

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL, MOLECULAR E GENÉTICA

LUIS ROBERTO BUENO

INFLUÊNCIAS BIOGEOGRÁFICAS NA FORMA DOS OTÓLITOS LAGENARES DE
POPULAÇÕES ISOLADAS DE *PSALIDODON BIFASCIATUS* EM SISTEMAS
HIDROGRÁFICOS DO SUL DO BRASIL

PONTA GROSSA
2025

LUIS ROBERTO BUENO

INFLUÊNCIAS BIOGEOGRÁFICAS NA FORMA DOS OTÓLITOS LAGENARES DE
POPULAÇÕES ISOLADAS DE *PSALIDODON BIFASCIATUS* EM SISTEMAS
HIDROGRÁFICOS DO SUL DO BRASIL

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração: Biologia Evolutiva)

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Abilhoa
Coorientador: Dr. Roger Dalcin

PONTA GROSSA
2025

B928 Bueno, Luis Roberto
 Influências biogeográficas na forma dos otólitos lagenares de populações
 isoladas de *Psalidodon bifasciatus* em sistemas hidrográficos do sul do Brasil /
 Luis Roberto Bueno. Ponta Grossa, 2025.
 50 f.

 Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração:
 Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

 Orientador: Prof. Dr. Vinicius Abilhoa.

 Coorientador: Prof. Dr. Roger Dalcin.

 1. *Psalidodon bifasciatus*. 2. Otolitos (peixes). 3. Biogeografia - Brasil. 4.
 Ictiologia - Rio Iguaçu (PR). 5. Morfologia animal. I. Abilhoa, Vinicius. II. Dalcin,
 Roger. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. IV.T.

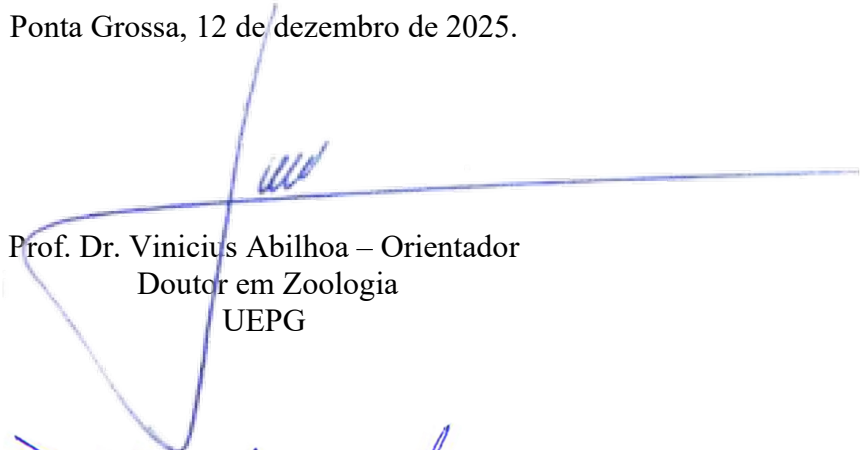
CDD: 597

LUIS ROBERTO BUENO

**Influências biogeográficas na forma dos otólitos lagenares de
populações isoladas de *Psalidodon bifasciatus* em sistemas hidrográficos
do sul do Brasil**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Biologia Evolutiva.

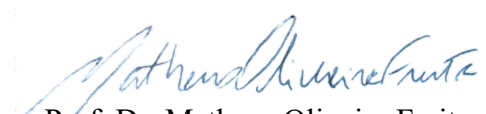
Ponta Grossa, 12 de dezembro de 2025.



Prof. Dr. Vinicius Abilhoa – Orientador
Doutor em Zoologia
UEPG



Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni
Doutor em Genética Evolutiva e Biologia Molecular
UEPG



Prof. Dr. Matheus Oliveira Freitas
Doutor em Ecologia e Conservação
Museu de História Natural Capão da Imbuia

*Para Camila, por acreditar em mim e em nós, e
tornou tudo possível.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Paulo e minha mãe Ivani, pelo apoio de sempre — não só nos dias fáceis, mas, sobretudo, quando as coisas apertaram. Vocês acenderam em mim a pergunta antes da resposta sem perceber. Nossa casa foi o meu primeiro laboratório: estantes com muitos livros, o prazer de desmontar e montar carrinhos, a curiosidade que nasceu na cozinha da mãe — entender como os alimentos cozinhavam e o que as combinações de receitas produziam — e na oficina do pai — compreender o funcionamento de cada parte do motor, identificar defeitos e pesquisar como consertá-los; e a vontade de entender o mundo no sítio do vô — pescando peixes com a peneira e preparando o frango de domingo, aproveitando que fariam parte da refeição para aprender como eram por dentro e como funcionavam. E quando a sombra se deitou sobre o horizonte, vocês ficaram: cuidaram de mim com paciência, sustentaram a rotina, buscaram luz onde eu não via. Vocês estiveram comigo desde o início do meu surgimento como cientista e ser humano, acompanharam cada passo, cada dúvida e cada pequena vitória até a realização deste sonho. Este trabalho também é de vocês: parte de um legado do amor e carinho de vocês por mim e do meu por vocês — vocês são meus verdadeiros heróis.

A meu irmão Paulo, e à minha irmã Ana Beatriz, vocês são a minha primeira e última linha de apoio. O mano caminhando um passo à frente, você abriu caminho, ensinou a persistir quando o terreno era ingrato e me mostrou que firmeza também pode ser abraço e aos meus olhos ainda é o cavaleiro do zodíaco mais forte. Mana, com tua alegria, você manteve acesa a minha capacidade de me maravilhar — lembrando que leveza também é força. Nos tempos escuros as nossas conversas aliviaram o peso do mundo e ainda riram comigo até a luz voltar. Eu amo vocês — e levo cada conquista com o selo da nossa irmandade.

À minha parceira Camila, cientista e companheira, pela confiança e pelo apoio inabaláveis. Obrigado por estar comigo quando a noite chegou e me dar a mão quando o passo vacilou, por me lembrar que há caminho enquanto caminhamos e por transformar cansaço em movimento. Nos períodos de escuridão, você me cuidou com rigor e ternura: esteve presente, organizou o caos, protegeu meu sossego e me devolveu, aos poucos, ao ritmo da vida. Ao caminhar ao meu lado, você tornou este sonho possível em todas as dimensões — intelectual, afetiva e concreta. Eu te amo — pela presença que sustenta, pela inteligência que me ilumina e pela delicadeza que cuida, por tua dedicação por nós e por simplesmente acreditar em mim. Te amo além.

Ofereço este trabalho ao nosso filho, Vicente, que acabou de nascer. A tua chegada reordenou o tempo e as prioridades, deu sentido a muita coisa e a coragem da finalização. Se estas páginas ficaram de pé, é também por você. Que você encontre, na curiosidade, o seu Norte;

e espero que possa sentir orgulho do pai e entender o meu amor pelo mundo natural — e, acima de tudo, o meu amor por você meu filho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vinicius, pela confiança que norteou os primeiros passos e pela paciência que sustentou o processo. Obrigado por compreender a minha realidade — o tempo, a distância, os desvios e as dúvidas — e por converter isso em orientação, não em obstáculo. Seu imenso saber acadêmico nunca foi um pedestal, mas uma ponte: partilhado com generosidade, rigor e ética, fez do conhecimento um bem comum. Com você aprendi que a excelência é atenção, método, sapiência e respeito.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Roger, pela disponibilidade, pelos ensinamentos generosos e pelos apontamentos precisos que iluminaram escolhas metodológicas e afinaram os argumentos deste trabalho.

A todos e todas que, de modos visíveis e invisíveis, tocaram este percurso — familiares, meus amigos, meus colegas da turma de 2024, os professores da coordenação, do colegiado e do próprio PPG BioEvo, juntamente também todos àqueles que acolhem a ciência e a passam adiante — meu muito obrigado. A pesquisa é sempre obra coletiva: somos devedores de tempo, de conversas e de gestos gratuitos que nos trazem até aqui. Que este trabalho devolva, ao menos em parte, o que recebi.

“É perigoso sair porta afora, Frodo’, ele costumava dizer. ‘Você pisa na Estrada, e se não controlar seus pés, não há como saber até onde você pode ser levado...’”

(Bilbo, citado por Frodo, O Senhor dos Anéis: A Sociedade do Anel.)

RESUMO

A ictiofauna neotropical apresenta elevada diversidade e forte estruturação espacial, especialmente em bacias com histórico de isolamento natural e antrópico. *Psalidodon bifasciatus*, caracídeo abundante no rio Iguaçu, entendido como um modelo adequado para investigar diferenciação intraespecífica por combinar ampla distribuição regional, plasticidade fenotípica e ocorrência em trechos intensamente fragmentados por corredeiras, cachoeiras e barramentos. Este estudo teve por objetivo caracterizar e quantificar a variação morfológica dos otólitos lagenares direitos (asteriscus) de *P. bifasciatus* e avaliar padrões de diferenciação intra e interpopulacional ao longo de sub-regiões do sistema Iguaçu e de bacias adjacentes. Foram amostrados 90 indivíduos em sete sistemas hidrográficos do sul do Brasil: alto Iguaçu (IA, n=13), baixo Iguaçu (IB, n=14), médio Iguaçu (IM, n=15), rio Ivaí (IV, n=12), rios litorâneos do Atlântico Sul (LI, n=14), rio Piquiri (PI, n=9) e rio Jordão (RJ, n=13). Os asteriscus direitos, padronizados quanto ao posicionamento e à escala, foram fotografados sob estereomicroscopia; os contornos foram extraídos, normalizados e descritos por coeficientes obtidos via Transformada Wavelet Discreta não dizimada (DWT), com remoção do efeito alométrico por regressão no comprimento total dos peixes. A variação da forma foi explorada por Análise de Componentes Principais (PCA); diferenças entre populações foram testadas por Análise Multivariada de Variância (MANOVA) e contrastes pareados; a separação entre grupos foi avaliada por Análise Discriminante Linear (LDA). Os dois primeiros componentes principais explicaram 45,7% da variação total, e a MANOVA global indicou diferenças significativas entre regiões (Pillai=4,049; $F \approx 2,917$; $df=222/312$; $p < 0,001$). A maior divergência concentrou-se no setor anterior do contorno ($\approx 160\text{--}240^\circ$), envolvendo pseudoexcisura, antirrostro e pseudoantirrostro. A abordagem integrada DWT-PCA-MANOVA-LDA revelou três unidades morfológicas consistentes de asteriscus em *P. bifasciatus*: (G1) alto rio Paraná + médio/baixo Iguaçu + rio Jordão (IV, PI, IM, IB, RJ; n=63), (G2) alto rio Iguaçu (IA; n=13) e (G3) rios litorâneos do Atlântico Sul (LI; n=14). O grupo do alto Iguaçu distinguiu-se de todas as demais populações, enquanto LI diferiu de diversos membros de G1 (com exceção de PI). Esses padrões são compatíveis com isolamento histórico (cachoeiras, compartimentação geomorfológica), reforçado por fragmentação recente (reservatórios), e possivelmente modulados por convergência ambiental local. Portanto, entende-se que a forma do asteriscus registra estruturação geográfica em *P. bifasciatus* e sustenta a hipótese de divergência alopátrica entre populações no sul do Brasil. Do ponto de vista aplicado, as unidades morfológicas identificadas apoiam o tratamento da espécie como um conjunto de unidades evolutivamente significativas para o planejamento da conservação, com ênfase na manutenção/restauração da conectividade e na gestão de barramentos. Estudos integrativos combinando morfologia de otólitos, dados genômicos e citogenéticos são recomendados para testar fronteiras populacionais e refinar diagnósticos taxonômicos.

