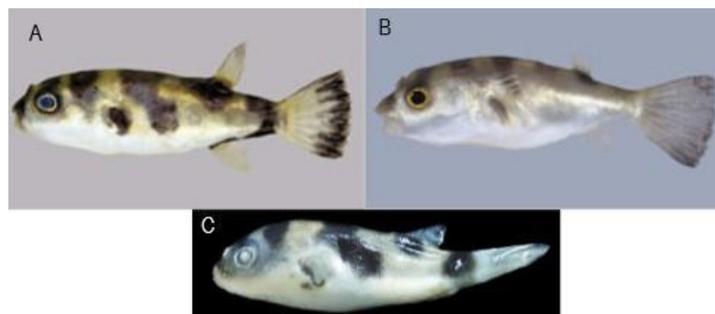


Figura 5: **A:** *Colomesus asellus* (Müller & Troschel, 1849). **B:** *Colomesus psittacus* (Bloch & Schneider, 1801). **C:** *Colomesus tocantinensis* (Amaral, Brito, Silva & Carvalho, 2013). Fonte: FishBase. Holm, E.; Amaral et al. (2011)

Entretanto, estudos recentes com peixes de regiões neotropicais têm reforçado a necessidade de ampla cobertura de amostragem de espécies, devido a característica altamente especiativa desta região, em promover diversidade oculta de espécies (Usso et al., 2019; Fontenelle et al., 2021; Rizo-Fuentes et al., 2021; Gales et al., 2022). No caso do gênero *Colomesus*, última espécie descrita em 2013, contou com auxílio do uso do DNA barcode e evidenciou a presença de linhagens crípticas ao longo de sua área de distribuição geográfica (Amaral et al., 2013). Porém, dada a ampla distribuição das espécies do gênero, a possibilidade de linhagens novas adicionais não pode ser descartada.

2 JUSTIFICATIVA

A região Amazônica possui uma rica diversidade ictiológica, apresentando várias espécies distribuídas em bacias distintas, que foram formadas por processos geológicos ao longo do tempo, podendo ou não apresentar graus variados de conexão entre elas, fatores estes que são altamente promotores de especiação ao longo do tempo. Tendo em vista a vasta distribuição do gênero *Colomesus* na região Neotropical, bem como a maior diversidade das espécies do gênero serem de água doce, distribuídas em uma série de drenagens distintas, fatores como a formação das principais drenagens e bacias na região Neotropical, podem ter sido promotores de especiação dentro do gênero, sendo desta forma necessário investigar possíveis especiações dentro de cada linhagem, bem como, quais eventos biogeográficos foram responsáveis por moldar a atual distribuição das espécies.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar inferências biogeográficas e filogeográficas do gênero *Colomesus*.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Identificar a possibilidade da presença de linhagens crípticas adicionais dentro das espécies de *Colomesus*;
- Investigar se o surgimento do gênero, bem como a atual distribuição das espécies atualmente foi influenciada por algum evento biogeográfico;
- Estimar a distribuição atual das espécies de água doce.

4 REFERÊNCIAS

Albert, J. S. & R. E. Reis (eds), 2011. Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. University of California Press, Berkeley, CA.

Albert, J. S., Tagliacollo, V. A., & Dagosta, F. (2020). Diversification of Neotropical Freshwater Fishes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 51(1). doi:10.1146/annurev-ecolsys-011620-031032

Allen, G. H., & Pavelsky, T. M. (2018). Global extent of rivers and streams. *Science*, 361(6402), 585-588.

Amaral CRL, Brito PM, Silva DA, Carvalho EF (2013) A New Cryptic Species of South American Freshwater Pufferfish of the Genus *Colomesus* (Tetraodontidae), Based on Both Morphology and DNA Data. *PLOS ONE* 8(9): e74397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074397>

Antonelli, A., Zizka, A., Carvalho, F. A., Scharn, R., Bacon, C. D., Silvestro, D., & Condamine, F. L. (2018). Amazonia is the primary source of Neotropical biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(23), 6034–6039. doi:10.1073/pnas.1713819115

Arcila, D., & Tyler, J. C. (2017). Mass extinction in tetraodontiform fishes linked to the Palaeocene–Eocene thermal maximum. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1866), 20171771. doi:10.1098/rspb.2017.1771

Ayres-Ostrock, L.M., Valero, M., Mauger, S., Oliveira, M.C., Plastino, E.M., Guillemin, M.-L. and Destombe, C. (2019), Dual influence of terrestrial and marine historical processes on the phylogeography of the Brazilian intertidal red alga *Gracilaria caudata*. *J. Phycol.*, 55: 1096-1114. <https://doi.org/10.1111/jpy.12892>

BARTOLETTE, R. et al. Seasonal and ontogenetic diet patterns of the freshwater pufferfish *Colomesus asellus* (Müller & Troschel, 1849) in the upper-middle Tocantins River. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, Maringá, v. 40, 2018. Disponível em:

<<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/35282/pdf>>. Acesso em: 15 maio 2018.

Bitencourt, J. A., Affonso, P. R., Ramos, R. T., Schneider, H., & Sampaio, I. (2023). Phylogenetic relationships and the origin of New World soles (Teleostei: Pleuronectiformes: Achiridae): The role of estuarine habitats. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 178, 107631.

Brainerd, E. L. (1984). Pufferfish Inflation: functional morphoplogy of postcranial structures in *Diodon holocanthus* (Tetraodontiformes). *Journal of Morphology*, 220: 243-261.

Brainerd, E. L.; Patek, S. N. (1998). Vertebral column morphoplogy, C-start curvature, and the evolution of mechanical defenses in tetraodontiform fishes. *Copeia*, 1998: 971-984.

Brainerd, E.L., Slutz, S.S., Hall, E.K., Phillis, R.W., 2001. Patterns of genome size evolution in tetraodontiform fishes. *Evolution* 55, 2363–2368.

Chen, Wei-Jen & Bonillo, Céline & Lecointre, Guillaume. (2003). Repeatability of clades as a criterion of reliability: A case study for molecular phylogeny of Acanthomorpha (Teleostei) with larger number of taxa. *Molecular phylogenetics and evolution*. 26. 262-88. 10.1016/S1055-7903(02)00371-8.

CROIZAT, L. 1958. Panbiogeography 3 Vols. Caracas: publicado pelo autor.

Dagosta, F. C. P., & Pinna, M. de. (2017). Biogeography of Amazonian fishes: deconstructing river basins as biogeographic units. *Neotropical Ichthyology*, 15(3). doi:10.1590/1982-0224-20170034

Fontenelle, J. P., Lovejoy, N. R., Kolmann, M. A., & Marques, F. P. (2021). Molecular phylogeny for the Neotropical freshwater stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygoninae) reveals limitations of traditional taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 134(2), 381-401

Fricke, R., Eschmeyer, W. N. & Van der Laan, R. (eds) 2023. ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES: GENERA, SPECIES, REFERENCES.

(<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>).
Electronic version accessed 23/04/2023.

Froese, R., Pauly, D., 2012. FishBase. <<http://www.fishbase.org>>.

GALES, Suellen M. et al. Molecular diversity and historical phylogeography of the widespread genus *Mastiglanis* (Siluriformes: Heptapteridae) based on palaeogeographical events in South America. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 135, n. 2, p. 322-335, 2022.

Giarrizzo T, Krumme U, Wosniok W (2010). Size-structured migration and feeding patterns in the banded puffer fish *Colomesus psittacus* (Tetraodontidae) from north Brazilian mangrove creeks. *Mar Ecol Prog Ser* 419:157-170. <https://doi.org/10.3354/meps08852>

Goulding, M., Barthem, R. & Ferreira, E. (2003). *The Smithsonian Atlas of the Amazon*. Washington, DC: Smithsonian Press.

Haffer, J. (1969). Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165:131–137

Haffer, J. (2008). Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. *Brazilian Journal of Biology*, 68(4 suppl), 917–947. doi:10.1590/s1519-69842008000500003

Hinegardner, R., 1968. Evolution of cellular DNA content in teleost fishes. *Am. Nat.* 102, 517–523.

Hubert, N. and Renno, J.-F. (2006), Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, 33: 1414-1436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01518.x>

LÉVÊQUE, C. et al. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*, v. 595, p. 545–567, 2008.

Lobato, C. M. C., Soares, B. E., & Montag, L. F. A. (2018). Temporal and spatial variation in the trophic ecology of the banded puffer fish *Colomesus psittacus* (Tetraodontiformes:

Tetraodontidae) in the Amazon coastal zone. *Marine and Freshwater Research*. doi:10.1071/mf17328

Lovejoy, N.R., Albert, J.S., & Crampton, W.G. (2006). Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences*, 21, 5-13.

Lundberg, J.G. & Marshall, L.G. & Guerrero, Javier & Horton, Brian & Malabarbarba, M.C. & Wesselingh, Frank. (1998). The stage for neotropical fish diversification: A history of tropical South American rivers.

Matsuura, K. (2014). Taxonomy and systematics of tetraodontiform fishes: a review focusing primarily on progress in the period from 1980 to 2014. *Ichthyological Research*, 62(1), 72–113. doi:10.1007/s10228-014-0444-5

MORRONE, J. J. (2014). Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. *Zootaxa*, 3782(1), 1. doi:10.11646/zootaxa.3782.1.1

NELSON, J. S.; GRANDE, T.; WILSON, M. (2016). *Fishes of the World, Fifth Edition*. 10.1002/9781119174844.

PIORSKI, N., GARAVELLO, J. et al. *Platydoras brachylecis*, a new species of thorny catfish (Siluriformes: Doradidae) from northeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 6, n. 3, p. 481–494, 2008.

Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr., 2003. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre.

Reis, R.E., Albert, J.S., Di Dario, F., Mincarone, M.M., Petry, P. and Rocha, L.A. (2016), Fish biodiversity and conservation in South America. *J Fish Biol*, 89: 12-47. <https://doi.org/10.1111/jfb.13016>

Rizo-Fuentes, Maira & Correa-Cárdenas, Camilo & Lasso, Carlos & Morales-Betancourt, Monica & Barragán-Barrera, Dalia & Caballero, Susana. (2021). Phylogeography, genetic diversity and population structure of the freshwater stingray, *Paratrygon aiereba* (Müller & Henle, 1841) (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) in the Colombian Amazon and Orinoco basins. *Mitochondrial DNA Part A*. 32. 20-33. 10.1080/24701394.2020.1844679.

Rocha, DG, Kaefer, IL. What has become of the refugia hypothesis to explain biological diversity in Amazonia? *Ecol Evol*. 2019; 9: 4302– 4309. <https://doi.org/10.1002/ece3.5051>

SANTINI, F. & TYLER, J. (2003). A phylogeny of the families of fossil and extant tetraodontiform fishes (Acanthomorpha, Tetraodontiformes), Upper Cretaceous to Recent. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 139. 565 - 617. 10.1111/j.1096-3642.2003.00088.x.

Santini, F., Sorenson, L., & Alfaro, M. E. (2013). A new phylogeny of tetraodontiform fishes (Tetraodontiformes, Acanthomorpha) based on 22 loci. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(1), 177–187. doi:10.1016/j.ympev.2013.05.014

Uso, M. C., Santos, A. R. D., Gouveia, J. G., Frantine-Silva, W., Araya-Jaime, C., Oliveira, M. L. M. D., ... & Dias, A. L. (2019). Genetic and chromosomal differentiation of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) revealed by repetitive molecular markers and DNA barcoding. *Zebrafish*, 16(1), 87-97

Van der Sleen, P. & J. S. Albert, 2018. *Field Guide to the Fishes of the Amazon, Orinoco, and Guianas*. Princeton University Press, New Jersey.

Wainwright, P. C.; Turingan, R. G.; Brainerd, E. L. (1995). Functional morphology of pufferfish inflation mechanism of the buccal pump. *Copeia*: 614-625.

Whitmore, T.C.; Prance, G.T. (1987) *Biogeography and Quaternary history in tropical Latin America*. Oxford University Press, New York.

Winterbottom, R., 1974. The familial phylogeny of the Tetraodontiformes (Acanthopterygii: Pisces) as evidenced by their comparative myology. *Smithson. Contrib. Zool.* 155, 1–201.

YAMANOUE, Y., MIYA, M., DOI, H., MABUCHI, K., SAKAI, H., & NISHIDA, M. (2011). Multiple Invasions into Freshwater by Pufferfishes (Teleostei: Tetraodontidae): A Mitogenomic Perspective. PLoS ONE 6(2): e17410. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017410>

1 CAPÍTULO 2

2 **Surgimento e especiação do gênero *Colomesus* influenciado por eventos biogeográficos do**
3 **Mioceno e sua atual diversidade críptica.**4 Valéria Martins de Andrade¹ Alan Erik S. Rodrigues¹, Marcia da Silva Anjos¹, Silvia Britto
5 Barreto¹, Claudio de Oliveira², Mark H. Sabaj³, Santelmo Vasconcelos⁴, Matheus Marcos
6 Rotundo⁵, Jonathan Stuart Ready^{1*}, João Bráullio L. Sales¹

7

8 ¹ *Integrated Biological Research Group, Center for Advanced Biodiversity Studies (CEABIO),*
9 *Federal University of Pará, Av. Perimetral, 01, PCT-Guamá, Land 11. CEP: 66075-750, Belém,*
10 *PA, Brazil*11 ² *Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências, Universidade*
12 *Estadual Paulista, Distrito de Rubião Junior, 250, Botucatu, SP. CEP: 18618-689, Brazil.*13 ³ *The Academy of Natural Sciences of Philadelphia, Philadelphia, PA, USA, 19103*14 ⁴ *Instituto Tecnológico Vale-Desenvolvimento Sustentável, Rua Boaventura da Silva, 955,*
15 *Umarizal, Belém, PA, CEP: 66055-090, Brazil.*16 ⁵ *Zoological Collection, Santa Cecília University (AZUSC-UNISANTA), Rua Oswaldo Cruz,*
17 *266, Boqueirão, 11045-907 Santos-SP, Brazil.*

18

19

20 *Corresponding Author: Jonathan Stuart Ready

21 e-mail: jonathan.ready@gmail.com

22 Tel.: +55 91 987090205

23

24

25

26

27

28

29

30 RESUMO

31 A ordem Tetraodontiforme está distribuída em mares e águas doces de clima tropical e
32 temperado. Possuem notável diversidade em forma, tamanho e estilo de vida. Esta ordem abriga
33 peixes popularmente conhecidos como “baiacus” pertencentes as famílias, Diodontidae e
34 Tetraodontidae. O gênero *Colomesus* está presente em parte da América do Sul, sendo
35 atualmente constituído por apenas três espécies válidas (*C. asellus*, *C. tocantinensis* e *C.*
36 *psittacus*), sendo as duas primeiras de ambiente dulcícola, e a última associada a ambientes com
37 influência de salinidade do mar, como estuários. As espécies estão associadas a ambientes
38 aquáticos e são consideradas como um indicativo de qualidade ambiental. Devido ao fato de
39 sua ampla distribuição e estilo de vida, várias hipóteses sobre possíveis especiações dentro do
40 gênero foram levantadas nos últimos anos, levando a descrição de *C. tocantinensis* limitada a
41 uma região do Rio Tocantins, necessitando de inferências em regiões e drenagens mais distantes.
42 O objetivo do presente estudo é, inferir o padrão biogeográfico das espécies do gênero
43 *Colomesus* na América do Sul, investigando uma possível influência de eventos biogeográficos
44 como o Mioceno e o Pleistoceno em moldar a distribuição atual das espécies, focando em
45 *Colomesus asellus*, espécie com maior área de distribuição do gênero, além de verificar a
46 presença de linhagens genéticas distintas. Foram utilizados indivíduos provenientes de várias
47 drenagens da região Neotropical, tanto do Brasil, quanto Peru e Guiana. Foram implementadas
48 no banco de dados, sequencias de dois genes mitocondriais (COI e ATPase 6/8) além do gene
49 nuclear (Rodopsina) que foram amplificados para os espécimes do presente estudo, bem como
50 sequencias adicionais presentes no portal Genebank, sendo possível realizar inferências
51 filogenéticas e análises de tempo de divergência e origem de área ancestral. Os resultados do
52 presente estudo indicam que o gênero *Colomesus* abriga uma alta diversidade críptica, onde
53 todas as espécies validas atuais, possuem ao menos um grupo críptico. Nosso resultados
54 indicam que o gênero divergiu do ancestral marinho a ~16 milhões de anos na região atual do
55 Rio Orinoco, com dispersões posteriores a outras bacias neotropicais. Adicionalmente
56 sequencias provenientes da localidade tipo de *C. asellus* indicam que esta espécie não está
57 presente no Brasil, sendo restrita a porção norte da Guiana. As incursões marinhas do Mioceno,
58 bem como as flutuações e glaciações durante o Pleistoceno/Plioceno, moldaram a distribuição
59 das linhagens atuais do gênero na região neotropical.

60

61 **Palavras-chave:** Baiacus, Biodiversidade, Glaciações, Mioceno, Amazonia.

62

63 **ABSTRACT**

64 The order Tetraodontiforme is distributed in seas and fresh waters of tropical and temperate
65 climate. They have a remarkable diversity in shape, size and lifestyle. This order is home to fish
66 popularly known as “puffers” belonging to the Diodontidae and Tetraodontidae families. The
67 genus *Colomesus* is present in part of South America, currently consisting of only three valid
68 species (*C. asellus*, *C. tocaninensis* and *C. psittacus*), the first two of which are from a
69 freshwater environment, and the last associated with environments with influence sea salinity,
70 such as estuaries. The species are associated with aquatic environments and are considered as
71 an indicator of environmental quality. Due to its wide distribution and lifestyle, several
72 hypotheses about possible speciation within the genus have been created in recent years, leading
73 the description of *C. tocaninensis* limited to a region of the Tocantins River, requiring
74 inferences in more distant regions and drainages. The aim of this study is to infer the
75 biogeographic pattern of species of the genus *Colomesus* in South America, investigating a
76 possible influence of biogeographical events such as the Miocene and Pleistocene in shaping
77 the current distribution of species, focusing on *Colomesus asellus*, a species with the largest
78 area distribution of the genus, in addition to verifying the presence of distinct genetic lineages.
79 Individuals from various drainages in the Neotropical region, both in Brazil, Peru and Guyana,
80 were used. Sequences of two mitochondrial genes (COI and ATPase 6/8) were implemented in
81 the database, in addition to the nuclear gene (Rhodopsin) that were amplified for the specimens
82 of the present study, as well as additional sequences present in the Genbank portal, making it
83 possible to make inferences phylogenetic and analysis of time of divergence and ancestral area
84 origin. The results of the present study indicate that the genus *Colomesus* harbors a high cryptic
85 diversity, where all valid species have at least one cryptic group inside then. Also, our results
86 show that the genus diverged from its marine ancestor ~16 million years ago in the current
87 Orinoco River region, with later dispersals to other Neotropical basins. Additionally, sequences
88 from the type locality of *C. asellus* indicate that this species is not present in Brazil, being
89 restricted to the northern portion of Guiana. Miocene marine incursions, as well as fluctuations
90 and glaciations during the Pleistocene/Pliocene, shaped the distribution of current lineages of
91 the genus in the Neotropics.

92

93 **Keywords:** Pufferfish; Biodiversity; Glaciations; Miocene; Amazon.

94

95

96 1. INTRODUÇÃO

97 A região conhecida como Neotrópico húmido, abriga uma das maiores biodiversidades
98 do planeta (Antonelli, et al., 2018) tendo os peixes de água doce neotropicais um dos grupos
99 mais especiosos (Albert et al., 2011; Reis et al., 2016; Albert et al., 2020), havendo
100 aproximadamente 6.000 espécies descritas distribuídas nesta região (Dagosta & de Pinna, 2019).
101 Para as espécies de peixes de água doce neotropicais, o centro de diversidade é a Amazonia,
102 também conhecida como as principais cabeceiras de rios no norte da América do Sul (Albert et
103 al., 2020). Esta ampla região é composta por duas grandes bacias principais (Orinoco e
104 Amazonas) e uma bacia costeira menor (Guianas) as quais drenam por centenas de milhares de
105 quilômetros, tendo as descargas dos rios Orinoco e Amazonas somadas, sendo equivalentes a
106 17% da superfície fluvial de todo o mundo (Allen & Pavelsky, 2018).

107 Embora esta região seja dominada por espécies de peixes que possuem associação
108 ancestral com água doce (bagres, pequenos peixes elétricos e membros dos Caraciformes),
109 também existem grupos evolutivos que são derivados de linhagens marinhas (Bloom & Lovejoy,
110 2017; Fontenelle et al., 2021), sendo este gradiente histórico de transição entre habitats salinos
111 e de água doce, uma das barreiras históricas mais limitantes a dispersão de espécies aquáticas
112 (Yamanoue et al., 2011) devido ao fato dos efeitos causados no organismo derivados de balanço
113 iônico, osmolaridade e pH, os quais afetam severamente a sobrevivência das espécies (Kato et
114 al., 2005). Desta forma, poucos grupos de espécies marinhas tiveram sucesso em invadir o
115 ambiente dulcícola sendo os Tetraodontidae, popularmente conhecidos como baiacus, uma
116 dessas exceções (Dekkers, 1975; Ebert, 2001; Yamanoue et al., 2011).

117 Dentre as linhagens de água doce, a região Neotropical é habitada pelo gênero
118 *Colomesus* (Gill, 1884), como o único remanescente endêmico do continente americano,
119 havendo representantes de outras espécies de baiacus de água doce nas regiões da África Central
120 (6) e Sudeste da Ásia (21) (Frouse & Pauly, 2023). Atualmente, o gênero é composto por três
121 espécies, *Colomesus psittacus* (Bloch & Schneider, 1801), o qual habita águas marinhas ou
122 salobras, distribuídas entre a região do Caribe, Costa norte da América do Sul até o estado de
123 Sergipe, *Colomesus asellus* (Müller & Troschel, 1849), de água doce, encontra-se em toda a
124 Amazônia, drenagens do Tocantins-Araguaia e águas costeiras da boca do Amazonas até a
125 Venezuela, sendo a linhagem com maior cobertura espacial. Recentemente, uma nova espécie
126 foi descrita (*Colomesus tocantinensis* Amaral, Brito, Silva & Carvalho, 2013), sendo está uma
127 linhagem críptica dentro de *C. asellus* tendo atualmente sua distribuição restrita em uma porção
128 do Rio Tocantins.