Palavras-chave: Biogeografia, Asteriscus, Transformada Wavelet Discreta, Isolamento alopátrico, Ictiofauna neotropical.

ABSTRACT

Neotropical ichthyofauna exhibits high diversity and pronounced spatial structuring, particularly in river basins with a history of natural and anthropogenic isolation. *Psalidodon bifasciatus*, an abundant characid in the Iguaçu River, represents a suitable model to investigate intraspecific differentiation because it combines broad regional distribution, phenotypic plasticity, and occurrence in reaches that are intensely fragmented by rapids, waterfalls, and dams. This study aimed to characterize and quantify morphological variation in the right lagena otoliths (asteriscus) of *P. bifasciatus* and to evaluate patterns of intra- and interpopulation differentiation across subregions of the Iguaçu system and adjacent basins. A total of 90 individuals were sampled in seven hydrographic systems in southern Brazil: upper Iguaçu (IA, n = 13), lower Iguaçu (IB, n = 14), middle Iguaçu (IM, n = 15), Ivaí River (IV, n = 12), coastal rivers draining to the South Atlantic (LI, n = 14), Piquiri River (PI, n = 9), and Jordão River (RJ, n = 13). Right asterisci, standardized for orientation and scale, were photographed under a stereomicroscope; otolith outlines were extracted, normalized, and described by coefficients obtained via a non-decimated discrete wavelet transform (DWT), with allometric effects removed by regression on fish total length. Shape variation was explored using Principal Component Analysis (PCA); differences among populations were tested by Multivariate Analysis of Variance (MANOVA) and pairwise contrasts; group separation was evaluated by Linear Discriminant Analysis (LDA). The first two principal components explained 45.7% of the total variation, and the global MANOVA indicated significant differences among regions (Pillai = 4.049; $F \approx 2.917$; $df = 222/312$; $p < 0.001$). The greatest divergence was concentrated in the anterior sector of the outline ($\approx 160\text{--}240^\circ$), involving the pseudoexcisura, antirostrum, and pseudoantirostrum. The integrated DWT–PCA–MANOVA–LDA approach revealed three consistent morphological units of asteriscus shape in *P. bifasciatus*: (G1) upper Paraná River + middle/lower Iguaçu + Jordão River (IV, PI, IM, IB, RJ; n = 63), (G2) upper Iguaçu River (IA; n = 13), and (G3) South Atlantic coastal rivers (LI; n = 14). The upper Iguaçu group was distinct from all other populations, whereas LI differed from several members of G1 (except PI). These patterns are consistent with historical isolation (waterfalls, geomorphological compartmentalization), reinforced by recent fragmentation (reservoirs), and possibly modulated by local environmental convergence. We conclude that asteriscus shape records geographic structuring in *P. bifasciatus* and supports the hypothesis of allopatric divergence among populations in southern Brazil. From an applied perspective, the identified morphological units support treating the species as a set of evolutionarily significant units for conservation planning, with emphasis on maintaining/restoring connectivity and managing dams. Integrative studies combining otolith morphology, genomic data, and cytogenetics are recommended to test population boundaries and refine taxonomic diagnoses.

Keywords: Biogeography; Asteriscus; Discrete Wavelet Transform; Allopatric isolation; Neotropical ichthyofauna.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Locais de amostragem de <i>Psalidodon bifasciatus</i> no sul do Brasil.....	28
FIGURA 2 Vista lateral dos otólitos lagenares (asteriscus) e suas principais estrutura.....	32
FIGURA 3 Formas médias dos contornos e variabilidade dos coeficientes <i>Wavelet</i>	33
FIGURA 4 (A) Análise de Componentes Principais (PC1 vs PC2) e (B) Análise Discriminante Linear (LDA) dos contornos dos otólitos.....	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Sistemas hidrográficos, localidades, tamanho amostral e comprimento médio de <i>P. bifasciatus</i>	21
TABELA 2 Resultados da MANOVA e comparações pareadas entre populações de <i>P. bifasciatus</i>	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1 REGIÃO NEOTROPICAL E DIVERSIDADE DE PEIXES DE ÁGUA DOCE.....	12
1.2 PROCESSOS HISTÓRICOS E BIOGEOGRAFIA DA ICTIOFAUNA DO ESTADO DO PARANÁ.....	13
1.3 CARACTERIZAÇÃO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO IGUAÇU	14
1.4 ESPÉCIE-ALVO: PSALIDODON BIFASCIATUS	15
1.4.1 Morfologia e Diagnóstico.....	16
1.5 OTÓLITOS COMO FERRAMENTA TAXONÔMICA E MÉTODOS DE ANÁLISE DE FORMA	16
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 AMOSTRAGENS.....	21
3.2 ANÁLISE DE DADOS.....	22
4 RESULTADOS.....	25
4.1 INFLUÊNCIAS BIOGEOGRÁFICAS NA FORMA DOS OTÓLITOS LAGENARES DE POPULAÇÕES ISOLADAS DE <i>Psalidodon Bifasciatus</i> EM SISTEMAS HIDROGRÁFICOS DO SUL DO BRASIL	25
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 REGIÃO NEOTROPICAL E DIVERSIDADE DE PEIXES DE ÁGUA DOCE

A região Neotropical compreende a América do Sul, América Central e parte do sul do México, abrigando a ictiofauna de água doce mais diversa do mundo, com cerca de 5 mil espécies (Reis et al., 2016; Tonella et al., 2023). No Brasil, os peixes de água doce ocupam ambientes variados, desde grandes rios e riachos até lagoas, cavernas e áreas a mais de 5 mil metros de altitude (Vari ; Malabarba, 1998). A fauna é dominada pela superordem Ostariophysi, especialmente Characiformes e Siluriformes, que representam aproximadamente 70% das espécies (Nelson, 2006).

A expressiva riqueza neotropical decorre da combinação entre a vasta heterogeneidade ambiental (gradientes altitudinais e climáticos, mosaicos de habitats, redes de drenagens de diferentes ordens) e uma história profunda de reorganizações hidrológicas, que ampliou oportunidades de colonização, isolamento e diversificação de linhagens dulcícolas (Albert; Reis, 2011; Dagosta; De Pinna, 2017). Esse cenário favoreceu tanto a manutenção de estoques geneticamente estruturados quanto a emergência de endemismos em múltiplas bacias.

Sob a perspectiva ecológica, os peixes de água doce ocupam posições tróficas variadas — de detritívoros e onívoros a predadores de topo — e influenciam processos fundamentais, como ciclagem de nutrientes, dinâmica de algas e invertebrados, e até dispersão de sementes em ambientes alagáveis (Winemiller et al., 2008). A elevada diversidade funcional contribui para a estabilidade e a resiliência dos ecossistemas aquáticos neotropicais, refletindo uma longa história de adaptações morfológicas e comportamentais a ambientes dinâmicos.

Apesar dessa relevância, a ictiofauna neotropical enfrenta pressões antrópicas intensas, incluindo a fragmentação por barramentos, a perda e degradação de habitats, a poluição, a introdução de espécies exóticas e as mudanças climáticas, com efeitos cumulativos sobre a diversidade genética e a persistência de populações locais (Agostinho et al., 2008; Pelicice et al., 2017). Esse contexto reforça a necessidade de abordagens integrativas que conciliem biogeografia, ecologia e morfologia para compreender padrões de variação e orientar ações de conservação.

1.2 PROCESSOS HISTÓRICOS E BIOGEOGRAFIA DA ICTIOFAUNA DO ESTADO DO PARANÁ

A ictiofauna do estado do Paraná, notadamente inserida nas bacias do alto e baixo Paraná e na amostraria do Iguaçu, reflete um conjunto de processos geológicos e hidrológicos internos que moldaram sua distribuição e diferenciação. A bacia sedimentar do Paraná, de origem paleozoica–mesozoica, encontrava-se sob influência direta de eventos tectônicos intracratônicos que, até o Cretáceo Superior, moldaram uma topografia heterogênea marcada por escudos cristalinos antigos e áreas acarretadas por extenso preenchimento sedimentar (Da Gosta et al; 2024).

Esse relevo variado fomentou o surgimento de padrões hidrográficos ramificados e isolados, como os afluentes do alto Paraná se originando em escarpas versus sistemas mais suaves no planalto, favorecendo divergência de linhagens ictiológicas. Além disso, há registro de eventos recentes de captura de cabeceiras entre bacias ao longo da história geológica, o que permitiu troca faunística pontual e incrementou a diversidade local (Da Gosta et al; 2024).

Tal quadro foi recentemente corroborado por alguns estudos sobre mobilidade de divisores de drenagem e rearranjos fluviais no sul do Brasil (Crelie et al., 2025; Da Gosta et al., 2024), evidenciando como tais processos históricos continuam a moldar a estrutura populacional da ictiofauna.

Além da própria estrutura geológica, o território paranaense apresenta variação climática e altitudinal notável. A porção ocidental, mais plana e sujeita a inundação, contrasta com áreas mais elevadas e fragmentadas (como parte do Planalto Paranaense), configurando distintos nichos ecológicos e promovendo isolamento de microfaunas em riachos e sistemas de nascente, o que tem sido documentado como força motriz da endemização na região (Da Gosta et al., 2024).

Esses fatores coordenados — relevo heterogêneo, drenagens fragmentadas, conexão ocasional entre bacias e diversidade de microhabitats — compõem um contexto histórico favorável à formação de padrões ícticos complexos e ricos em taxa endêmicos. Exemplo disso é a concentração de espécies no Paraná: o estado registra cerca de 440 espécies de peixes de água doce distribuídas em cinco ecorregiões distintas (alto Paraná, baixo Paraná, Iguaçu, litorais atlânticos e Ribeira de Iguape), revelando sua posição de destaque como refúgio da biodiversidade dulcícola no Brasil (Dos Reis et al, 2020).

1.3 CARACTERIZAÇÃO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO IGUAÇU

A bacia do rio Iguaçu ocupa uma área de aproximadamente 72 mil km² no sul do Brasil, drenando majoritariamente o estado do Paraná antes de desaguar no rio Paraná, na fronteira com a Argentina (Maack, 1981). O rio percorre cerca de 1.300 km desde sua nascente na Serra do Mar, atravessando três planaltos distintos, caracterizados por marcadas diferenças altimétricas, substrato geológico e divisores de águas (Baumgartner et al., 2012; Ingenito et al., 2004). A presença de sucessivas corredeiras e, especialmente, das Cataratas do Iguaçu, impõe barreiras efetivas ao deslocamento dos peixes, resultando em um cenário de forte isolamento populacional (Larentis et al., 2016).

Como consequência, a ictiofauna da bacia é composta predominantemente por espécies de pequeno porte, com altos índices de endemismo e notável relevância para estudos evolutivos e biogeográficos (Vicari et al., 2006; Rahel, 2007).

Do ponto de vista geológico, a bacia está assentada sobre a formação dos derrames basálticos da Serra Geral, que, associados a falhamentos e processos erosivos, deram origem a um relevo escalonado responsável pela formação das escarpas e quedas d'água que caracterizam o curso do rio (Maack, 1981; Parolin et al., 2010). Esses degraus topográficos condicionaram a compartimentação natural da bacia em três grandes planaltos — Primeiro Planalto (Curitiba), Segundo Planalto (Ponta Grossa) e Terceiro Planalto (Cascavel e Foz do Iguaçu) —, delimitados por escarpas que atuam como divisores de drenagem e contribuem para a heterogeneidade ambiental da região (Maack, 1981; Souza et al., 2012).