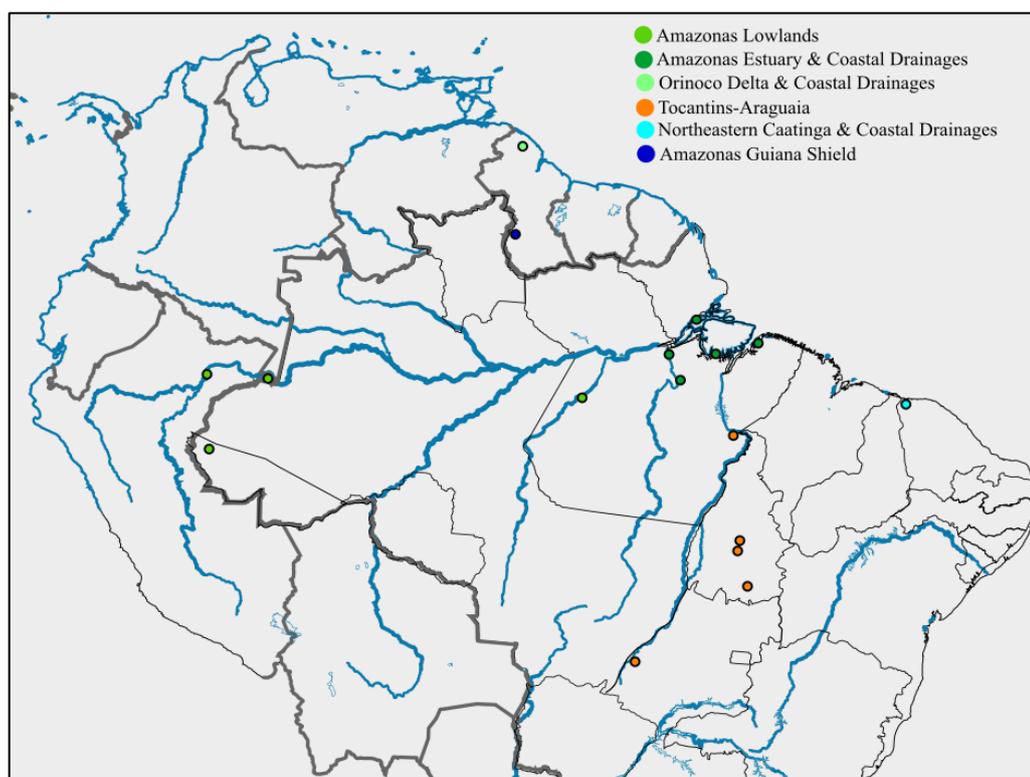
129 Desta forma, tendo os peixes neotropicais um histórico de alta diversidade a qual muitas
130 vezes foi influenciada por eventos biogeográficos, a necessidade de investigações filogenéticas
131 em grupos de espécies com ampla distribuição, como o caso de *C. asellus*, assim como os
132 indícios de linhagens crípticas dentro da espécie, faz com que uma ampla amostragem seja
133 necessária, o que pode revelar novas estruturações crípticas dentro de *Colomesus*. O objetivo
134 do presente estudo é, através do uso de marcadores mitocondriais e nuclear, investigar se
135 existem possíveis novas linhagens crípticas dentro de *Colomesus*, e houve influência de eventos
136 biogeográficos passados na atual distribuição das espécies do gênero na região neotropical.

137

138 2. MATERIAL E METODOS

139 2.1 Área de estudo

140 Amostras de *Colomesus* foram obtidas de diferentes pontos na América do Sul (Figura
141 1), tanto por amostragem direta, quanto por doação de coleções zoológicas e sequências
142 disponíveis no GenBank. De cada indivíduo foi retirado um pequeno pedaço de tecido muscular
143 que foi preservado em etanol absoluto e colocado em freezer a -4°C até o momento da extração
144 de DNA. Num total, foram reunidos 58 indivíduos, além da utilização de 21 sequências do
145 Genbank (Tabela 1).



146

147 Figura 1: Mapa com a localização das sequências do presente estudo. Legenda contém o nome da ecoregião de
148 cada ponto amostral/origem de sequencias utilizadas.

Tabela 1: Lista de sequências do utilizadas no presente estudo incluindo do Genebank.

Species	Codes	Location	Markers
<i>Colomesus asellus</i>	456	Rupununi-Guiana	COI/ATP/-
<i>Colomesus asellus</i>	8878	Porto de Moz-Pará	COI/ATP/ROD
<i>Colomesus asellus</i>	17319	Macapá-Amapá	COI/ATP/ROD
<i>Colomesus asellus</i>	10232	Porto de Moz-Pará	COI/ATP/-
<i>Colomesus psittacus</i>	16139	Ilha do mosqueiro-Pará	COI/ATP/-
<i>Colomesus tocantinensis</i>	16961	São João do Araguaia-PA	COI/ATP/-
<i>Colomesus tocantinensis</i>	16959	São João do Araguaia-PA	COI/ATP/-
<i>Colomesus asellus</i>	22900	Cruzeiro do Sul-Acre	COI/ATP/-
<i>Colomesus asellus</i>	22901	Cruzeiro do Sul-Acre	COI/ATP/-
<i>Colomesus asellus</i>	28143	Aragarças-Goiás	COI/-/ROD
<i>Colomesus asellus</i>	28144	Aragarças-Goiás	COI/-/ROD
<i>Colomesus asellus</i>	57210	Itaituba-Pará	COI/-/ROD
<i>Colomesus asellus</i>	57211	Itaituba-Pará	COI/ATP/ROD
<i>Colomesus asellus</i>	77194	Paraná-Tocantins	COI/-/ROD
<i>Colomesus asellus</i>	77197	Paraná-Tocantins	COI/ATP/-
<i>Colomesus asellus</i>	77541	Brejinho de Nazaré-Tocantins	COI/-/ROD
<i>Colomesus asellus</i>	87150	Loreto-Peru	COI/-/ROD
<i>Colomesus asellus</i>	87149	Loreto-Peru	-/ATP/ROD
<i>Colomesus psittacus</i>	85896	Chaval-Ceará	-/ATP/ROD
<i>Colomesus psittacus</i>	85897	Chaval-Ceará	COI/ATP/ROD
<i>Colomesus asellus</i>	CLM060	Breves-Pará	COI/ATP/-
<i>Colomesus asellus</i>	CLM067	Currálinho-Pará	-/ATP/ROD
<i>Colomesus asellus</i>	4876	Loreto-Peru	-/ATP/ROD
<i>Triodon macropterus</i>	AP009170/KF028010	Estimated	COI/ATP/ROD
<i>Diodon holocanthus</i>	AP009177/KC442241	Estimated	COI/ATP/ROD
<i>Sphoeroides pachygaster</i>	AP006745/KF027997	Estimated	COI/ATP/ROD
<i>Sphoeroides annulatus</i>	AP011915/JQ682415	Estimated	COI/ATP/ROD
<i>Sphoeroides testudineus</i>	AP011916/JQ682424	Estimated	COI/ATP/ROD
<i>Sphoeroides parvus</i>	AP011914/JQ682422	Estimated	COI/ATP/ROD
<i>Takifugu rubripes</i>	AP006045/JQ682430	Estimated	COI/ATP/ROD
<i>Takifugu oblongus</i>	AP009535/-	Estimated	COI/ATP/-
<i>Takifugu ocellatus</i>	AP009536/JQ682426	Estimated	COI/ATP/ROD
<i>Takifugu obscurus</i>	AP009527/-	Estimated	COI/ATP/-
<i>Lagocephalus sceleratus</i>	AP011932/-	Estimated	COI/ATP/-
<i>Lagocephalus wheeleri</i>	AP009538/JQ682409	Estimated	COI/ATP/ROD
<i>Lagocephalus lagocephalus</i>	AP011933/EU637968	Estimated	COI/ATP/ROD
<i>Lagocephalus laevigatus</i>	AP011934/JQ682406	Estimated	COI/ATP/ROD
<i>Marylina darwiini</i>	AP011937/JQ682410	Estimated	COI/ATP/ROD
<i>Colomesus asellus</i> (type species)	TZGAA116-06	Barima-Waiiani-Peru	COI
<i>Colomesus asellus</i> (type species)	TZGAA127-06	Barima-Waiiani-Peru	COI
<i>Colomesus asellus</i> (Peru)	KC959914	Iquitos-Peru	COI
<i>Colomesus asellus</i> (Peru)	KC959913	Iquitos-Peru	COI
<i>Colomesus tocantinensis</i> (type species)	KC959918	Porto Nacional-Tocantins	COI
<i>Colomesus tocantinensis</i> (type species)	KC959917	Porto Nacional-Tocantins	COI

151 2.2 Extração de DNA e sequenciamento

152 Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Centro Avançado de Estudos da
153 Biodiversidade (CEABIO), onde fora realizado a Extração do DNA, PCR's até a reação de
154 sequenciamento final.

155 O DNA total foi extraído de amostras de tecido muscular preservadas no álcool em tubos
156 Eppendorf's, seguindo o protocolo modificado de CTAB modificado (Doyle & Doyle, 1987).
157 Para o presente estudo, serão utilizando dois marcadores genéticos de DNA mitocondrial (COI,
158 ATPase6/8) e um nuclear (Rodopsina), os *primers* que serão utilizados para cada amplificação
159 de cada loco estão disponíveis na Tabela 2.

160 Cada reação de PCR apresentou um volume final de 25µL, contendo 2 mM de dNTPs,
161 Tampão (5x), 2,4 mM de MgCl₂, 2 µL de DNA molde, 0,5 µL de cada primer, 0,2 µL de Taq
162 polimerase e 12,4 µL de água ultrapura. As condições da PCR para COI foram: 94°C por 4
163 minutos para desnaturação inicial, seguido por 30 ciclos de 92°C por 30 segundos para
164 desnaturação, 58,5°C por 30 segundos para hibridação, 72°C por 1:30 minutos para extensão, e
165 extensão final a 72°C por 10 minutos. Para ATPase6/8 foram: 94°C por 2 minutos para
166 desnaturação inicial, seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 63°C
167 por 1 minuto para hibridação, 72°C por 2 minutos para extensão, e extensão final a 72°C por 7
168 minutos. E para Rodopsina foram: 94°C por 3 minutos para desnaturação inicial, seguido por
169 30 ciclos de 94°C por 45 segundos para desnaturação, 61°C por 1 minuto para hibridação, 72°C
170 por 1:30 minutos para extensão, e extensão final a 72°C por 10 minutos.

171 A purificação das PCR's foi feita utilizando Isopropanol, posteriormente, foram feitas
172 duas lavagens com etanol 70%, em seguida todas as amostras foram ressuspensas com 20 µL
173 de água UP (Ultra pura), finalmente armazenadas no freezer à -20°. A reação de sequenciamento
174 foi efetuada pelo método de dideoxinucleotídeos terminais (Sanger et al., 1977) usando
175 reagentes do kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems/Life
176 Technologies) e as sequências de DNA foram obtidas no sequenciador automático modelo ABI
177 3500 XL, da Applied Biosystems.

178

179 Tabela 2: Lista de *Primers* utilizados no presente estudo.

Locus	Primers	Referência
COI	VF2 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAA CCA ACC ACA AAG ACA TTG GCA C-3' FishF2-5' TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC-3'	Ward et al. (2005)

ATPase6/8	L8331 5'-AAA GCR TYR GCC TTT TAA GC-3'	Perdices <i>et al.</i> , (2002)
	H9236 5'-GTT AGT GGT CAK GGG CTT GGR TC-3'	
Rodopsina	Rh-193 5'-CNT ATG AAT AYC CTC AGT ACT ACC-3'	Chen <i>et al.</i> , (2003)
	Rh-1073r 5'-CCR CAG CAC ARC GTG GTG ATC ATG-3'	

180

181 *2.3 Análises moleculares: Reconstruções filogenéticas*

182 Para COI foram recuperadas 38 sequências (utilizamos 20), 18 para ATPase 6/8 e 15
183 para Rodopsina onde foram alinhadas através da ferramenta de alinhamento automático
184 CLUSTALW (Thompson et al., 1997) implementada no programa BioEdit v. 7.0.4 (Hall, 1999).
185 Posteriormente, as mesmas passaram por inspeção visual no intuito de corrigir quaisquer
186 inconsistências. Foram utilizadas como grupos externos: *Spherooides testudineus* (Linnaeus,
187 1758), *Spherooides parvus* (Shipp & Yerger, 1969), *Spherooides pachygaster* (Müller &
188 Troschel, 1848), *Spherooides annulatus* (Jenyns, 1842), *Takifugu rubripes* (Temminck &
189 Schlegel, 1850), *Takifugu oblongus* (Bloch, 1786), *Takifugu ocellatus* (Linnaeus, 1758),
190 *Takifugu obscurus* (Abe, 1949), *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789), *Lagocephalus*
191 *wheeleri* (Abe, Tabeta & Kitahama, 1984), *Lagocephalus lagocephalus* (Linnaeus, 1758),
192 *Lagocephalus laevigatus* (Linnaeus, 1766), *Marilyna darwinii* (Castelnau, 1873), *Triodon*
193 *macropterus* (Lesson, 1831) e *Diodon holocanthus* (Linnaeus, 1758).

194 Para o presente estudo, dois bancos de dados foram utilizados. O primeiro referente a
195 sequências do gene COI e o segundo, com todos os genes amplificados (COI, ATPase 8/6 e
196 Rodopsina). Isto foi devido ao fato de que só estavam disponíveis sequências de alguns
197 indivíduos apenas para o gene COI. Para os dois bancos de dados, os modelos evolutivos que
198 melhor se adequaram a cada banco de dados foram estimados no programa JModelTest v. 2.3.1
199 (Darriba *et al.*, 2012). Para o banco de COI, foram utilizadas análises de Máxima
200 Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI), onde a primeira foi gerada no programa
201 PhyML v. 3.0 (Guindon et al., 2010), onde suporte estatístico para os ramos será avaliado com
202 1000 repetições de *bootstrap* (Felsenstein, 1985). Para as árvores de Inferência Bayesiana será
203 utilizado o programa Mr. Bayes 3.2 (Ronquist *et al.*, 2012). As análises serão feitas com pelo
204 menos duas corridas através do algoritmo de MCMC, tendo cada corrida 3.0×10^8 gerações,
205 tendo o burn-in referente a 10% das árvores iniciais as quais serão descartadas. As
206 probabilidades bayesianas *a posteriori* serão definidas através do consenso de 80% (0.8), sendo
207 cada árvore amostrada a cada 1000 gerações. As edições das árvores filogenéticas serão
208 realizadas FigTree v. 1.4.4 (Rambaut, 2018).

209 Para o banco contendo os três marcadores, além da árvore de ML estimada no PhyML
210 3.0, uma árvore de espécies foi estimada no programa BEAST 1.8 (Drummond et al., 2012),
211 utilizando-se o pacote *BEAST (Heled et al., 2011), onde a definição de cada possível linhagem
212 evolutiva distinta foi baseada previamente com o resultado das topologias obtidas pela árvore
213 de COI (neste caso, as estruturações só foram testadas para os mesmos clados que possuíam
214 sequências em pelo menos dois dos três marcadores). Com base em cada resultado obtido, uma
215 nova corrida era realizada com o intuito de simular se as estruturações obtidas anteriormente
216 apresentavam probabilidades a posteriori significativas ou não (no caso de uma possível
217 estruturação críptica de dentro de uma espécie, esta era simulada como linhagens distintas e
218 posteriormente como uma única linhagem).

219 Os modelos evolutivos para cada partição foram “deslincados” (TN93+I para COI, HKY
220 para ATPase 8/6 e HKY+I+G para rodopsina). Posteriormente utilizamos o modelo de relógio
221 estrito bem como Yule Process como parâmetro para árvore (Heled et al., 2011). Quatro
222 corridas simultâneas usando as Cadeias Markovianas de Monte Carlo (Markov Chain Monte
223 Carlo-MCMC) foram simuladas em 80 milhões de gerações, tendo amostragens retiradas a cada
224 40,000 gerações. Apenas corridas com valores de ESS superiores a 200 em todas as
225 probabilidades marginais foram consideradas. A árvore consenso resultante foi sumarizada
226 utilizando o TreeAnnotator V.1.8 (Drummond et al 2012), tendo as primeiras 10%, sendo
227 descartadas como burn-in.

228

229 2.4 Estimativa de tempo de ancestral comum mais recente de divergência e reconstrução da 230 área ancestral

231 O tempo do ancestral comum mais recente (TMRCA) foi estimado através do programa
232 BEAST v. 2.5 (Bouckaert et al., 2019), utilizando os dois bancos de dados distintos. Os modelos
233 evolutivos para cada partição (COI, ATPase 8/6 e Rod) seguiram os mesmos estimados
234 anteriormente para árvore de espécies (no caso dos três genes) e para inferência bayesiana (COI).
235 Para ambos os bancos de dados o Yule prior: speciation foi usado como parâmetro da árvore,
236 sendo modelado por um relógio evolutivo do tipo log-normal (Drummond et al 2006). Todas as
237 calibrações também foram configuradas seguindo o modelo de relógio log-normal. Os pontos
238 de calibração foram com base nos estimados por Yamanoue et al., (2011). O primeiro, referente
239 a separação entre *Marilyna darwinii* e o ancestral do gênero *Takifugu* (~50.1 mya). O segundo
240 separação entre *Lagocephalus sceleratus* em relação a *L. wheeleri*, *L. lagocephalus* e *L.*

241 *laevigatus* (~40.6mya) e por fim, separação entre o gênero *Sphoeroides* e as espécies de
242 *Colomesus* (menos *C. tocantinesis*) (~31.0 mya).

243 Quatro corridas independentes utilizando as Cadeias Markovianas de Monte Carlo
244 foram realizadas com um total de 100 milhões de gerações, tendo estas corridas uma cadeia fria
245 e três aquecidas, com amostras sendo salvas a cada 10.000 gerações. Os arquivos re log das
246 corridas resultantes foram sumarizados no programa Tracer 1.4 (Rambaut e Drummond, 2007)
247 tendo apenas corridas com valores de ESS iguais ou superiores a 200 em todas as probabilidades
248 marginais, foram consideradas. A árvore consenso resultante foi sumarizada utilizando o
249 TreeAnnotator V.1.8 (Drummond et al., 2012), tendo as primeiras 10%, sendo descartadas como
250 burn-in.

251 O programa RASP 4 (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies) (Yu et al., 2020) foi
252 utilizado para estimativa da área ancestral de origem do gênero *Colomesus* aplicando o Método
253 Binário Bayesiano (Bayesian Binary Method-BBM). As árvores de tempo de divergência
254 geradas anteriormente foram utilizadas como guia juntamente com o local de amostragem dos
255 espécimes e sequências utilizadas as quais foram sumarizadas, utilizando-se o nível de
256 ecoregião para as reconstruções. Estas ecoregiões foram inferidas utilizando os guias de
257 Spalding et al., (2007) para linhagens marinhas/costeiras e Abell et al (2008) para linhagens de
258 água doce.

259 **3 RESULTADOS**

260 *3.1 Padrões filogenéticos e biogeografia histórica*

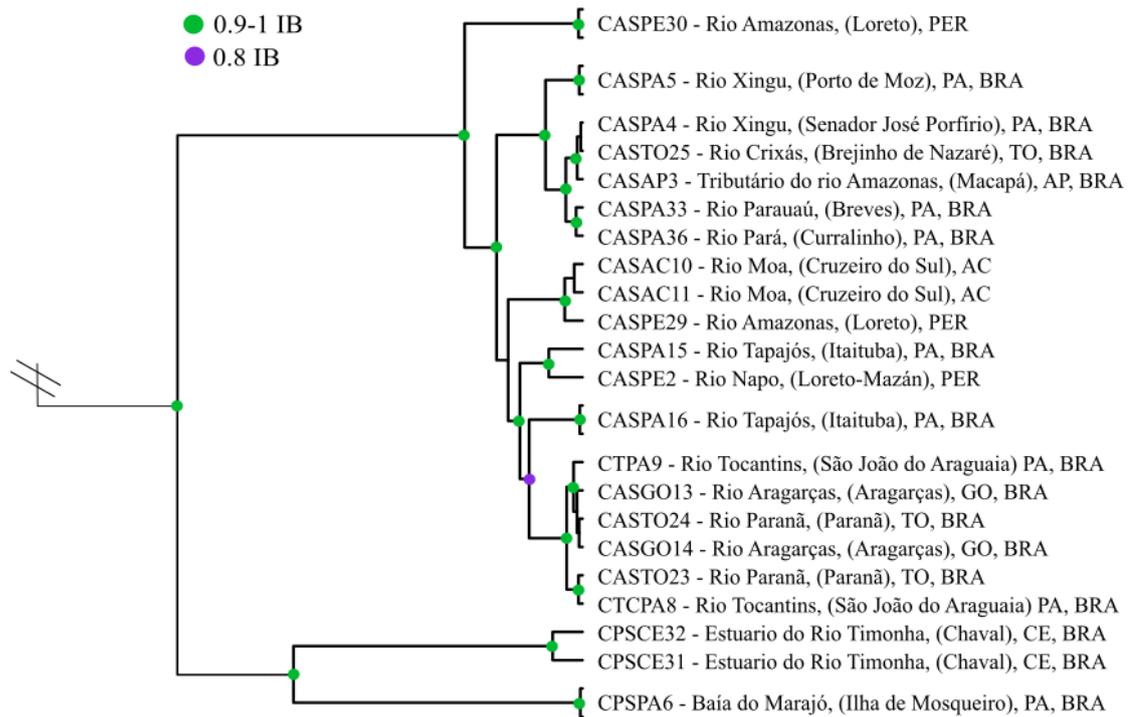
261 Os resultados obtidos para cada um dos bancos de dados utilizados no presente estudo,
262 foram relativamente contrastantes em indicar linhagens crípticas dentro do gênero *Colomesus*.
263 A árvore de espécies recuperou estruturas dentro das três espécies do gênero (Figura 2). *C.*
264 *psittacus* foi recuperado em dois clados (Baía do Marajó-PA e Chaval-CE) com altos valores
265 de suporte, sendo a linhagem mais derivada dentro do gênero. Em seguida, uma espécie do Perú
266 (CasPE30, Loreto, Rio Amazonas) identificado como *C. asellus* formou um clado distinto em
267 relação a outras sequências de *Colomesus* do presente estudo. Estruturas adicionais também
268 foram recuperadas dentro do Rio Xingu contendo duas linhagens (CasPA5 e CasPA4) além dos
269 Rio Crixás (Tocantins) e tributário do Amazonas, no estado do Amapá. Outra linhagem
270 recuperada foi referente a região oeste da Ilha de Marajó (Breves e Curralinho). Dentro de *C.*
271 *asellus* mais três linhagens foram recuperadas. Acre e Peru (CasAC10, 11+CasPE29), Rio
272 Tapajós com duas linhagens + Rio Napo (CasPA15 + CasPE2 e CasPA16). Nossos resultados
273 também apontam a presença de outra linhagem críptica dentro de *C. tocantinesis*, além de

274 indicar uma maior ocorrência deste espécies em outros rios, como Aragarças (Goiás) e Paranã
275 (Tocantins). Esta última, assim como outras estruturas recuperadas no presente estudo,
276 também houve simpatria entre linhagens genéticas para *C. tocantinensis* (Figura 2).

277 A estimativa de tempo de divergência bem como a rota de dispersão ancestral indicou
278 que o gênero *Colomesus* surgiu a ~ 16 milhões de anos durante o Mioceno (Tabela 3, nó A,
279 Figura 3) na ecoregião Northern California (H), tendo dispersado posteriormente para Southern
280 Gulf of Mexico (I), em seguida para (D) Amazonas Lowlands. Posteriormente, o surgimento
281 do ancestral do complexo *C. psittacus* separou do ancestral das outras linhagens de *Colomesus*
282 a ~5.38 mya na ecoregião Amazonas Lowlands (D), ficando estas linhagens de *C. psittacus*
283 mais associadas a ambientes marinhos/estuarinos (Tabela 3, nó B, figura 3). O início do
284 Plioceno marcou os outros eventos de especiação dentro do que seriam as linhagens de água
285 doce de *Colomesus*, tendo o que seria a primeira linhagem críptica dentro de *C. asellus* (aqui
286 chamado de *C. asellus* I) do Peru surgiu a ~2.75 milhões de anos na ecoregião Amazonas
287 Lowlands (D). Posteriormente *C. asellus* II o qual está distribuído atualmente entre rios dos
288 estados de AP, PA e TO e os complexos crípticos das linhagens de água doce divergiram a ~2
289 milhões de anos, tendo o evento ocorrido na ecoregião Amazonas Lowlands (D), com posterior
290 dispersão até Amazonas Estuary (E). Em pouco tempo posterior, a separação entre a terceira
291 linhagem dentro do complexo *C. asellus* (Acre e Peru) em relação ao restante dos complexos
292 crípticos de *C. asellus* e *C. tocantinensis* e a separação desta em relação a *C. tocantinensis*
293 ocorreram com intervalo inferior a 20 mil anos entre elas (~1.77 e ~1.46 milhões de anos
294 respectivamente) tendo estes eventos ocorridos na mesma ecoregião. O evento de especiação
295 entre as linhagens de *C. tocantinensis* foi inferior a ~1 milhão de anos.