A complexidade geomorfológica do Iguaçu resultou em um sistema fluvial com elevada quantidade de corredeiras, cachoeiras e barramentos naturais, que restringem o fluxo gênico e a conectividade longitudinal (Baumgartner et al., 2012). As Cataratas do Iguaçu, com cerca de 80 m de altura e 2.700 m de extensão, constituem a barreira mais significativa, isolando a ictiofauna do Iguaçu em relação ao rio Paraná desde o final do Pleistoceno (Agostinho et al., 1999; Severi; Cordeiro, 1994). Esse isolamento explica a ocorrência de espécies exclusivas e processos de especiação local, tornando a bacia um hotspot de endemismo (Garavello et al., 1997; Abilhoa; Duboc, 2020).

Do ponto de vista ecológico, o isolamento geográfico associado à heterogeneidade ambiental fez com que a ictiofauna do Iguaçu fosse dominada por espécies de pequeno porte, muitas delas restritas a micro-habitats específicos, como corredeiras, igarapés e lagoas marginais (Ingenito et al., 2004). Esse padrão contrasta com outras bacias brasileiras mais abertas, como o alto Paraná, onde espécies de grande porte migradoras são comuns. No Iguaçu,

ao contrário, as barreiras físicas inibem a migração de longa distância, favorecendo ciclos de vida adaptados a ambientes restritos e gerando padrões de diversidade únicos (Baumgartner et al., 2006; Júlio Jr. et al., 2009).

Além das barreiras naturais, como corredeiras e quedas d'água, a bacia do rio Iguaçu apresenta forte impacto antrópico decorrente da construção de diversas usinas hidrelétricas e pequenas centrais hidrelétricas (PCHs), que compartimentalizam ainda mais o sistema fluvial. Esses empreendimentos ampliam o isolamento das populações e reduzem a conectividade entre trechos do rio e seus afluentes, potencializando os efeitos de deriva genética e perda de diversidade em espécies restritas a setores específicos (Agostinho et al., 2008; Pelicice et al., 2017). Assim, o Iguaçu constitui não apenas um exemplo de isolamento natural histórico, mas também um caso emblemático da sobreposição de barreiras naturais e artificiais na estruturação da ictiofauna.

1.4 ESPÉCIE-ALVO: *PSALIDODON BIFASCIATUS*

A categorização taxonômica de *Psalidodon* foi historicamente debatida. Inicialmente descrito como gênero válido por Eigenmann (1911), posteriormente foi considerado sinônimo de *Astyanax* (Pavanelli; Oliveira, 2009). No entanto, estudos recentes baseados em dados moleculares e morfológicos demonstraram que *Astyanax* é um agrupamento não monofilético, enquanto *Psalidodon* apresenta caráter monofilético moderadamente suportado, sendo restabelecido como gênero válido (Terán, Benítez; Mirande, 2020).

Dentro desse grupo, *Psalidodon bifasciatus* (Garavello; Sampaio, 2010), conhecido popularmente como “lambari-do-rabo-vermelho”, é uma das espécies mais abundantes da bacia do rio Iguaçu. Apesar de inicialmente considerada endêmica dessa drenagem, registros recentes ampliaram sua distribuição para outras bacias neotropicais, como afluentes do Paraná e regiões costeiras do Atlântico Sul (Frota et al., 2020; Neves et al., 2020).

Embora inicialmente considerada endêmica do rio Iguaçu, registros recentes ampliaram sua distribuição para outras drenagens neotropicais, sugerindo maior plasticidade ecológica e capacidade de dispersão do que se supunha (Frota et al., 2020; Neves et al., 2020). Atualmente a espécie está incluída na família Acestrorhynchidae, após revisões taxonômicas recentes que reorganizaram a sistemática de Characiformes com base em análises filogenômicas (Melo et al., 2024).

Do ponto de vista morfológico, *P. bifasciatus* apresenta características diagnósticas sutis, o que dificulta sua distinção de espécies próximas. Essa sobreposição fenotípica é comum

no gênero *Psalidodon*, que constitui um grupo monofilético com elevada diversidade e uma longa história de revisões taxonômicas (Téran et al., 2020). Muitos de seus representantes apresentam plasticidade fenotípica acentuada, refletida em variações morfométricas e métricas observadas mesmo dentro de uma mesma bacia hidrográfica (Domingues et al., 2007; Pazza et al., 2008; Castro et al., 2014). Essa condição favorece a formação de “complexos de espécies”, dificultando diagnósticos precisos e levando à subestimação da diversidade real (Moreira-Filho; Bertollo, 1991; Artoni et al., 2006).

No nível citogenético, o gênero apresenta elevada variabilidade cariotípica, com números cromossômicos e padrões de polimorfismo amplamente documentados, sugerindo um papel importante da reorganização cromossômica na diversificação evolutiva (Maistro et al., 1992; Mizoguchi; Martins-Santos, 1997). Em paralelo, o uso de marcadores moleculares tem revelado a presença de linhagens crípticas em populações atribuídas a *Psalidodon*, indicando que parte da diversidade ainda não foi formalmente descrita (Limeira et al., 2022). Esses achados reforçam a hipótese de que *P. bifasciatus*, assim como outras espécies do grupo, pode representar um conjunto de unidades evolutivamente independentes ao longo de sua distribuição.

1.4.1 Morfologia e Diagnóstico.

P. bifasciatus é um teleósteo de pequeno porte, geralmente atingindo entre 6,5 e 12 cm de comprimento padrão (CP), com corpo fusiforme e comprimido lateralmente. A coloração apresenta fundo prateado a amarelado, com uma faixa lateral escura bem definida que se estende do opérculo à base da nadadeira caudal, além de nadadeira caudal com coloração avermelhada característica (Garavello; Sampaio, 2010). A altura do corpo varia entre 2,8 e 3,4 vezes o CP, e a nadadeira anal apresenta entre 20 e 25 raios ramificados, número compatível com congêneres do gênero. O focinho é relativamente curto, a cabeça proporcionalmente robusta, e a boca terminal com dentição multicuspidada típica de caracídeos onívoros.

1.5 OTÓLITOS COMO FERRAMENTA TAXONÔMICA E MÉTODOS DE ANÁLISE DE FORMA

Os otólitos, estruturas calcificadas localizadas no ouvido interno dos peixes ósseos (Teleostei), têm funções primárias relacionadas à percepção auditiva, ao equilíbrio e à orientação espacial. Estão organizados em três pares: lapillus, associado ao utrículo; sagitta, ao

sáculo; e asteriscus, à lagena (Schulz-Mirbach et al., 2019). Dentre eles, o asteriscus é particularmente relevante em Characiformes, sendo frequentemente o maior e mais informativo para estudos comparativos (Assis, 2003). A forma dos otólitos resulta da interação entre fatores intrínsecos — como herança genética, fisiologia e ontogenia — e extrínsecos — como variações ambientais, disponibilidade de recursos e condições hidrológicas (Campana; Thorrold, 2001; Clark et al., 2021).

Do ponto de vista aplicado, os otólitos constituem importantes marcadores morfológicos em estudos de sistemática, biogeografia e ecologia, devido à sua relativa estabilidade intraespecífica e especificidade interespecie (Campana; Casselman, 1993; Tuset et al., 2016). Diferenciações no contorno, proporções e microestrutura já foram utilizadas com sucesso para discriminar espécies, estoques pesqueiros e até mesmo populações isoladas em sistemas hidrográficos independentes (Devries et al., 2002; Mérigot et al., 2007; Cañas et al., 2012). Essa utilidade é ainda mais expressiva em grupos taxonomicamente complexos, como os caracídeos, nos quais caracteres externos frequentemente apresentam grande plasticidade e sobreposição.

Ao longo do tempo, diferentes abordagens metodológicas foram empregadas para explorar o potencial dos otólitos. Os primeiros estudos baseavam-se em métricas lineares simples, como comprimento, largura e razão otólito-peixe, além da análise da deposição de incrementos de crescimento (Postuma, 1974; Zabel et al., 2010). Embora úteis, essas medidas não captam adequadamente a complexidade do contorno, resultando em baixa resolução taxonômica. A necessidade de descrições mais refinadas levou ao desenvolvimento de métodos multivariados, com destaque para a Análise de Fourier Elíptica (EFA), que descreve matematicamente o contorno por meio de harmônicos que representam propriedades como alongação, triangularidade e simetria (Kuhl; Giardina, 1982; Bird et al., 1986).

Mais recentemente, métodos baseados em descritores *Wavelet* ganharam relevância. A Transformada *Wavelet* Discreta (DWT) decompõe o contorno em funções sucessivas que capturam variações locais de forma em diferentes escalas, sendo particularmente eficiente em espécies com otólitos de contornos irregulares ou com bordas marcadas (Libungan; Pálsson, 2015; Vasconcelos et al., 2025). Estudos recentes apontam que a DWT apresenta maior sensibilidade a variações sutis, melhor capacidade de reconstrução gráfica do contorno e maior poder discriminatório em análises intra e interespecíficas, quando comparada a outras técnicas (Sadighzadeh et al., 2014; Tuset et al., 2021).

A aplicação dessas abordagens em peixes neotropicais tem demonstrado o potencial dos otólitos como ferramenta integrativa entre sistemática, ecologia e biogeografia, permitindo não apenas distinguir populações isoladas, mas também discutir processos evolutivos e ambientais

que moldam a diversidade de espécies de água doce (Lombarte; Tuset, 2015; Parisi-Baradad et al., 2010; Granados-Amores et al., 2020).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A espécie *Psalidodon bifasciatus* (Garavello; Sampaio, 2010) é um caracídeo de pequeno porte amplamente distribuído na bacia do rio Iguaçu, um sistema hidrográfico marcado por forte isolamento geográfico, elevado endemismo e heterogeneidade ambiental (Baumgartner et al., 2012; Vicari et al., 2006). A presença de barreiras naturais, como corredeiras e as Cataratas do Iguaçu, limita o fluxo gênico entre populações e promove a diferenciação intraespecífica.

Além desses fatores históricos, a bacia sofreu intensa transformação antrópica com a instalação de diversas usinas hidrelétricas e pequenas centrais (PCHs), que compartimentalizam ainda mais o sistema fluvial (Agostinho et al., 2008; Pelicice et al., 2017). Esses barramentos atuam como barreiras artificiais adicionais, restringindo a conectividade longitudinal e afetando a dinâmica populacional, o que pode acentuar processos de deriva genética e perda de variabilidade. Assim, o rio Iguaçu constitui um cenário singular, onde se sobrepõem processos naturais e antrópicos de isolamento, tornando-se um modelo ideal para investigar os efeitos da fragmentação sobre a ictiofauna neotropical.

Nesse contexto, *P. bifasciatus* apresenta-se como espécie-chave, pois combina ampla distribuição local, abundância e reconhecida plasticidade fenotípica, características que dificultam diagnósticos precisos apenas com base em caracteres externos (Domingues et al., 2007; Gavazzoni et al., 2018). Somam-se a isso evidências de variabilidade cariotípica e a ocorrência de linhagens crípticas detectadas por marcadores moleculares no gênero *Psalidodon* (Limeira et al., 2022), ressaltando a necessidade de ferramentas complementares para compreender sua real diversidade.

Entre as alternativas disponíveis, os otólitos — especialmente o asteriscus, o mais informativo em Characiformes — destacam-se por registrarem, de forma permanente, tanto características genéticas herdadas quanto variações associadas a fatores ambientais (Campana; Thorrold, 2001; Tuset et al., 2016). A análise quantitativa da forma dos otólitos, utilizando métodos matemáticos robustos como a Análise de Fourier Elíptica (EFA) e a Transformada Wavelet Discreta (DWT), possibilita identificar padrões morfológicos capazes de revelar diferenciações populacionais sutis, fornecendo evidências sobre processos de isolamento, adaptação local e diversificação evolutiva (Libungan; Pálsson, 2015; Vasconcelos et al., 2025).