296 Com relação ao banco de dados de COI, houve algumas diferenças na quantidade de
297 clados recuperados pelas análises genéticas principalmente pelo fato de haverem mais
298 sequencias em relação ao banco concatenado, como indivíduos provenientes da localidade tipo
299 de *C. asellus*. A análise de mGYMC recuperou seis grupos de linhagens, entre elas estão um
300 grupo com a espécie-tipo de *C. asellus*, grupo com linhagens do Peru e Guiana, grupo com duas
301 linhagens do Pará, grupo com duas linhagens do Acre, grupo com duas linhagens, uma do Pará
302 e uma do Ceará, por fim um grupo com linhagens da ecoregião Tocantins-Araguaia, incluindo
303 uma sequência da localidade tipo de *C. tocantinensis*. Para mPTP foram recuperados oito
304 grupos e para bPTP foram recuperados 12 (barras verticais na Figura 4).

305



306

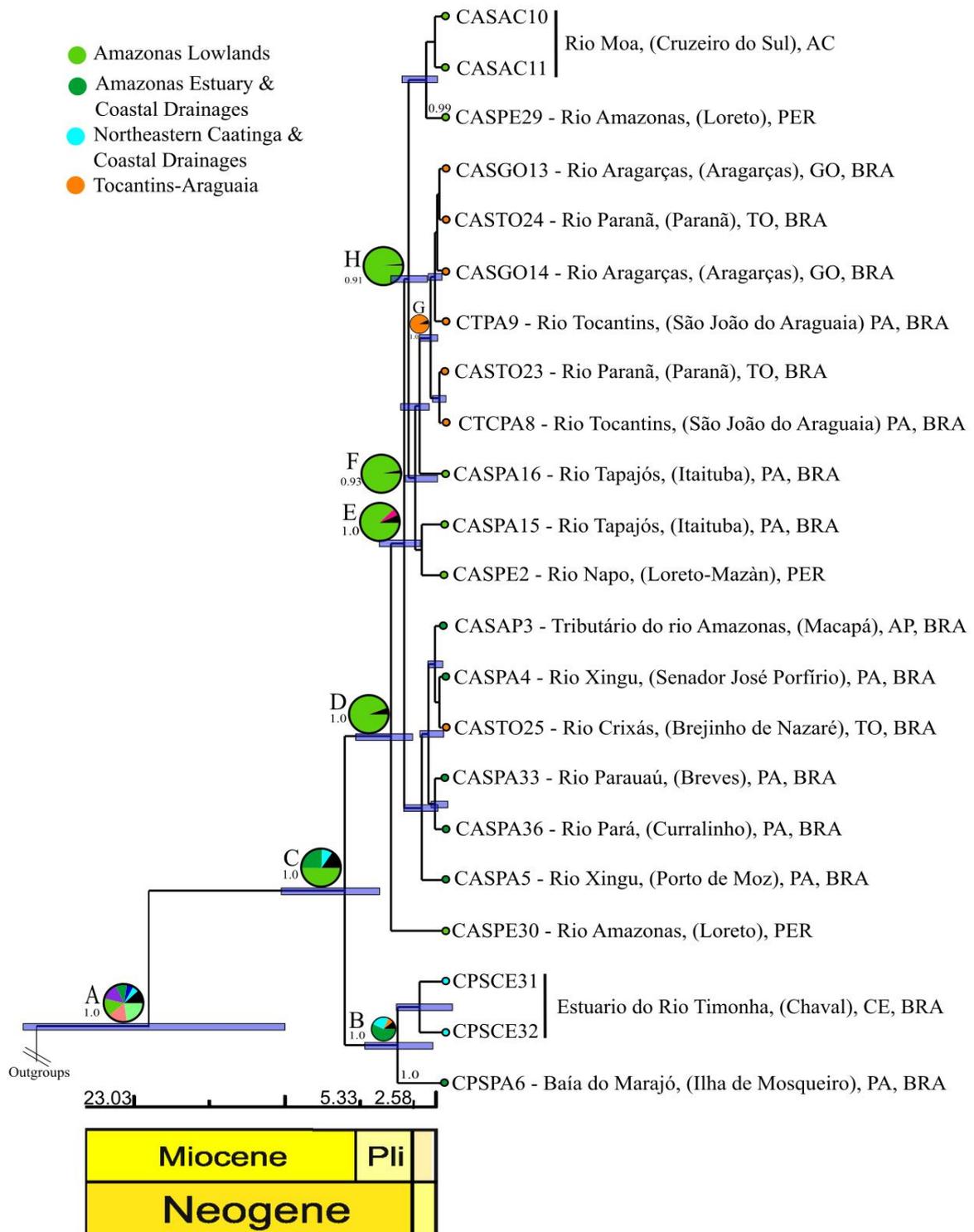
307 Figura 2: Árvore de espécies contendo sequencias do gênero *Colomesus* analisadas no presente estudo. Apenas
 308 valores de probabilidade a posteriori superiores a 0.8 (80%) são mostradas na árvore. Cor verde representa valor
 309 de probabilidades *a posteriori* entre 0.9-1.0 e cor roxa valores entre 0.8-0.89.

310

311 Tabela 3: Resumo dos tempos de divergência bem como rotas de dispersão das linhagens do gênero *Colomesus*
 312 inferidas no presente estudo contendo os três marcadores (COI, ATPase6/8 e Rod). Cada letra na primeira coluna
 313 faz referência a um dos nós contidos na figura 3. H: Northern California; I: Southern Gulf of Mexico; D: Amazonas
 314 Lowlands; B: Northern Gulf of Mexico; E: Amazonas Estuary & Coastal Drainages; G: Southeastern Brazil; F:
 315 Northeastern Caatinga & Coastal Drainages.

Node	Event	Divergence Time Estimated (Mya)	Ancestral area	Route (Probability)	Disp./Vic./Ext.
A	Rising of the ancestor of <i>Colomesus</i>	~16.04mya	H – 23.15%; I – 15.71%; D – 15.11%; B – 13.77%; E – 9.56%; G – 5.44%; F – 5.35%; * – 11.90%	H->HD->H D (0.0768)	Dispersal: 1 Vicariance: 1 Extinction: 0
B	Separation of <i>C. psittacus</i> (Baía do Marajó) from <i>C. psittacus</i> (Ceará).	~2.4mya	E – 57.26%; F – 24.69%; D – 7.37%; * – 10.73%	E->EF->E F (0.5487)	Dispersal: 1 Vicariance: 1 Extinction: 0
C	Separation of freshwater lineages of <i>Colomesus</i> ancestral and <i>C. Psittacus</i> species complex	~5.38mya	D - 50.39%; E – 25.15%; F -8.86%; * - 15.60%	D->ED->E D (0.2720)	Dispersal: 1 Vicariance: 1 Extinction: 0

D	Separation of <i>C. asellus</i> I (Peru) from the ancestral of <i>C. asellus</i> cryptic complex and <i>C. tocontinensis</i>	~2.75mya	D – 94.26%; * - 5.74%	D->D^D- >D D (0.8277)	Dispersal: 0 Vicariance: 0 Extinction: 0
E	Separation of <i>C. asellus</i> II (AP, PA, TO) from the <i>C. asellus</i> cryptic complex and <i>C. tocontinensis</i>	~2.04mya	D - 87.81%; ED – 5.5%; * - 6.64%	D->ED- >E D (0.7921)	Dispersal: 1 Vicariance: 1 Extinction: 0
F	Separation of <i>C. asellus</i> IV from <i>C. asellus</i> V	~1.46mya	D – 96.92%; * - 3.08%	D->D^D- >D D (0.8677)	Dispersal: 0 Vicariance: 0 Extinction: 0
G	Separation of <i>C. tocontinensis</i> I from the rest of <i>C. tocontinensis</i> complex	~5.4mya	C – 92.51%; * - 7.49%	C->C^C- >C C (0.9128)	Dispersal: 0 Vicariance: 0 Extinction: 0
H	Separation of <i>C. asellus</i> III (AC and Peru) from the ancestor of <i>C. asellus</i> IV and <i>C. tocontinensis</i>	~1.77mya	D – 98.32%; * - 1.68%	D->D^D- >D D (0.9473)	Dispersal: 0 Vicariance: 0 Extinction: 0



316

317

318

319

320

321

322

Figura 3: Árvore de tempo de divergência concatenada (COI+ATPase6/8 + Rod) contendo as ecoregiões utilizadas no RASP 4 para inferir área de origem ancestral. (BRA) Brasil, (PER) Peru, (PA) Pará, (AP) Amapá, (TO) Tocantins, (GO) Goiás, (CE) Ceará.

De acordo com os resultados obtidos da árvore de tempo de divergência e estimativa de área ancestral do banco de COI, as linhagens de *C. asellus* presentes no Brasil são

323 geneticamente distintas das linhagens de onde é sua localidade tipo, rio Barima, na costa da
324 Guiana, com altos valores de probabilidade a posteriori.

325 Para o banco de dados de COI a estimativa de tempo de divergência bem como a rota
326 de dispersão ancestral indicou que o gênero *Colomesus* surgiu a ~7.09 milhões de anos (Tabela
327 4, nó A, Figura 4), na ecoregião do Orinoco Delta (H), tendo dispersado posteriormente para
328 Amazonas Lowlands (D). Em seguida houve a separação da espécie-tipo de *C. asellus* do resto
329 das linhagens de *Colomesus* ~4.36mya, onde ocorreram na ecoregião Amazonas Lowlands (D).
330 Posterior a isso houve a separação de uma linhagem de *C. psittacus* da Baía do Marajó, do resto
331 das linhagens de *Colomesus*, onde ocorreram a ~3.77mya, inicialmente na Amazonas Lowlands
332 (D), onde possivelmente seguiu para a ecoregião Amazonas Estuary (E). Novamente o início
333 do Plioceno marcou os seguintes eventos de especiação entre as linhagens de água doce de
334 *Colomesus*, houve a separação de uma sequência identificada como *C. asellus* do Rio Napo
335 (OTU IV) a ~3.24mya, divergindo de *C. asellus* do Tapajós e sequências do Tocantins-Araguaia,
336 evento que ocorreu na ecoregião Amazonas Lowlands (D). Em seguida houve a separação de
337 *C. asellus* (OTU V) do complexo de espécies de *C. tocaninensis* a cerca de ~2.09mya,
338 ocorrendo na ecoregião Amazonas Lowlands (D), com posterior dispersão até Tocantins-
339 Araguaia (C). Dois indivíduos (OTU VI), considerados como linhagem críptica dentro de *C.*
340 *tocantinensis*, divergiram da espécie-tipo de Porto Nacional a ~1.31mya, na ecoregião do
341 Tocantins-Araguaia, onde esta divergiu a ~9.41mya do complexo de espécies de *C.*
342 *tocantinensis*, na mesma ecoregião. Posteriormente o complexo de espécies de *C. asellus*, o
343 qual está distribuído atualmente entre rios dos estados de AP, PA, TO e CE, especiarão a
344 ~2.75mya, tendo o evento ocorrido na ecoregião Amazonas Lowlands (D). Por fim, a separação
345 entre a terceira linhagem dentro do complexo *C. asellus* (Acre, Guiana e Peru), em relação ao
346 restante dos complexos crípticos de *C. asellus* e *C. tocaninensis* e a separação desta em relação
347 a *C. tocaninensis* ocorreu a ~2.17mya, na ecoregião Amazonas Lowlands (D), de onde seguiu
348 para a ecoregião Amazonas Estuary (E).

349 As linhagens do Tocantins-Araguaia sempre recuperaram juntas tanto para o banco de
350 COI quanto para o concatenado, e as sequências de *C. tocaninensis*, localidade tipo, recuperam
351 de forma separada da de outras localidades da bacia com alto valor de suporte. Uma sequência
352 do Tocantins-Araguaia sempre recuperou dentro do clado com sequências da ecoregião
353 Amazonas Estuary, possivelmente espécies de *C. asellus* podem viver em simpatria com *C.*
354 *tocantinensis*, na ecoregião e bacia do Tocantins-Araguaia. E uma sequência de *C. psittacus* do
355 Ceará, recupera junto com *C. psittacus* (OTU III) apenas no banco de dados concatenado
356 (Figura 3).

357 Tabela 4: Resumo dos tempos de divergência bem como rotas de dispersão das linhagens do gênero *Colomesus*
 358 inferidas no presente estudo contendo o gene COI. Cada letra na primeira coluna faz referência a um dos nós
 359 contidos na figura 3. H: Orinoco Delta; D: Amazonas Lowlands; E: Amazonas Estuary & Coastal Drainages; A:
 360 Northeastern Honshu; C: Tocantins-Araguaia

Node	Event	Divergence Time Estimated (Mya)	Ancestral area	Route (Probability)	Disp./Vic./Ext.
A	Rising of the <i>Colomesus</i> genus	~7.09mya	H – 48.43%; D – 30.28%; A – 7.04%; * - 14.25%;	H->HD->H D (0.4905)	Dispersal: 1 Vicariance: 1 Extinction: 0
B	Separation of <i>C. asellus</i> type species (OUT I) from <i>C. asellus</i> (Iquitos) (OUT II) and <i>C. asellus</i> lineages	~4.36mya	D – 95.40%; * - 4.60%;	D->D^D->D D (0.8657)	Dispersal: 0 Vicariance: 0 Extinction: 0
C	Separation of <i>C. psittacus</i> (OUT III) from <i>C. asellus</i> lineages	~3.77mya	D – 91.25%; * - 8.75%;	D->ED->E D (0.9005)	Dispersal: 1 Vicariance: 1 Extinction: 0
D	Separation of <i>C. asellus</i> IV (Peru) (OUT IV) from <i>C. tocantinensis</i> and <i>C. asellus</i> lineages	~3.24mya	D – 98.68%; * - 1.32%;	D->D^D->D D (0.9629)	Dispersal: 0 Vicariance: 0 Extinction: 0
E	Separation of <i>C. asellus</i> V (OUT V) from <i>C. tocantinensis</i> complex	~2.09mya	D – 92.09%; CD – 5.63%; * - 2.28%;	D->DC->D C (0.8193)	Dispersal: 1 Vicariance: 1 Extinction: 0
F	Separation of <i>C. tocantinensis</i> I (OUT VI) from <i>C. tocantinensis</i> type species and <i>C. tocantinensis</i> complex	~1.31mya	C – 88.97%; CD – 6.51% * - 4.52%;	C->C^C->C C (0.8778)	Dispersal: 0 Vicariance: 0 Extinction: 0
G	Separation of <i>C. tocantinensis</i> type species (OUT VII) from <i>C. tocantinensis</i> complex	~9.41mya	C – 99.29%; * - 0.71%;	C->C^C->C C (0.9879)	Dispersal: 0 Vicariance: 0 Extinction: 0
H	Separation of <i>C. asellus</i> V, <i>C. tocantinensis</i> I, <i>C. tocantinensis</i> type species and <i>C. tocantinensis</i> complex from <i>C. asellus</i> lineages	~2.75mya	D – 97.58% * - 2.42%;	D->D^D->D D (0.8837)	Dispersal :0 Vicariance:0 Extinction:0
I	Separation of <i>C. asellus</i> II (PA, AP, CE, TO) from <i>C. asellus</i> III (OUT XI) (AC, Peru and Guyana)	~2.17mya	D – 96.98%; * - 3.02%;	D->ED->E D (0.4679)	Dispersal: 1 Vicariance: 1 Extinction: 0

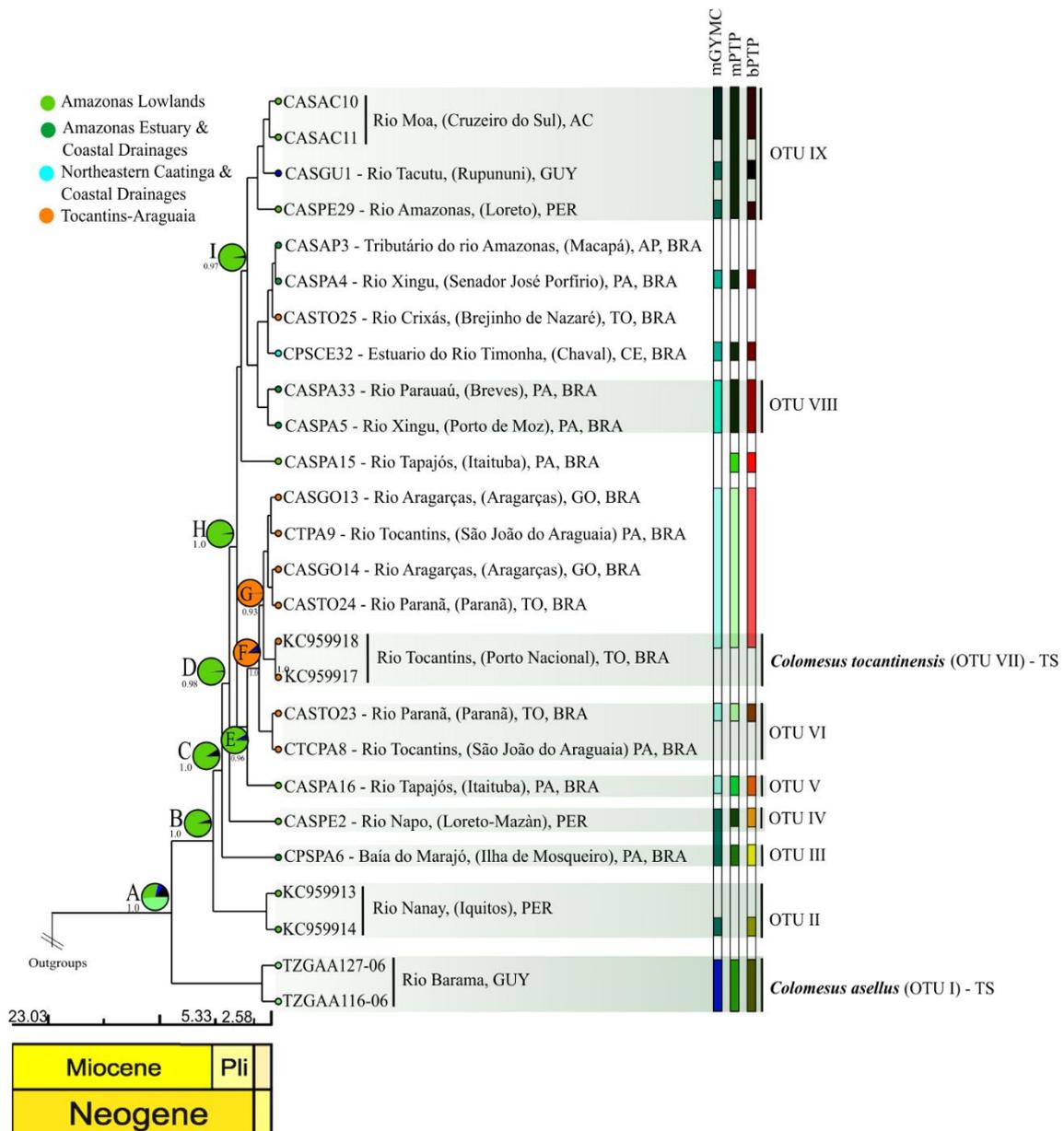
361

362

363

364

365



366

367

368

369

370

371

372

4 DISCUSSÃO

373

4.1 Padrões filogenéticos e especiação em *Colomesus*.

374

375

376

377

378

Os Tetraodontiformes, possuem algumas características muito marcantes que os separam de outras linhagens de peixes onde, a principal é a presença de quatro grandes placas dentais, bem como a capacidade de inflar o corpo em situações de ameaças, além da presença de Tetrodotoxina em seus tecidos, fato este que já causou vários acidentes fatais ao redor do

379 mundo (Amaral et al., 2013). Adicionalmente, possuem um dos menores genomas entre todos
380 os vertebrados conhecidos, os tornando assim, ótimos organismos modelo para estudos
381 evolutivos. (Hinegardner & Rosen, 1972; Yamanoue et al., 2011).

382 A espécie do gênero que possui a maior distribuição até o momento era *C. asellus*, o
383 qual pode ser encontrado distribuído em toda a bacia amazônica e drenagens do Tocantins-
384 Araguaia, bem como em ambientes costeiros com baixa salinidade da boca do Amazonas até a
385 Venezuela (Muller & Troschel, 1849, Rotundo et al., 2021). Entretanto, Amaral et al., (2013)
386 através de taxonomia integrativa, descreveram *C. tocantinensis* como uma linhagem críptica
387 dentro de *C. asellus*, inicialmente restrito a região de Porto Nacional (Tocantins-Araguaia).
388 Nossos dados indicam que a linhagem da localidade tipo de *C. tocantinensis* está presente
389 apenas neste ponto, mas que, indivíduos presentes na porção norte do Rio Tocantins (São Joao
390 do Araguaia-PA) bem como ao sul (Goiás) formam uma linhagem irmã de *C. tocantinensis* e
391 desta forma indicando que esta espécie está presente apenas na porção superior do Rio
392 Tocantins. Amaral et al., (2013) também demonstram a presença de duas possíveis linhagens
393 críptica e simpátrica de *C. asellus* formada por indivíduos provenientes de Loreto no Peru, um
394 padrão de estruturação também observado em outras espécies de peixes de água doce
395 neotropicais desta região (Rodrigues, 2021; Gales et al., 2022).

396 Entretanto, os autores não utilizaram no seu estudo sequencias provenientes da
397 localidade tipo da espécie (Rio Barama, Guiana) o que desta forma, não poderia caracterizar
398 (geneticamente) se as linhagens de *C. asellus* utilizadas por estes efetivamente corresponderiam
399 a *C. asellus* tipo (Muller & Troschel, 1849). No presente estudo, nossos resultados apontam que
400 sequencias de espécimes desta localidade correspondem a uma linhagem evolutiva
401 independente indicando que no Brasil, não existe a presença desta espécie, mas sim, de um
402 grande complexo críptico (*C. aff. asellus*), bem como a presença de uma linhagem irmã de *C.*
403 *asellus* dentro da própria Guiana.

404 A primeira relação filogenética com todas as espécies do gênero foi realizada por
405 Amaral et al., (2013), demonstrando *C. psittacus* como a linhagem mais derivada em relação as
406 duas espécies predominantemente de água doce. Nossos dados recuperaram este padrão,
407 entretanto com a presença de uma outra linhagem dentro de *C. psittacus*. A espécie
408 originalmente é relatada distribuída desde Cuba, até a costa nordeste do Brasil (região de
409 Sergipe) estando preferencialmente associado a ambientes costeiros (Rotundo et al, 2021),
410 embora não seja conhecido de onde é o espécime tipo (Block & Schneider, 1801). Com o banco
411 de COI, um indivíduo originário do município de Chaval, estado do Ceará, foi recuperando
412 dentro do clado de uma das linhagens crípticas de *C. aff. asellus* do presente estudo, embora

413 com valores de suporte baixo. Entretanto, com o banco de dados contendo todas os marcadores,
414 este espécime foi recuperado como linhagem irmã de *C. psittacus* do litoral paraense.
415 Adicionalmente, nossos resultados indicam que não existe *C. asellus* no Brasil, visto que
416 sequencias de indivíduos da mesma localidade tipo, foram recuperados como mais derivados
417 nas filogenias recuperadas com nossos dados onde todas as linhagens propostas no presente
418 estudo, necessitam ser descritas.