2.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar e quantificar a variação morfológica dos otólitos asteriscus de *Psalidodon bifasciatus* por meio das análises de Fourier e Wavelet, buscando identificar padrões de diferenciação intra e interpopulacional e discutir suas relações com processos evolutivos, adaptação local e fragmentação ambiental na bacia do rio Iguaçu.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever e comparar as formas dos otólitos através da Análise de Fourier Elíptica (EFA).
- Detectar variações morfológicas específicas com a Análise Wavelet.
- Identificar padrões morfológicos característicos de cada população.
- Discutir as implicações evolutivas, ambientais e antrópicas (barramentos) nas variações morfológicas.
- Contribuir para estratégias de conservação e manejo de *P. bifasciatus*, considerando a possibilidade de populações como unidades evolutivas independentes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGENS

Indivíduos de *Psalidodon bifasciatus* foram amostrados em sete sistemas hidrográficos no sul do Brasil: alto rio Iguaçu (represa do rio Passaúna), baixo rio Iguaçu (UHE Salto Caxias), médio rio Iguaçu (PCH Cherobim), rio Ivaí (PCH Boa Vista II), rios litorâneos do Atlântico Sul (UHE Chaminé-Vossoroca), rio Piquiri (UHE Melissa) e rio Jordão (Complexo Energético Fundão-Santa Clara). As coletas foram realizadas com redes de emalhar entre janeiro de 2024 e março de 2025 (Figura 1). Todos os espécimes foram identificados com base em caracteres diagnósticos morfológicos descritos por Baumgartner et al., (2012) e depositados como vouchers na coleção de peixes do Museu de História Natural Capão da Imbuia (MHNCI). A lista detalhada das bacias hidrográficas, localidades, acrônimos, tamanhos amostrais e comprimentos médios (CT $\pm$ DP) está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Sistemas hidrográficos, locais de amostragem, número (N) de otólitos examinados e extensão do comprimento total (TL cm) das populações de *Psalidodon bifasciatus* amostradas no sul do Brasil.

Bacia hidrográfica	Localidade	Acrônimos	Tamanho amostral	Média CT $\pm$ desvio padrão (cm)
alto rio Iguaçu	Represa do rio Passaúna	IA	13	9.7 $\pm$ 0.4
baixo rio Iguaçu	UHE Salto Caxias	IB	14	10.3 $\pm$ 1.2
médio rio Iguaçu	PCH Cherobim	IM	15	11.2 $\pm$ 0.8
rio Ivaí	PCH Boa Vista II	IV	12	13.8 $\pm$ 0.9
rios litorâneos do Atlântico Sul	UHE Chaminé-Vossoroca	LI	14	11.3 $\pm$ 0.6
rio Piquiri	UHE Melissa	PI	9	9.6 $\pm$ 0.3
rio Jordão	Complexo Energético Fundão-Santa Clara	RJ	13	12.8 $\pm$ 0.6

Fonte: O autor

Os otólitos lagenares de 90 espécimes foram extraídos e limpos com água destilada e álcool 70% para eliminar a membrana e a mácula aderidas. Sob um microscópio estereoscópico, os

otólitos asteriscos foram limpos cuidadosamente com agulhas para remover o material orgânico remanescente aderido e, em seguida, armazenados secos antes das fotografias e análises de forma. Foram utilizados otólitos lagenares com estruturas calcificadas em perfeitas condições. Para as análises morfológicas, o otólito asterisco direito foi posicionado com a fossa acústica voltada para cima (superfície interna) e com a extremidade anterior da pseudoexcisura voltada para a esquerda. Imagens digitais bidimensionais foram registradas utilizando um estereomicroscópio Leica (modelo M165C), acoplado a uma câmera de microscópio digital Leica DFC295, utilizando luz refletida com fundo escuro contendo uma referência para escala. A nomenclatura e a terminologia seguiram Assis (2003).

3.2 ANÁLISE DE DADOS

As análises de imagens de otólitos foram realizadas no ambiente R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2025) dentro do R Studio (R STUDIO TEAM, 2025). Primeiro, o brilho, o contraste e a nitidez de todas as imagens foram aprimorados com o pacote *magick* (Ooms, 2025) para garantir alta resolução e distinguir melhor o formato do otólito do fundo ao redor. Em seguida, por meio do pacote *shapeR* (Libungan, Pálsson, 2015), o ruído de pixel ao redor do contorno foi removido e os contornos do otólito foram extraídos automaticamente.

Todas as áreas definidas pelos contornos foram normalizadas para 1. O eixo polar e as coordenadas (de 0° a 360° de ângulo) foram desenhados a partir do centroide do contorno e todos os otólitos foram rotacionados e posicionados horizontalmente. Os contornos foram decompostos em várias funções *wavelet* para calcular os coeficientes *wavelet* utilizando a Transformada *Wavelet* Discreta não dizimada (DWT).

O método DWT trata o contorno do otólito como uma onda de sinal, utilizando técnicas de processamento de sinais para aproximar uma série de funções que capturam, de forma crescente, a variação topográfica no contorno do otólito (Gençay et al., 2001; Vetterli, Kovačević, 1995). Todos os detalhes não capturados por cada função são armazenados como valores numéricos, chamados coeficientes *wavelet*. Essa série se expande até que não haja mais nada a capturar, ou seja, até que o último coeficiente seja zero.

Tradicionalmente, a Transformada de Série de Fourier tem sido utilizada juntamente com o método DWT para descrições generalizadas de forma em análises de contorno (ex.: Gençay et al., 2001; Santos et al., 2017; Mereles et al., 2021). No entanto, optamos por calcular apenas os coeficientes *wavelet* devido à melhor qualidade de reconstrução do contorno (Fig. 2)

e às vantagens bem conhecidas do método DWT sobre outras análises de contorno (Tuset et al., 2021; Vasconcelos et al., 2025).

A DWT é eficaz para identificar diferenças de forma em regiões específicas, como em um determinado ângulo do contorno do otólito. Além disso, tem se mostrado um método confiável para detectar variação interespecífica e intraespecífica, permitindo também a reconstrução gráfica das formas (Libungan, Pálsson, 2015; Tuset et al., 2021).

Adicionalmente, para considerar as relações alométricas entre o contorno e o tamanho do peixe, os coeficientes de forma foram normalizados para remover a influência do tamanho na variação fenotípica do contorno do otólito. Isso foi feito por meio de uma regressão linear sobre o comprimento do peixe (uma medida do tamanho total) e remoção dos coeficientes significativamente correlacionados ao tamanho.

A proporção da variação dentro das populações foi resumida por meio da análise de correlação intraclasse (ICC), a fim de avaliar como a variação nos coeficientes *wavelet* depende da posição (ângulo) ao longo do contorno. As diferenças no contorno dos otólitos entre sistemas hidrográficos foram visualizadas em gráficos da forma média de cada população, reconstruídas a partir dos coeficientes *wavelet* normalizados.

Utilizando o pacote *Momocs* (Bonhomme et al., 2014), foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA) sobre as variáveis de forma, criando novas variáveis independentes (componentes principais) a partir da combinação dos coeficientes *wavelet*, de forma a manter o máximo possível da variação original (Wold et al., 1987; Yang et al., 2024). Em seguida, uma Análise Multivariada de Variância (MANOVA), com todos os componentes principais como variáveis resposta, foi empregada para testar se a forma difere entre e dentro das populações (variáveis explicativas). Como múltiplas comparações aumentam o erro tipo I, todos os valores de p foram ajustados pelo método da Taxa de Descoberta Falsa (*False Discovery Rate*), calculada segundo Benjamini-Hochberg (Legendre; Legendre, 1998). Por fim, para classificar as diferenças fenotípicas (componentes principais) entre e dentro dos locais de amostragem, foi aplicada uma Análise Discriminante Linear (LDA).

Como representações gráficas, os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) formaram um morfospaço, no qual a variação e covariação dos coeficientes de forma de cada otólito puderam ser observadas por meio da orientação e agrupamento das observações. Já os dois primeiros eixos discriminantes (LD1 e LD2) maximizaram a distância entre os grupos predefinidos, ao construir combinações lineares das variáveis (Zelditch et al., 2012). Observações pertencentes a uma mesma bacia hidrográfica foram agrupadas por elipses de

intervalo de confiança de 95% em torno do centroide e diferenciadas por cores segundo a região hidrográfica correspondente.

4 RESULTADOS

Os resultados estão organizados em forma de artigo científico em um capítulo, conforme as normas de escrita exigidas pela Instituição.

4.1 INFLUÊNCIAS BIOGEOGRÁFICAS NA FORMA DOS OTÓLITOS LAGENARES DE POPULAÇÕES ISOLADAS DE *Psalidodon Bifasciatus* EM SISTEMAS HIDROGRÁFICOS DO SUL DO BRASIL

RESUMO

A ictiofauna neotropical apresenta elevada diversidade e forte estruturação espacial, especialmente em bacias com histórico de isolamento natural e antrópico. *Psalidodon bifasciatus*, caracídeo abundante no rio Iguaçu, constitui um modelo adequado para investigar diferenciação intraespecífica por combinar ampla distribuição regional, plasticidade fenotípica e ocorrência em trechos intensamente fragmentados por corredeiras, cataratas e barramentos. Este estudo teve por objetivo caracterizar e quantificar a variação morfológica do otólito lagenares (asteriscus) de *P. bifasciatus* e avaliar padrões de diferenciação intra e interpopulacional ao longo de sub-regiões do sistema Iguaçu e bacias adjacentes. Foram amostrados 90 indivíduos em sete sistemas hidrográficos do sul do Brasil: alto Iguaçu (IA, n=13), baixo Iguaçu (IB, n=14), médio Iguaçu (IM, n=15), rio Ivaí (IV, n=12), rios litorâneos do Atlântico Sul/Capivari (LI, n=14), rio Piquiri (PI, n=9) e rio Jordão (RJ, n=13). Os asteriscus direitos, padronizados quanto ao posicionamento e escala, foram fotografados sob estereomicroscopia; os contornos foram extraídos e normalizados. A forma foi descrita por coeficientes obtidos via Transformada Wavelet Discreta não dizimada (DWT), com remoção do efeito alométrico por regressão no comprimento do peixe. A variação foi explorada por Análise de Componentes Principais (PCA); diferenças entre populações foram testadas por MANOVA e contrastes pareados; a separação de grupos foi avaliada por Análise Discriminante Linear (LDA). Os dois primeiros componentes principais explicaram 45,7% da variação total. A MANOVA global indicou diferenças significativas entre regiões (Pillai=4,049; $F \approx 2,917$; $df=222/312$; $p < 0,001$). A maior divergência concentrou-se no setor anterior do contorno ($\approx 160-240^\circ$), envolvendo pseudoexcisura, antirrostro e pseudoantirrostro. A integração DWT→PCA/MANOVA/LDA revelou três unidades morfológicas consistentes: (G1) alto rio Paraná + médio/baixo Iguaçu + rio Jordão (IV, PI, IM, IB, RJ), (G2) alto rio Iguaçu (IA) e (G3) bacias litorâneas do Atlântico Sul/Capivari (LI). O grupo do alto Iguaçu distinguiu-se de todas as demais populações; LI diferiu de diversos membros de G1 (com exceção de PI). Esses padrões são compatíveis com isolamento histórico (cataratas, compartimentação geomorfológica), reforçado por fragmentação recente (reservatórios), e possivelmente modulados por convergência ambiental local. Conclui-se que a forma do asteriscus registra estruturação geográfica em *P. bifasciatus* e sustenta a hipótese de divergência alopátrica entre populações no sul do Brasil. Do ponto de vista aplicado, as unidades morfológicas identificadas apontam para o tratamento da espécie como um conjunto de unidades evolutivamente significativas em planejamento de conservação, com ênfase na manutenção/restauração de conectividade e na gestão de barramentos. Estudos integrativos combinando morfologia de otólitos, dados genômicos e citogenéticos são recomendados para testar fronteiras populacionais e refinar diagnósticos taxonômicos.