419

420 4.2 Biogeografia histórica

421 O fato do presente estudo ter apresentado uma diversidade oculta tão alta dentro de todas
422 as linhagens evolutivas conhecidas das espécies do gênero, ilustrando outro grupo fortemente
423 impactado pelos eventos biogeográficos ocorridos durante o período do Mioceno na região Ne-
424 otropical do Norte da América do Sul, os quais já influenciaram uma série de outras espécies
425 de peixes neotropicais (Fontenelle et al., 2021; Gales et al., 2022; Rodrigues, 2022) e no caso
426 do gênero *Colomesus* em especial, as incursões marinhas do Mioceno (Roberts, 1972; Lovejoy,
427 2006; Wesselingh & Hoorn, 2011). Embora, a influência destas incursões ainda seja muito de-
428 batida, a incursão do Caribe, através da Bacia de Llanos (Colômbia-Venezuela) as quais causa-
429 ram isolamento de várias espécies marinhas dentro da porção oeste da América do Sul (Lovejoy,
430 1998; Bloom & Lovejoy, 2011), nossos resultados indicam que os baiacus de água doce neo-
431 tropicais também foram influenciados por este evento, fazendo parte agora de um vasto grupo
432 de espécies com história evolutiva similar (Fontenelle et al. 2021; Rodrigues, 2021; Gales et al.
433 2022), fato este reforçado pela especiação primária de *C. psittacus*, em detrimento das linhagens
434 de água doce dentro do gênero.

435 Yamanoue et al. (2011), realizaram uma das mais completas revisões biogeográficas
436 dentro de Tetraodontiformes, tendo demonstrado que, diferentes espécies de água doce de bai-
437 acus nas regiões tropicais da América do Sul, África Central e Asia, possuíram invasões de seus
438 respectivos ancestrais marinhos de forma independente, e os representantes da América do Sul
439 a invasão ocorreu durante o Mioceno, estando os intervalos de confiança estimados no presente
440 estudo, em concordância com esta datação. O mesmo pode ser inferido, com relação a separação
441 entre as linhagens marinhas/salobras (complexo *C. psittacus*) e as linhagens dulcícolas (com-
442 plexo de espécies de *C. aff. asellus* e *C. tocantinensis*), ocorrido durante o mioceno. Durante
443 esse período, o alto e médio Amazonas estavam geograficamente desconectados da região hoje
444 conhecida por Amazonas Lowlands e as faunas aquáticas e terrestres provavelmente encontra-
445 vam-se isoladas (Fontenelle et al., 2021), esse fato pode explicar a separação de as linhagens

446 marinhas/estuarinas das linhagens exclusivamente de água doce seguida de uma dispersão ao
447 final do sistema pantanoso de lagos Pebas (~10 ma) conectando as porções Oeste e Leste do
448 Amazonas, antes disso as extensões oriental e ocidental ainda estavam separadas pelo Arco de
449 Purus (Figueiredo et al., 2009), que após a elevação do Arco de Vaupes, liberou um alto aporte
450 de sedimentos do *foreland* subandino contribuindo para o rompimento do Arco de Purus e a
451 formação da drenagem transcontinental da Amazônia moderna (Horton, 2017), ainda durante o
452 mioceno inferior houve o bloqueio da conexão do Pebas com o Caribe após o soerguimento do
453 Mérida Andes (Figueiredo et al., 2009; Albert et al., 2011).

454 Outro evento biogeográfico que moldou a distribuição das linhagens mais recentes do
455 gênero *Colomesus* foram as glaciações e flutuações no nível do mar durante o Pleistoceno. Du-
456 rante o Plioceno médio (~4.5mya) a Amazônia transcontinental se estabelecia, fazendo com que
457 a drenagem se estendesse para o Norte dos Andes e o fluxo de sedimento no sentido Oeste para
458 o Atlântico fosse ininterrupto (Albert et al. 2018). Antes disso, o arco de Iquitos bloqueava o
459 transporte de sedimento da Amazônia Ocidental para o leque do Amazonas (Horbe et al. 2013;
460 Soelen et al., 2017). As flutuações periódicas do nível do mar mantiveram-se ao longo dos
461 últimos seis milhões de anos, com um ritmo acelerado durante o Pleistoceno (Miller et al. 2005).
462 Em aproximadamente ~2.6 mya, durante a transição do Plioceno para o Pleistoceno, com o
463 início das glaciações-interglaciações, eventos responsáveis pelas flutuações no nível do mar
464 (Rosen, 1988), podendo diminuir em até 120 metros ao final do Plioceno (Miller et al., 2005),
465 causando uma forte erosão nas cabeceiras e planícies de inundação do Amazonas (Irion, 1984).

466 Em função desses eventos, nós sugerimos que as linhagens de dulcícolas de *Colomesus*
467 podem ter sofrido especiação por isolamento, como visto na linhagem recuperada de Iquitos.
468 Ainda durante o Pleistoceno, as interglaciações elevaram o nível do mar, inundando as planícies
469 (Irion, 1984; Albert et al., 2018). Também de acordo com Farias e Hrbek (2008), a Amazônia
470 Oriental foi fortemente afetada pelo regime de ciclos do nível do mar ao longo do Pleistoceno,
471 desse modo, os rios Xingu, Tocantins e região de Alenquer no Amazonas inferior podem ter
472 sido influenciados por essas oscilações. Com base nos nossos resultados, sugerimos que as al-
473 ternâncias desses ciclos podem ter promovido conexões intermitentes entre essas drenagens
474 inferiores (Lima, 2017; Fontenelle et al., 2021), o que justificaria a recente diferenciação das
475 linhagens.

476

477

478

479

480 5 CONCLUSÃO

481 O presente estudo indica uma elevada diversidade críptica dentro do gênero *Colomesus*,
482 indicando que a possibilidade deste possuir duas vezes mais espécies do que atualmente é re-
483 gistrado. Adicionalmente, fornecemos evidências de que, no Brasil, não há a ocorrência de *C.*
484 *asellus*, mas sim, um grande complexo críptico de espécies com relação filogenética próxima a
485 espécie-tipo. A área de ocorrência de *C. tocantinensis*, também necessita de mais informações,
486 o que, pode caracterizar como uma das espécies de baiacus de água doce com a menor distri-
487 buição atualmente. Os eventos biogeográficos tanto do Mioceno, quanto as glaciações e alter-
488 nâncias no nível do mar durante o Pleistoceno/Plioceno, tiveram grandes impactos em moldar
489 a atual distribuição do gênero na região Neotropical da América do Sul.

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509 **6 REFERÊNCIAS**

510

511 Abell, R., Thieme, M. L., Revenga, C., Bryer, M., Kottelat, M., Bogutskaya, N., ... & Petry, P.
512 (2008). Freshwater ecoregions of the world: a new map of biogeographic units for freshwater
513 biodiversity conservation. *BioScience*, 58(5), 403-414. 10.1641/B580507

514

515 Albert JS, Petry P, Reis RE. 2011c. Major biogeographic and phylogenetic patterns. See Albert
516 & Reis 2011, pp. 21–58. 10.1525/california/9780520268685.003.0002

517

518 Albert, J.S., Reis, R. 2011. Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes.
519 10.1525/california/9780520268685.001.0001.

520

521 Albert, J.S., Val, P., & Hoorn, C. 2018. The changing course of the Amazon River in the
522 Neogene: center stage for Neotropical diversification. *Neotropical Ichthyology*, 16(3), e180033.
523 Epub October 18, 2018. <https://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-20180033>

524

525 Albert, J. S., Tagliacollo, V. A., & Dagosta, F. (2020). Diversification of Neotropical freshwater
526 fishes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 51, 27-53.
527 <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-011620-031032>

528

529 Allen GH, Pavelsky TM. 2018. Global extent of rivers and streams. *Science* 361(6402):585–
530 88. 10.1126/science.aat0636

531

532 Antonelli A, Zizka A, Carvalho FA, Scharn R, Bacon CD, et al. 2018b. Amazonia is the primary
533 source of Neotropical biodiversity. *PNAS* 115(23):6034–39.
534 <https://doi.org/10.1073/pnas.171381911>

535

536 Bloch ME, Schneider JG (1801) *Systema Ichthyologiae iconibus cx illustratum. Post obitum*
537 *auctoris opus inchoatum absolvit, correxit, interpolavit Jo. Gottlob Schneider, Saxo. Berolini.*
538 *Sumtibus Auctoris Impressum et Bibliopolio Sanderiano Commissum. M. E. Blochii, Systema*
539 *Ichthyologiae.: i-lx +1–584, Pls. 1–110. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.5750>*

540

- 541 Bloom, D. D., & Lovejoy, N. R. (2017). On the origins of marine-derived freshwater fishes in
542 South America. *Journal of Biogeography*, 44(9), 1927–1938. <https://doi.org/10.1111/jbi.12954>
543
- 544 Bouckaert R, Vaughan TG, Barido-Sottani J, Duchêne S, Fourment M, Gavryushkina A, et al
545 (2019) BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS*
546 *Computational Biology*, 15, 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006650>
547
- 548 Dagosta FC, de Pinna MC. 2019. The fishes of the Amazon: distribution and biogeographical
549 patterns, with a comprehensive list of species. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 431:1–163.
550 10.1206/0003-0090.431.1.1
551
- 552 Dekkers WJ (1975) Review of the Asiatic freshwater puffers of the genus *Tetraodon* Linnaeus,
553 1758 (Pisces, Tetraodontiformes, Tetraodontidae). *Bijdragen tot de Dierkunde* 45: 87–142.
554 <https://doi.org/10.1163/26660644-04501006>
555
- 556 Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating
557 with confidence. *PLoS Biol.* 4(5), e88. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040088>
558
- 559 Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti
560 and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution*, 29(8), 1969–1973.
561 10.1093/molbev/mss075
562
- 563 Figueiredo, J., Hoorn, C., Van der Ven, P., Soares, E. 2009. Late Miocene onset of the Amazon
564 River and the Amazon deep-sea fan: Evidence from the Foz do Amazonas Basin. *Geology*,
565 37(7), 619–622. <https://doi.org/10.1130/G25567A.1>
566
- 567 Froese R, Pauly D (2023) FishBase. Version 05/2023. Available: <http://www.fishbase.org>.
568
- 569 Heled J, Drummonf AJ, Xie W (2011) Bayesian inference of Species Trees from multilocus
570 data using *BEAST. *Mol Biol Evol.*, 27(3), 570–80. 10.1093/molbev/msp274
571
- 572 Hrbek, T., Vasconcelos, W.R., Rebelo, G. and Farias, I.P. (2008), Phylogenetic relationships of
573 South American Alligatorids and the Caiman of Madeira River. *J. Exp. Zool.*, 309A: 588–599.
574 <https://doi.org/10.1002/jez.430>

- 575 Hinegardner R, Rosen DE (1972) Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes.
576 American Naturalist 106: 621–644. doi/10.1086/282801
577
- 578 Horbe, A. M. C., Motta, M.B., de Almeida, C.M., Dantas, E.L., Vieira, L.C. 2013. Provenance
579 of Pliocene and recent sedimentary deposits in western Amazônia Brazil: Consequences for the
580 paleodrainage of the Solimões-Amazonas River. Sedimentary Geology. 296:9-20. <https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2013.07.007>
581
582
- 583 Horton, B. K. 2017. Sedimentary record of Andean mountain building. Earth Sci Rev [serial on
584 the Internet]. 178:279-309. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2017.11.025>
585
- 586 Irion, G. 1984. Sedimentation and sediments of Amazonian rivers and evolution of the
587 Amazonian landscape since Pliocene times. In The Amazon: Limnology and Landscape
588 Ecology of a Mighty Tropical River and its Basin, edited by H. Sioli 201–214. The Hague: Dr.
589 W. Junk Publishers.
590
- 591 Kato A, Doi H, Nakada T, Sakai H, Hirose S (2005) Takifugu obscurus is a euryhaline fugu
592 species very close to Takifugu rubripes and suitable for studying osmoregulation. BMC
593 Physiology 5: 18. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-5-18>
594
- 595 Lima, F.C.T. 2017. A revision of the cis-andean species of the genus Brycon Müller and
596 Troschel (Characiformes: Characidae). Zootaxa, 4222(1), 1–189. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4222.1.1>
597
598
- 599 Miller, K.G., Kominz, M.A., Browning, J.V., Wright, D.J., Mountain, G.S., Katz, M. E.,
600 Sugarman, P. J., Cramer, B. S., Christie-Blick, N., Pekar, S.F. 2005. The Phanerozoic record of
601 global sea-level change. Science 310:1293–1298. DOI: 10.1126/science.1116412
602
- 603 Muller J, Troschel FH (1849) Fische. In: Reisen in Britisch-Guiana in den Jahren, 1840–1844.
604 Im Auftrag Sr. Ma" jestat des Ko"nigs von Preussen ausgefu"hrt von Richard Schomburgk.
605 [Versuch einer Fauna und Flora von Britisch-Guiana.] 3. Berlin.
606
- 607 Rambaut A, Drummond AJ (2007) Tracer v.1.5. <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tr>.