Palavras-chave: Biogeografia, Asteriscus, Transformada Wavelet Discreta, Isolamento alopátrico, Ictiofauna neotropical.

ABSTRACT

The Neotropical ichthyofauna exhibits remarkable diversity and pronounced spatial structuring, particularly in basins with a history of natural and anthropogenic isolation. *Psalidodon bifasciatus*, an abundant characid from the Iguaçu River, is an appropriate model for investigating intraspecific differentiation because it combines wide regional distribution, phenotypic plasticity, and occurrence in reaches heavily fragmented by rapids, waterfalls, and dams. This study aimed to characterize and quantify morphological variation in the lagenar otolith (asteriscus) of *P. bifasciatus* and to assess intra- and interpopulation differentiation patterns across subregions of the Iguaçu system and adjacent basins. Ninety individuals were sampled from seven hydrographic systems in southern Brazil: upper Iguaçu (IA, n = 13), lower Iguaçu (IB, n = 14), middle Iguaçu (IM, n = 15), Ivaí River (IV, n = 12), South Atlantic coastal/Capivari rivers (LI, n = 14), Piquiri River (PI, n = 9), and Jordão River (RJ, n = 13). Right asterisci, standardized for orientation and scale, were photographed under stereomicroscopy; contours were extracted and normalized. Shape was described by coefficients derived from the undecimated Discrete Wavelet Transform (DWT), with allometric effects removed via regression on fish length. Variation was explored using Principal Component Analysis (PCA); population differences were tested with MANOVA and pairwise contrasts, and group separation was evaluated through Linear Discriminant Analysis (LDA). The first two principal components explained 45.7% of total variance. The global MANOVA indicated significant differences among regions (Pillai = 4.049; $F \approx 2.917$; $df = 222/312$; $p < 0.001$). Divergence was concentrated in the anterior contour sector ($\approx 160\text{--}240^\circ$), encompassing the pseudoexcisura, antRostrum, and pseudoantRostrum. Integration of DWT $\rightarrow$ PCA/MANOVA/LDA revealed three consistent morphometric units: (G1) upper Paraná + middle/lower Iguaçu + Jordão (IV, PI, IM, IB, RJ); (G2) upper Iguaçu (IA); and (G3) South Atlantic/Capivari basins (LI). The upper Iguaçu group differed from all other populations, and LI was distinct from several members of G1 (except PI). These patterns are compatible with historical isolation (waterfalls, geomorphological compartmentalization), reinforced by recent fragmentation (reservoirs), and potentially modulated by local environmental convergence. The results demonstrate that asteriscus shape records geographic structuring in *P. bifasciatus* and support the hypothesis of allopatric divergence among populations in southern Brazil. From an applied perspective, the identified morphometric units suggest that this species should be managed as a set of Evolutionarily Significant Units, emphasizing the maintenance/restoration of connectivity and the management of dams. Integrative studies combining otolith morphology with genomic and cytogenetic data are recommended to refine population boundaries and taxonomic diagnoses.

Keywords: Biogeography; Asteriscus; Discrete Wavelet Transform; Allopatric isolation; Neotropical ichthyofauna.

INTRODUÇÃO

A região Neotropical abriga a maior diversidade mundial de peixes de água doce, resultado da combinação entre heterogeneidade ambiental e uma longa história de reconfigurações hidrográficas que favoreceram colonização, isolamento e diversificação (Reis et al., 2016; Albert & Reis, 2011). Ao mesmo tempo, pressões antrópicas — barramentos, perda de habitat, espécies exóticas e mudanças climáticas — vêm alterando conectividade e estrutura populacional (Agostinho et al., 2008; Pelicice et al., 2017). Entender como o isolamento natural e o isolamento fragmentado por barragens molda a variação intraespecífica é indispensável para a conservação e o manejo.

No sul do Brasil, o sistema Paraná–Iguaçu oferece um cenário exemplar de isolamento e endemismo. A evolução geomorfológica do território — escarpas, planaltos em degraus e eventos de captura fluvial — estruturou redes de drenagem com conexões pretéritas e quebras de continuidade ao longo do Cenozoico (Maack, 1981; Ribeiro, 2006). Evidências recentes mostram mobilidade de divisores de drenagem e rearranjos fluviais ainda ativos no sul do Brasil, reforçando a natureza dinâmica dessas fronteiras (Dagosta & De Pinna, 2017; Crelier et al., 2025). No rio Iguaçu, as Cataratas e uma sucessão de corredeiras/barramentos naturais e artificiais intensificam a compartimentação longitudinal e elevam o potencial de divergência alopátrica (Vicari et al., 2006; Baumgartner et al., 2012).

Psalidodon bifasciatus (“lambari-do-rabo-vermelho”) é abundante no Iguaçu e próximo ao Paraná, com plasticidade fenotípica e sinais de complexidade críptica relatados para o grupo (TERÁN et al., 2020; LIMEIRA et al., 2022). Essas características tornam a espécie modelo para investigar como isolamento histórico e fragmentação recente se refletem em traços morfológicos.

Entre os marcadores disponíveis, otólitos asteriscus são úteis porque integram componentes genéticos e ambientais durante o crescimento, preservando assinaturas morfológicas com boa estabilidade intraespecífica e poder discriminatório (Assis, 2003; Campana & Casselman, 1993; Tuset et al., 2016). Em contextos de isolamento, diferenças no contorno podem delimitar estoques e revelar estruturação populacional até quando os caracteres externos mostram sobreposição (Devries et al., 2002; Mérigot et al., 2007; Cañas et al., 2012).

Apesar de avanços em biogeografia histórica do Iguaçu/Paraná e do uso de otólitos em discriminação de estoques, faltam estudos que integrem história geológica, fragmentação antrópica e a morfologia do otólito asteriscus para testar a hipótese e revelar possíveis unidades morfológicas em *P. bifasciatus*. Assim, o objetivo central do trabalho foi investigar sinais

consistentes de diferenciação morfológica dos otólitos entre compartimentos hidrográficos do sul do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragens

Indivíduos de *Psalidodon bifasciatus* foram amostrados em sete sistemas hidrográficos no sul do Brasil: alto rio Iguaçu (represa do rio Passaúna), baixo rio Iguaçu (UHE Salto Caxias), médio rio Iguaçu (PCH Cherobim), rio Ivaí (PCH Boa Vista II), rios litorâneos do Atlântico Sul (UHE Chaminé-Vossoroca), rio Piquiri (UHE Melissa) e rio Jordão (Complexo Energético Fundão-Santa Clara). As coletas foram realizadas com redes de emalhar entre janeiro de 2024 e março de 2025 (Figura 1).

Todos os espécimes foram identificados com base em caracteres diagnósticos morfológicos descritos por Baumgartner et al., (2012) e depositados como vouchers na coleção de peixes do Museu de História Natural Capão da Imbuia (MHNCI). A lista detalhada das bacias hidrográficas, localidades, acrônimos, tamanhos amostrais e comprimentos médios (CT $\pm$ DP) está apresentada na Tabela 1.

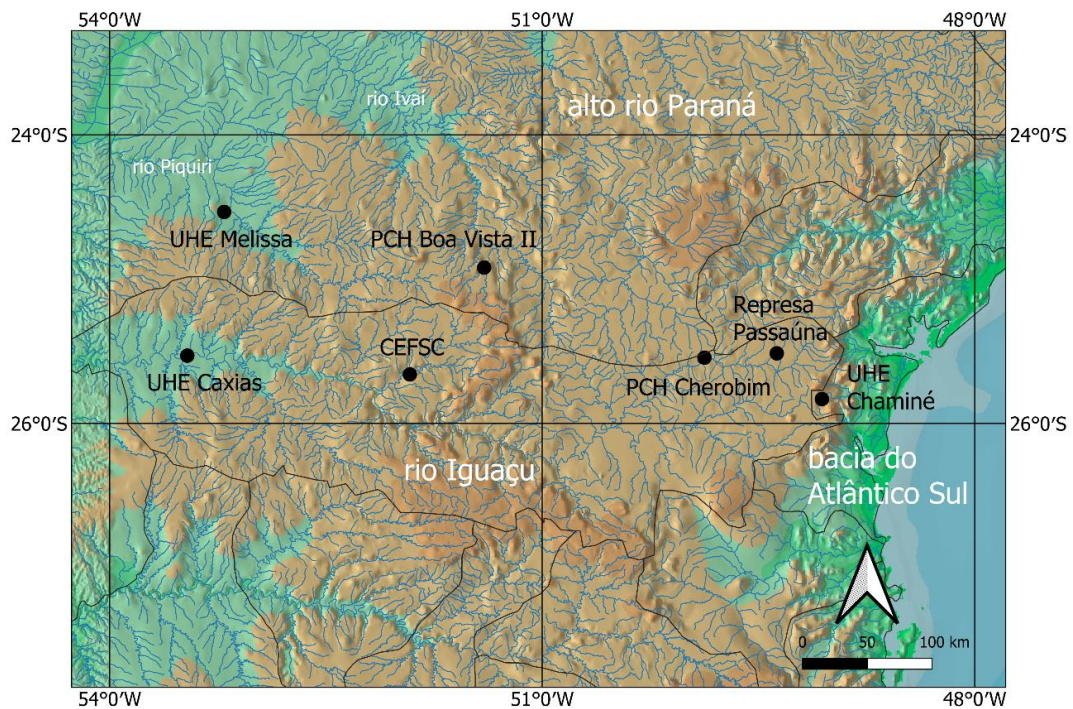


Figura 1. Locais onde populações de *Psalidodon bifasciatus* foram amostradas no sul do Brasil.

Tabela 1. Sistemas hidrográficos, locais de amostragem, número (N) de otólitos examinados e extensão do comprimento total (TL cm) das populações de *Psalidodon bifasciatus* amostradas no sul do Brasil.

Bacia hidrográfica	Localidade	Acrônimos	Tamanho amostral	Média CT $\pm$ desvio padrão (cm)
alto rio Iguaçu	Represa do rio Passaúna	IA	13	9.7 $\pm$ 0.4
baixo rio Iguaçu	UHE Salto Caxias	IB	14	10.3 $\pm$ 1.2
médio rio Iguaçu	PCH Cherobim	IM	15	11.2 $\pm$ 0.8
rio Ivaí	PCH Boa Vista II	IV	12	13.8 $\pm$ 0.9
rios litorâneos do Atlântico Sul	UHE Chaminé-Vossoroca	LI	14	11.3 $\pm$ 0.6
rio Piquiri	UHE Melissa	PI	9	9.6 $\pm$ 0.3
rio Jordão	Complexo Energético Fundão-Santa Clara	RJ	13	12.8 $\pm$ 0.6

Fonte: O autor

Os otólitos lagenares de 90 espécimes foram extraídos e limpos com água destilada e álcool 70% para eliminar a membrana e a mácula aderidas. Sob um microscópio estereoscópico, os otólitos asteriscos foram limpos cuidadosamente com agulhas para remover o material orgânico remanescente aderido e, em seguida, armazenados secos antes das fotografias e análises de forma. Foram utilizados otólitos lagenares com estruturas calcificadas em perfeitas condições.

Para as análises morfológicas, o otólito asterisco direito foi posicionado com a fossa acústica voltada para cima (superfície interna) e com a extremidade anterior da pseudoexcisura voltada para a esquerda. Imagens digitais bidimensionais foram registradas utilizando um estereomicroscópio Leica (modelo M165C), acoplado a uma câmera de microscópio digital Leica DFC295, utilizando luz refletida com fundo escuro contendo uma referência para escala. A nomenclatura e a terminologia seguiram Assis (2003).

Análise de dados

As análises de imagens de otólitos foram realizadas no ambiente R (R Development Core Team, 2025) dentro do R Studio (R STUDIO TEAM, 2025). Primeiro, o brilho, o contraste e a nitidez de todas as imagens foram aprimorados com o pacote *magick* (Ooms, 2025) para garantir alta resolução e distinguir melhor o formato do otólito do fundo ao redor. Em seguida, por meio do pacote *shapeR* (Libungan, Pálsson, 2015), o ruído de pixel ao redor do contorno foi removido e os contornos do otólito foram extraídos automaticamente.

Todas as áreas definidas pelos contornos foram normalizadas para 1. O eixo polar e as coordenadas (de 0° a 360° de ângulo) foram desenhados a partir do centroide do contorno e todos os otólitos foram rotacionados e posicionados horizontalmente. Os contornos foram decompostos em várias funções *Wavelet* para calcular os coeficientes *Wavelet* utilizando a Transformada Wavelet Discreta não dizimada (DWT).

O método DWT trata o contorno do otólito como uma onda de sinal, utilizando técnicas de processamento de sinais para aproximar uma série de funções que capturam, de forma crescente, a variação topográfica no contorno do otólito (Gençay et al., 2001; Vetterli, Kovačević, 1995). Todos os detalhes não capturados por cada função são armazenados como valores numéricos, chamados coeficientes *Wavelet*. Essa série se expande até que não haja mais nada a capturar, ou seja, até que o último coeficiente seja zero.

Tradicionalmente, a Transformada de Série de Fourier tem sido utilizada juntamente com o método DWT para descrições generalizadas de forma em análises de contorno (ex.: Gençay et al., 2001; Santos et al., 2017; Mereles et al., 2021). No entanto, optamos por calcular apenas os coeficientes *Wavelet* devido à melhor qualidade de reconstrução do contorno (Fig. 2) e às vantagens bem conhecidas do método DWT sobre outras análises de contorno (Tuset et al., 2021; Vasconcelos et al., 2025).

A DWT é eficaz para identificar diferenças de forma em regiões específicas, como em um determinado ângulo do contorno do otólito. Além disso, tem se mostrado um método confiável para detectar variação interespecífica e intraespecífica, permitindo também a reconstrução gráfica das formas (Libungan, Pálsson, 2015; Tuset et al., 2021).

Adicionalmente, para considerar as relações alométricas entre o contorno e o tamanho do peixe, os coeficientes de forma foram normalizados para remover a influência do tamanho na variação fenotípica do contorno do otólito. Isso foi feito por meio de uma regressão linear sobre o comprimento do peixe (uma medida do tamanho total) e remoção dos coeficientes significativamente correlacionados ao tamanho.

A proporção da variação dentro das populações foi resumida por meio da análise de correlação intraclasse (ICC), a fim de avaliar como a variação nos coeficientes *wavelet* depende da posição (ângulo) ao longo do contorno. As diferenças no contorno dos otólitos entre sistemas hidrográficos foram visualizadas em gráficos da forma média de cada população, reconstruídas a partir dos coeficientes *wavelet* normalizados.

Utilizando o pacote *Momocs* (Bonhomme et al., 2014), foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA) sobre as variáveis de forma, criando novas variáveis independentes (componentes principais) a partir da combinação dos coeficientes *wavelet*, de forma a manter o máximo possível da variação original (Wold et al., 1987; Yang et al., 2024). Em seguida, uma Análise Multivariada de Variância (MANOVA), com todos os componentes principais como variáveis resposta, foi empregada para testar se a forma difere entre e dentro das populações (variáveis explicativas).

Como múltiplas comparações aumentam o erro tipo I, todos os valores de p foram ajustados pelo método da Taxa de Descoberta Falsa (*False Discovery Rate*), calculada segundo Benjamini-Hochberg (Legendre; Legendre, 1998). Por fim, para classificar as diferenças fenotípicas (componentes principais) entre e dentro dos locais de amostragem, foi aplicada uma Análise Discriminante Linear (LDA).

Como representações gráficas, os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) formaram um morfospaço, no qual a variação e covariação dos coeficientes de forma de cada otólito puderam ser observadas por meio da orientação e agrupamento das observações. Já os dois primeiros eixos discriminantes (LD1 e LD2) maximizaram a distância entre os grupos predefinidos, ao construir combinações lineares das variáveis (Zelditch et al., 2012). Observações pertencentes a uma mesma bacia hidrográfica foram agrupadas por elipses de intervalo de confiança de 95% em torno do centroide e diferenciadas por cores segundo a região hidrográfica correspondente.

RESULTADOS

Os otólitos lagenares das populações de *Psalidodon bifasciatus* apresenta formato oval (auricular) e uma depressão ampla, quase retilínea, em sua região central (fossa acústica), rodeada por uma elevação (crista). O *lobus major* encontra-se bem desenvolvido. O antirrostro e o pseudoantirrostro estão localizados na porção anterior do otólito, separados por uma incisura conspícua (pseudoexcisura) (Figura 2).

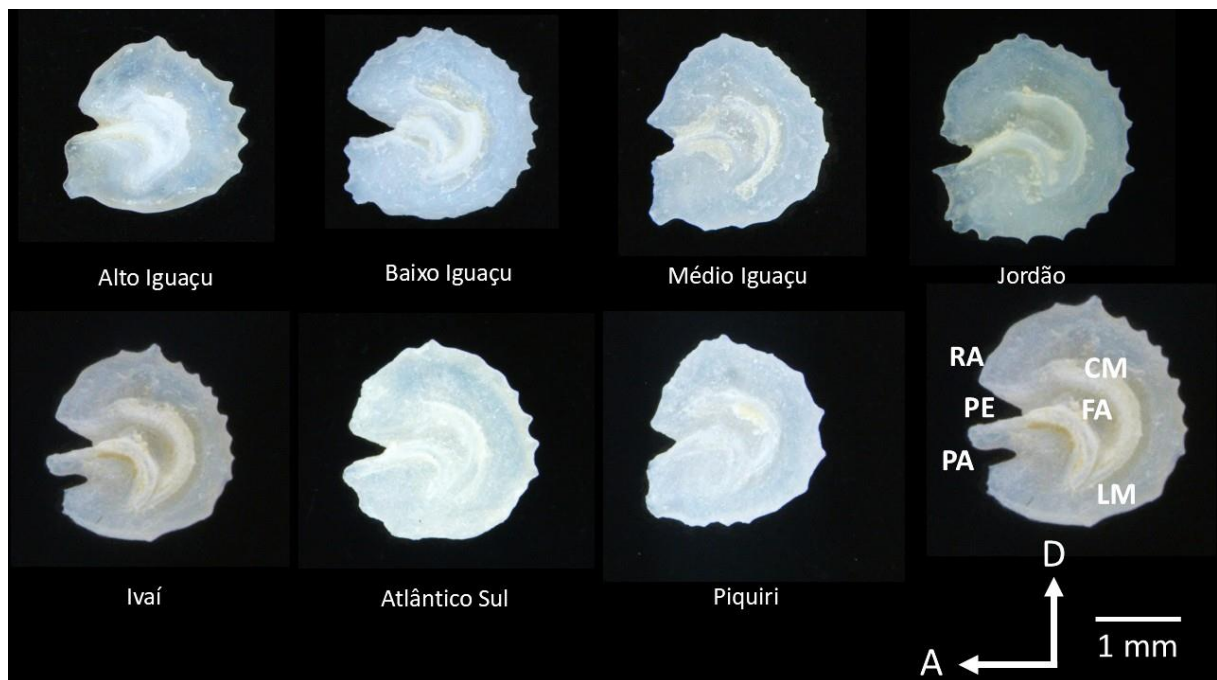


Figura 2. Vista lateral dos otólitos lagenares direitos (asteriscus) de *Psalidodon bifasciatus* amostrados no sul do Brasil. Terminologia das principais estruturas do otólito segundo Assis (2003): FA (fossa acústica), LM (*lobus major*), CM (crista medial), RA (antirrostro), PE (pseudoexcisura), PA (pseudoantirrostro). Direções: D (dorsal) e A (anterior).

A maior parte da variação nos coeficientes *Wavelet* dentro das populações foi observada no intervalo de 30–60°, que corresponde à região posterior do otólito. Em contraste, a região compreendida entre os ângulos 160–240°, correspondente aproximadamente às estruturas do antirrostro, pseudoexcisura e pseudoantirrostro, apresentou os maiores valores médios e desvios-padrão dos coeficientes *Wavelet*. Esses resultados indicam padrões distintos de variação fenotípica entre as populações (Figura 3).

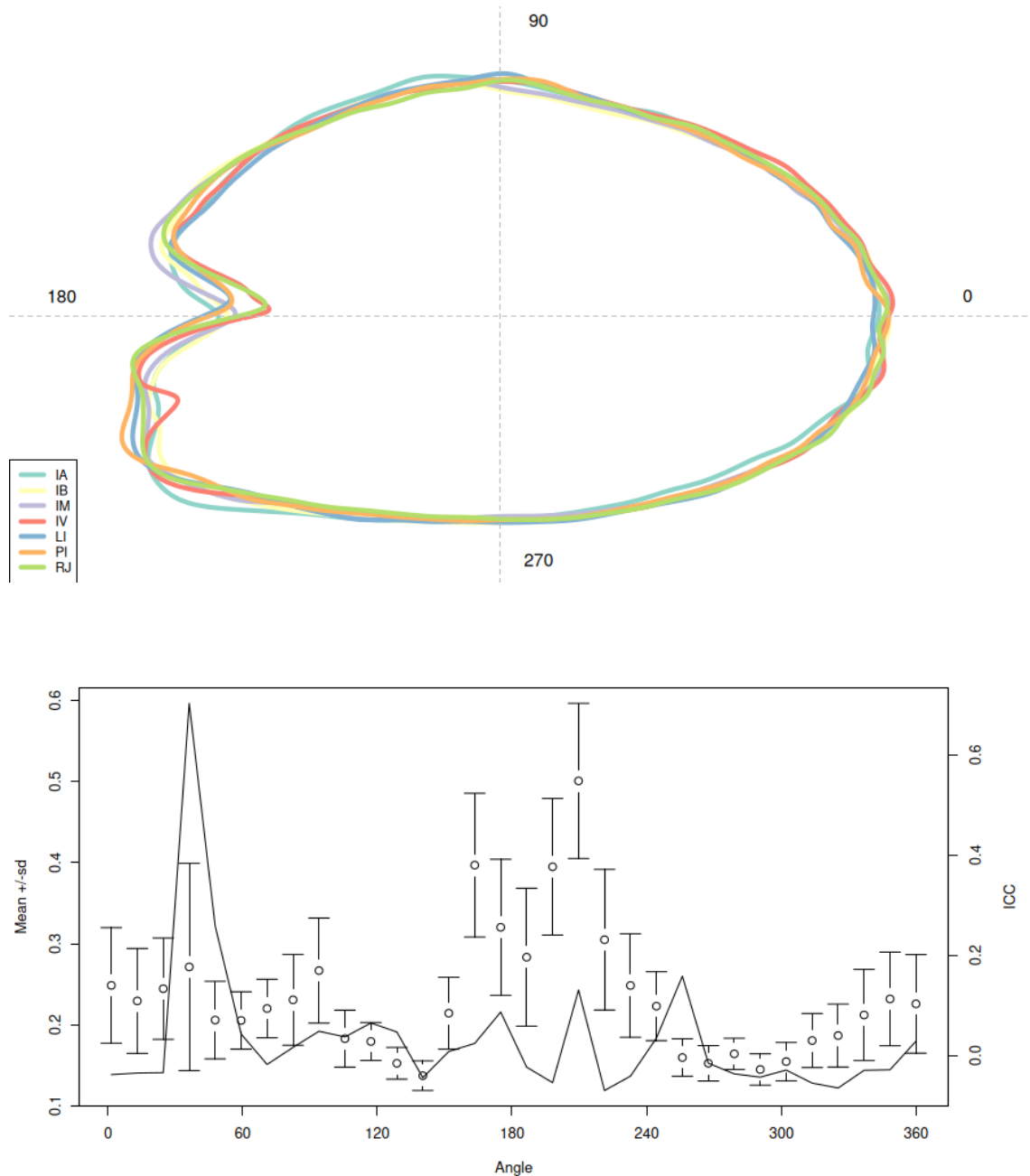


Figura 3. (A) Formas médias dos contornos de otólitos. (B) Médias (círculos) e desvios-padrão (barras verticais) dos coeficientes *Wavelet* para todos os otólitos lagenares (asteriscus) de *Psalidodon bifasciatus* amostrados no sul do Brasil, bem como a proporção de variância entre populações – correlação intraclasse (ICC) (linha preta). O eixo horizontal mostra o ângulo em graus, com base nas coordenadas polares das formas médias dos contornos.