- 608 Reis R.E., Albert J.S., Di Dario F., Mincarone MM, Petry P, Rocha LA. 2016. Fish biodiversity
609 and conservation in South America. *J. Fish Biol.* 89(1):12–47. <https://doi.org/10.1111/jfb.13016>
610
- 611 Roberts, T. R. (1972). Ecology of fishes in the Amazon and Congo basins. *Bulletin of the*
612 *Museum of Comparative Zoology*, 143(2), 117–147. <https://biostor.org/reference/699>
613
- 614 Rodrigues, A. E. S. 2022. A influência do Pleistoceno na especiação do gênero *Hypoclinemus*
615 *Chabanaud, 1928: um conto não monofilético de linhagens de peixes neotropicais*. Dissertação
616 de mestrado. Programa de Pós Graduação em Ecologia Aquática e Pesca. Dissertação de
617 mestrado
618
- 619 Rosen, B.R. 1988. From fossils to earth history: Applied historical biogeography. In *Analytical*
620 *Biogeography: An Integrated Approach to the Study of Animal and Plant Distributions*, edited
621 by A. A. Myers and P. S. Giller, 437–481.
622
- 623 Rotundo, M. M; Caires, R. A., Carvalho-Filho, A., Santos, W. C. R. Marceniuk, A. P. 2021.
624 *Familia Tetraodontidae*. In: Marceniuk, A. P., Caires, R. A., Carvalho-Filho, A., Rotundo, M.
625 M., Santos, W. C. R. D., & Klautau, A. G. C. D. M. (2021). Peixes teleósteos da costa norte do
626 Brasil. Museu Paraense Emílio Goeldi. [https://repositorio.museu-](https://repositorio.museu-goeldi.br/handle/mgoeldi/1521)
627 [goeldi.br/handle/mgoeldi/1521](https://repositorio.museu-goeldi.br/handle/mgoeldi/1521)
628
- 629 Sleen, P.V.D., Albert, J. S. 2017. Field Guide to the Fishes of the Amazon, Orinoco, and Guianas.
630 Spalding MD, Fox HE, Allen GR, Davidson N, Ferdaña ZA, Finlayson MAX, et al (2007).
631 *Marine ecoregions of the world: a bioregionalization of coastal and shelf areas*. *BioScience*,
632 57(7), 573-583. <https://doi.org/10.1641/B570707>
633
- 634 Wesselingh, F. P., & Hoom, C. (2011). Geological development of Amazon and Orinoco Basins.
635 In J. S. Albert & R. E. Reis (Eds.), *Historical biogeography of neotropical freshwater fishes* (pp.
636 59–68). University of California Press.
637
- 638 Yamanoue, Y., Miya, M., Doi, H., Mabuchi, K., Sakai, H., & Nishida, M. (2011). Multiple
639 invasions into freshwater by pufferfishes (Teleostei: Tetraodontidae): a mitogenomic
640 perspective. *PLoS One*, 6(2), e17410. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017410>

641 Yu Y, Blair C, He XJ (2020) RASP 4: Ancestral State Reconstruction Tool for Multiple Genes
642 and Characters. *Molecular Biology and Evolution*, 37(2), 604-606.

643 <https://doi.org/10.1093/molbev/msz257>

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675 7 DADOS SUPLEMENTARES

676 Article structure

677 *Subdivision - numbered sections*

678 Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be
679 numbered

680 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering).

681 Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any

682 subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate

683 line.

684 *Introduction*

685 State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a de-

686 tailed literaturesurvey or a summary of the results.

687 *Material and methods*

688 Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent re-

689 searcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a

690 reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks

691 and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

692 *Theory/calculation*

693 A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt

694 with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation

695 section represents a practical development from a theoretical basis.

696 *Results*

697 Results should be clear and concise.

698 *Discussion*

699 This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A com-

700 bined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and

701 discussion of published literature.

702 *Conclusions*

703 The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which

704 may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

705 *Glossary*

706 Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your arti-

707 cle.

708 *Appendices*

709 If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and

710 equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in

711 a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1;

712 Fig. A.1, etc.

713 Essential title page information

714 • **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations
715 and formulae where possible.

716 • **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author

717 and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script

718 behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done)

719 below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name

720 and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country

721 name and, if available, the e-mail address of each author.

722 • **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publica-

723 tion, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Ma-

724 terials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corres-**

725 **ponding author.**

726 • **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was

727 visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's

728 name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address.
729 Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

730 Highlights

731 Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your
732 article viasearch engines. They consist of a short collection of bullet points that capture
733 the novel results of your research as well as new methods that were used during the
734 study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

735
736 Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission sys-
737 tem. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum
738 85 characters, including spaces, per bullet point).

739 *Graphical abstract*

740 A graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of
741 the article ina concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide reader-
742 ship online. Authors mustprovide images that clearly represent the work described in the
743 article. Graphical abstracts should besubmitted as a separate file in the online submission
744 system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h ×
745 w) or proportionally more. The image should be readableat a size of 5 × 13 cm using a
746 regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDFor MS Office files.
747 You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

748 Keywords

749 Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American
750 spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for exam-
751 ple, 'and', 'of'). Be sparingwith abbreviations: only abbreviations firmly established in the
752 field may be eligible. These keywordswill be used for indexing purposes.

753 *Abbreviations*

754 Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the
755 first pageof the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be
756 defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of ab-
757 breviations throughout the article.

758 *Acknowledgements*

759 Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the refer-
760 ences and donot, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or
761 otherwise. List here thoseindividuals who provided help during the research (e.g., provid-
762 ing language help, writing assistanceor proof reading the article, etc.).

763 *Formatting of funding sources*

764 List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

765
766 Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers
767 xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the
768 United States Institutesof Peace [grant number aaaa].

769
770 It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and
771 awards. Whenfunding is from a block grant or other resources available to a university,
772 college, or other researchinstitution, submit the name of the institute or organization
773 that provided the funding.

774
775 If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following
776 sentence:

777
778 This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public,
779 commercial, ornot-for-profit sectors.

780 *Units*

781 Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of

782 units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

783 *Math formulae*

784 Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple
785 formulae inline with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a
786 horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be pre-
787 sented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number con-
788 secutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred
789 to explicitly in the text).

790 *Footnotes*

791 Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article.
792 Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used.
793 Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes
794 themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference
795 list.

796 *Artwork Electronic Artwork General points*

- 797 • Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- 798 • Embed the used fonts if the application provides that option.
- 799 • Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use
800 fonts that look similar.
- 801 • Number the illustrations according to their sequence in the text.
- 802 • Use a logical naming convention for your artwork files.
- 803 • Provide captions to illustrations separately.
- 804 • Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- 805 • Submit each illustration as a separate file.
- 806 • Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

807

808 A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

809 **You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are**
810 **given here.**

811 *Formats*

812 For New submissions: Please supply Figure files in PDF format.

813 For Revised submissions: Please supply Figure files in TIFF/JPEG format

814 If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint,
815 Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

816 Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic art-
817 work is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats
818 (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combi-
819 nations given below):

820 EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

821 TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300
822 dpi.

823 TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum
824 of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale),
825 keep to a minimum of 500 dpi.

826 **Please do not:**

- 827 • Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low num-
828 ber of pixels and limited set of colors;
- 829 • Supply files that are too low in resolution;
- 830 • Submit graphics that are disproportionately large for the content.

831 *Color artwork*

832 Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or
833 PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted
834 article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge,
835 that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regard-
836 less of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version.

837 **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs**

838 **from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference
 839 for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic](#)
 840 [artwork.](#)

841 *Figure captions*

842 Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to
 843 the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description
 844 of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all
 845 symbols and abbreviations used.

846 **Tables**

847 Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next
 848 to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables
 849 consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes
 850 below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented
 851 in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using
 852 vertical rules and shading in table cells.

853 **References**

854 *Citation in text*

855 Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list
 856 (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished
 857 results and personal communications are not recommended in the reference list, but may
 858 be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should
 859 follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the
 860 publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of
 861 a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

862 *Reference links*

863 Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online
 864 links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing
 865 services, such as Scopus, Crossref and PubMed, please ensure that data provided in the
 866 references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publica-
 867 tion year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be
 868 careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

869 A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any elec-
 870 tronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is:
 871 VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). A seismic contin-
 872 uation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical*
 873 *Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such cita-
 874 tions should be in the same style as all other references in the paper.
 875

876 *Web references*

877 As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last
 878 accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a
 879 source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately
 880 (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in
 881 the reference list.

882 *Data references*

883 This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by
 884 citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data refer-
 885 ences should include the following elements: author name(s), dataset title, data reposi-
 886 tory, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] im-
 887 mediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The
 888 [dataset] identifier will not appear in your published article.

889 *Preprint references*

890 Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the
 891 formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central

892 to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally pub-
 893 lished, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example
 894 by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference.
 895 The preprint DOI should also be provided.

896 *References in a special issue*

897 Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any
 898 citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

899 *Reference management software*

900 Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular
 901 reference management software products. These include all products that support [Cita-
 902 tion Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these prod-
 903 ucts, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their
 904 article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the jour-
 905 nal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the
 906 sample references and citations as shown in this Guide. If you use

907 reference management software, please ensure that you remove all field codes before
 908 submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes
 909 from different reference management software.](#)

910 *Reference formatting*

911 There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can
 912 be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s)
 913 name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume
 914 number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI
 915 is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted
 916 article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof
 917 stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they
 918 should be arranged according to the following examples:

919 *Reference style*

920 **Text:** All citations in the text should refer to:

- 921 1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publica-
 922 tion;
- 923 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
- 924 3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may
 925 be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chro-
 926 nologically, or vice versa.

927 Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or,
 928 as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown
 929 ...'

930 **List:** References should be arranged first alphabetically and then further sorted chrono-
 931 logically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year
 932 must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

933 *Examples:*

934 Reference to a journal publication:

935 Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific arti-
 936 cle. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

937 Reference to a journal publication with an article number:

938 Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific arti-
 939 cle. *Heliyon*.19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

940 Reference to a book:

941 Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New
 942 York. Reference to a chapter in an edited book:

943 Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in:
 944 Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc.,
 945 New York, pp. 281–304.

946 Reference to a website:

- 947 Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerre->
948 [searchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/](http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/) (accessed 13 March 2003).
949 Reference to a dataset:
950 [dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for
951 Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1.
952 <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.
953 Reference to software:
954 Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinon, E., Harp, D., Manzini,
955 G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S.,
956 Jafarov, E., & Molins, S., 2020. Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version
957 0.88). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.
- 958 *Journal abbreviations source*
959 Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).
960