Os dois primeiros componentes principais da análise PCA explicaram 45,7% da variação total, revelando grande sobreposição na morfologia dos otólitos lagenares entre as regiões hidrográficas (Figura 4A). Apesar dos principais eixos de variação serem semelhantes, diferenças significativas foram detectadas entre algumas populações. Essas diferenças ocorreram entre as amostras de: rio Jordão vs. rio Ribeira, alto rio Iguaçu e alto rio Paraná; baixo rio Iguaçu vs. rio Ribeira, bacia do Atlântico Sul e alto rio Iguaçu; bacia do Atlântico Sul

vs. alto rio Paraná e alto rio Iguaçu; rio Ribeira vs. alto rio Paraná; e alto rio Iguaçu vs. alto rio Paraná, conforme representado nos dois primeiros eixos da análise discriminante linear (LDA) (Figura 4B). As variações mais marcantes na forma auricular dos otólitos lagenares ocorreram na região anterior, atribuídas principalmente à posição e à conformação da pseudoexcisura, além de pequenas modificações nas estruturas do antirrostro e pseudoantirrostro.

Tabela 2. Análise Multivariada de Variância (MANOVA) para os coeficientes *Wavelet* da forma dos otólitos lagenares de *Psalidodon bifasciatus* entre populações amostradas no sul do Brasil. Números em negrito indicam diferenças significativas.

	Df	Pillai	approx. F	num Df	den Df	Pr(>F)
MANOVA						
Hydrographic regions	6	4.049	2.917	222	312	0.000
Residuals	83					
Pairwise MANOVA						
IA - IB	1	0.803	7.684	9	17	0.001
IA - IM	1	0.822	9.267	9	18	0.000
IA - IV	1	0.739	4.723	9	15	0.011
IA - LI	1	0.885	14.555	9	17	0.000
IA - PI	1	0.882	9.927	9	12	0.001
IA - RJ	1	0.892	14.628	9	16	0.000
IB - IM	1	0.399	1.400	9	19	0.296
IB - IV	1	0.515	1.884	9	16	0.167
IB - LI	1	0.701	4.682	9	18	0.008
IB - PI	1	0.440	1.133	9	13	0.447
IB - RJ	1	0.538	2.200	9	17	0.110
IM - IV	1	0.581	2.615	9	17	0.071
IM - LI	1	0.597	3.133	9	19	0.035
IM - PI	1	0.368	0.905	9	14	0.572
IM - RJ	1	0.564	2.584	9	18	0.071
IV - LI	1	0.678	3.746	9	16	0.023
IV - PI	1	0.669	2.471	9	11	0.110
IV - RJ	1	0.312	0.756	9	15	0.656
LI - PI	1	0.526	1.602	9	13	0.260
LI - RJ	1	0.689	4.188	9	17	0.013
PI - RJ	1	0.656	2.546	9	12	0.105

Fonte: O autor

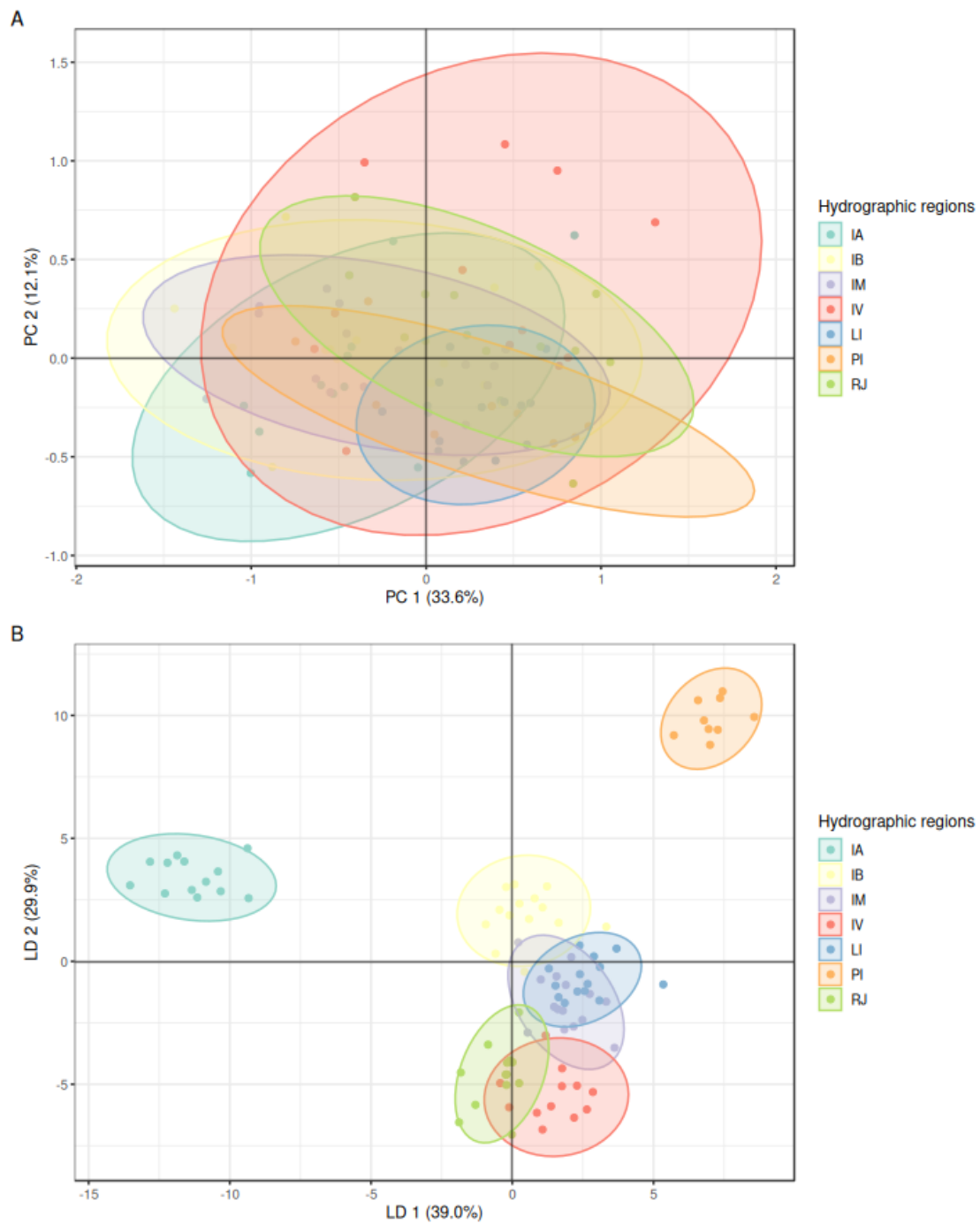


FIGURA 4. (A) Gráfico da Análise de Componentes Principais (PC1 vs. PC2) dos contornos dos otólitos lagenares (asteriscus) de *Psalidodon bifasciatus* do sul do Brasil, aplicados aos coeficientes *Wavelet*, com elipses de intervalo de confiança de 95%. (B) Análise Discriminante Linear (LDA) dos contornos dos otólitos lagenares de *P. bifasciatus* aplicados aos mesmos coeficientes, também com elipses de 95% de confiança. Símbolos e elipses foram coloridos conforme a região hidrográfica (alto rio Paraná, médio/baixo Iguaçu, alto Iguaçu, rio Jordão e bacias litorâneas do Atlântico Sul). As elipses representam a dispersão média dos pontos em torno do centroide (círculo aberto).

DISCUSSÃO

Os otólitos asteriscus de *Psalidodon bifasciatus* apresenta uma morfologia geral que pode ser efetivamente atribuída aos otólitos lagenares da maioria dos caracídeos (Boyle; Herrel, 2018; Mérigot et al., 2007; Libungan; Pálsson, 2015; Tuset et al., 2016) e de outros táxons ostariofíseos (Nelson et al., 2016; Ladich; Schulz-Mirbach, 2016), apesar da grande diversidade e plasticidade fenotípica dos Characiformes (Melo et al., 2022). Os otólitos lagenares analisados no presente estudo correspondem ao tipo *gyro* proposto por Assis (2003), com base no formato e na orientação dos lobos.

Esse tipo morfológico (auricular) de otólito é geralmente grande e robusto, podendo ser facilmente extraído e manipulado em caracídeos (Mélotte et al., 2018). Ele é caracterizado por um *lobus major* bem desenvolvido, um *lobus minor* reduzido (geralmente fundido a uma das margens da pseudoexcisura), uma fossa acústica curvada e uma pseudoexcisura anterior conspícua (Assis, 2003). Essas características confirmam que o asteriscus pode funcionar como um marcador morfológico estável, mesmo em grupos com alta plasticidade fenotípica, como dos caracídeos (Melo et al., 2022).

Apesar de todos os otólitos asteriscus analisados apresentarem morfologia semelhante, a Análise Discriminante Linear (LDA) da forma dos otólitos e os resultados da MANOVA indicaram a existência de diversificação em algumas populações isoladas de *Psalidodon bifasciatus*. A avaliação da identidade e delimitação de *P. bifasciatus* está além do escopo deste estudo, pois a aplicação isolada da análise de forma dos otólitos é insuficiente para o reconhecimento de espécies distintas.

Além disso, todas as coletas foram realizadas em reservatórios. Ambientes regulados por barramentos tendem a uniformizar pressões seletivas, alterar hidrologia e atenuar heterogeneidade ambiental, o que pode induzir convergências plásticas e/ou reduzir a divergência fenotípica esperada (Agostinho et al., 2008; Pelicice et al., 2017). Em paralelo, a literatura sobre forma de otólitos indica sensibilidade a fatores ambientais (temperatura, regime hidrológico, composição da água, dieta) e ontogenéticos, o que recomenda cautela ao interpretar diferenças exclusivamente como históricas (Campana; Thorrold, 2001; Tuset et al., 2016; Clark et al., 2021; Vasconcelos et al., 2025).

Ainda assim, as diferenças morfológicas intraespecíficas observadas nos otólitos asteriscus revelaram a possível existência de três grupos distintos:

A análise conjunta (DWT→PCA/MANOVA/LDA) revelou três unidades morfológicas de asteriscus em *P. bifasciatus*: (G1) alto rio Paraná + médio/baixo Iguaçu + rio Jordão (IV, PI,

IM, IB, RJ; $n=63$), (G2) alto rio Iguaçu (IA; $n=13$) e (G3) bacias litorâneas do Atlântico Sul (LI; $n=14$). A MANOVA global foi significativa (Pillai=4.049, $F \approx 2.917$, $df = 222/312$, $p < 0.001$), com IA diferindo de todas as demais populações e LI diferindo de vários membros do G1 (com exceção de PI), indicando diferenciação alopátrica concentrada na região anterior do contorno (160–240°: antirostrum/pseudoexcisura/pseudoantirrostrum).

Esse padrão reforça que a variação da forma dos otólitos não ocorre de maneira aleatória, mas reflete processos evolutivos e históricos relacionados ao isolamento geográfico, conectividade pretérita entre bacias e condições ambientais específicas (Albert; Reis, 2011; Ribeiro, 2006; Crelier et al., 2025). Os resultados observados se alinham a diversos estudos realizados com peixes neotropicais, nos quais a morfometria de otólitos revelou agrupamentos geográficos consistentes, mesmo quando os caracteres externos mostravam alta sobreposição fenotípica (Dalcin; Abilhoa, 2024; Soeth et al., 2019; Avigliano et al., 2018).

Indivíduos provenientes do alto rio Paraná, rio Jordão e dos trechos médio e inferior do rio Iguaçu apresentaram uma forma de otólito distinta das populações de outros sistemas hidrográficos, apesar do isolamento geográfico da ictiofauna do rio Iguaçu imposto pelas Cataratas do Iguaçu (Vicari et al., 2006; Baumgartner et al., 2012; Pini et al., 2021). Os indivíduos do alto rio Iguaçu também apresentaram forma de otólito distinta das populações de outros sistemas hidrográficos. Otólitos com contorno semelhante também foram encontrados em indivíduos de *P. bifasciatus* das bacias “litorâneas” do Atlântico Sul — aqui entendidas como drenagens ao pé da Serra do Mar, próximas ao litoral, mas nem sempre estuarinas —, região isolada pelas maiores descontinuidades estruturais da Plataforma Sul-Americana (Sistema de Rift da Serra do Mar) (Ribeiro, 2006; Parolin et al., 2010).

Os fatores que determinam a forma dos otólitos ainda não são plenamente compreendidos e sua interpretação é complexa, pois envolvem a integração entre função sensorial (audição/equilíbrio) e morfologia do ouvido interno, incluindo variações entre órgãos otolíticos e entre linhagens com especializações auditivas (e.g., Otophysi) (Ladich, 2016; Schulz-Mirbach et al., 2019).

Além disso, a forma pode ser influenciada por ontogenia (mudanças relacionadas a estágios de vida/tamanho), dimorfismo sexual, condições ambientais (temperatura, salinidade, regime hidrológico, composição da água) e história biogeográfica (isolamento, conectividade) (Yedier et al., 2023; Baçusta et al., 2021; Bareille et al., 2024; Kang et al., 2025; Tuset et al., 2016; Dalcin; Abilhoa, 2024).

Mesmo considerando a ação sinérgica desses fatores, é plausível que histórias evolutivas distintas — resultantes de isolamento natural e/ou conectividade histórica entre populações —

constituam um motor principal da diferenciação observada na forma dos otólitos (Harrisson et al., 2025; Federica et al., 2025). Nossos resultados indicam a existência de variação geográfica na forma dos otólitos, o que é consistente com a hipótese de divergência alopátrica entre populações isoladas de *P. bifasciatus* no sul do Brasil, sugerindo a possível existência de novas entidades biológicas distintas.

- Grupo Paraná–Iguaçu (médio/baixo)–Jordão (G1)

As populações do alto rio Paraná (rios Ivaí e Piquiri), do rio Jordão e dos trechos médio e inferior do rio Iguaçu apresentaram formas de otólito semelhantes entre si e distintas das demais regiões. Esse agrupamento constitui um bloco morfofuncional amplo, refletido na baixa significância estatística em vários contrastes internos da MANOVA. Historicamente, essa proximidade pode estar relacionada a eventos de captura fluvial e reorganizações hidrográficas que caracterizaram o território paranaense ao longo do Cenozoico (Maack, 1981; Ribeiro, 2006), corroborados por evidências recentes de mobilidade de divisores de drenagens e rearranjos fluviais no sul do Brasil (Crelie et al., 2025). Essas alterações favoreceram intercâmbios ocasionais entre bacias, facilitando a retenção de traços ancestrais comuns.

Em paralelo, reservatórios e gestões hidrológicas semelhantes podem induzir convergências plásticas (Pelicice et al., 2017; Assumpção et al., 2021), de modo que a coesão morfológica de G1 decorra de mosaico entre herança histórica, isolamento parcial e uniformização ambiental antrópica.

Mesmo com o isolamento imposto pelas Cataratas do Iguaçu — reconhecidas como uma das barreiras naturais mais efetivas para a ictiofauna neotropical (Vicari et al., 2006; Baumgartner et al., 2012; Pini et al., 2021) —, o bloco formado por Paraná, Jordão e médio/baixo Iguaçu não se fragmenta morfológicamente. Isso sugere que a diversificação de *Psalidodon bifasciatus* não segue estritamente os limites hidrográficos, mas resulta de uma interação complexa entre história geológica, isolamento parcial e fatores ecológicos comuns (Albert; Reis, 2011).

Além disso, a presença de reservatórios e a conectividade lateral típica de rios de médio porte podem induzir respostas plásticas convergentes na forma dos otólitos, sem eliminar a assinatura histórica das populações (Pelicice et al., 2017; Assumpção et al., 2021).

- Grupo Alto rio Iguaçu (G2)

A população do alto rio Iguaçu (Represa do Passaúna) destacou-se como uma unidade morfológica singular, apresentando diferenças significativas frente a todas as demais regiões.

Essa distinção foi atribuída principalmente à variação na região anterior do otólito (ângulos 160–240°), envolvendo estruturas como pseudoexcisura, antirrostro e pseudoantirrostro.

Esse padrão é coerente com o isolamento natural e antrópico do Primeiro Planalto. Historicamente, com a compartimentação geomorfológica da Serra do Mar e do Planalto de Curitiba, reforçada por barragens em cabeceiras que reduzem fluxo gênico e acentuam fragmentação (Pelicece et al., 2017; Makrakis et al., 2019; Dal Pont et al., 2021; Dagosta et al., 2024).

Esse cenário também foi descrito para as bacias altas do Paraná/Iguaçu, Makrakis et al., (2019), que documentou a perda de conectividade em cabeceiras isoladas por hidrelétricas, padrão posteriormente confirmado no trabalho de Dal Pont et al., (2021) para o alto Iguaçu, e mais recentemente discutido por Dagosta et al., (2024), que ressaltam como a expansão de barragens e reservatórios intensifica a fragmentação de populações em trechos de cabeceira no sul do Brasil.

Além disso, condições ambientais locais, como maior altitude, temperaturas médias mais baixas e menor conectividade longitudinal, diferenciam esse setor dos demais (Larentis et al., 2016).

Esses resultados sugerem que as populações do alto Iguaçu podem estar submetidas a processos de divergência alopátrica de longa duração, com potencial de representar uma unidade evolutiva significativa (ESU) (Moritz, 1994; Fraser; Bernatchez, 2001). Estudos adicionais envolvendo dados genômicos e cariotípicos poderiam confirmar se essas populações já constituem linhagens independentes dentro de *P. bifasciatus*.

- Grupo Bacias “litorâneas” do Atlântico Sul (G3)

As populações do rio Capivari (UHE Chaminé-Vossoroca), pertencentes à faixa “litorânea” (aqui entendida como drenagens próximas à Serra do Mar), mostraram contornos de otólitos distintos da maioria dos sistemas interiores. Essa diferenciação está em concordância com o isolamento geológico imposto pelo Sistema de Rift da Serra do Mar, a maior descontinuidade estrutural da Plataforma Sul-Americana (Ribeiro, 2006).

Estudos recentes em peixes costeiros mostram que otólitos podem refletir variações ambientais estuarinas e marinhas, apresentando contornos diagnósticos (Vaz-Dos-Santos et al., 2023; Almeida et al., 2022).

A morfologia diferenciada dos otólitos sugere que o isolamento de longa duração, associado a pressões ambientais específicas dos sistemas costeiros, favoreceu a formação de

traços diagnósticos próprios. No entanto, a ausência de diferenças significativas entre Capivari (LI) e Piquiri (PI) é intrigante. Além de paleoconexões, outras hipóteses plausíveis incluem:

(a) convergência fenotípica modulada por regimes hidrológicos semelhantes em reservatórios (Agostinho et al., 2008; Pelicice et al., 2017);

(b) Também consideramos, de modo exploratório, um possível mecanismo. Introduções antrópicas recentes (translocações/peixamentos) podem, em tese, contribuir para a semelhança observada entre LI e PI. Se indivíduos oriundos do PI tiverem sido soltos no Capivari, esperaríamos (i) deslocamento do centróide morfológico de LI na direção de PI; (ii) aumento da variância intrapopulacional e/ou leve bimodalidade nos escores de forma; (iii) efeito de coorte, com maior convergência em classes etárias mais jovens coletadas após os eventos de soltura; e (iv) incongruências entre morfologia e linhas independentes (genética/citogenética ou microquímica de otólitos), evidenciando origem não local.

Salientamos que não dispomos de documentação técnica que comprove tais introduções; portanto, tratamos essa possibilidade como hipótese residual, não necessária para explicar o padrão principal e dependente de verificação específica em estudos futuros. Esses resultados reforçam que o Atlântico Sul pode representar uma unidade morfológica costeira independente, com isolamento geológico antigo, mas ainda passível de apresentar convergências locais com sistemas interiores adjacentes.

Cabe destacar que a análise isolada da forma dos otólitos, embora robusta, não é suficiente para delimitar espécies ou subunidades taxonômicas; sua força reside em identificar linhagens potenciais e padrões de isolamento, principalmente quando combinada a dados genômicos, cariotípicos e ecológicos (Mereles et al., 2021; Tuset et al., 2021; Avigliano et al., 2018; Pattanayak et al., 2024).

- Marcadores: robustez, estado de caráter e congruência.

Para que um traço de otólito opere como marcador morfológico informativo (p.ex., posição/ângulo/profundidade da pseudoexcisura; conformação do complexo antirrosto–pseudoantirrosto), três dimensões interpretativas devem ser articuladas.

(i) Robustez e especificidade populacional: alto contraste entre grupos, baixa variação intragrupo e estabilidade frente a covariáveis (tamanho/idade/sexo). A significância multivariada observada (Pillai elevado; $p < 0,001$) sugere sinal real, mas a triagem de marcadores candidatos deve considerar efeitos ambientais previsíveis e o contexto de reservatórios (Campana; Thorrold, 2001; Tuset et al., 2016; Clark et al., 2021; Pelicice et al., 2017).

(ii) Estado de caráter (plesiomorfia/apomorfia/sinapomorfia): traços plesiomórficos tendem a ser amplamente compartilhados e pouco úteis para discriminar subdivisões recentes; traços apomórficos restritos (ou sinapomorfias compartilhadas por um subconjunto coeso) são mais informativos sobre história comum, lembrando o risco de homoplasia em grupos plásticos (Hennig, 1999; Wiley; Lieberman, 2011).

(iii) Congruência entre linhas de evidência: a interpretação como marcador evolutivo (vs. ambiental) ganha força quando há consonância com genética/citogenética (diferenças cariotípicas; *clusters* genômicos), biogeografia (barreiras, história de isolamento) e, idealmente, microquímica de otólitos (Campana; Casselman, 1993; Campana; Thorrold, 2001; Libungan; Pálsson, 2015; Schulz-Mirbach et al., 2019; Moritz, 1994; Fraser; Bernatchez, 2001; Maistro et al., 1992; Nishiyama et al., 2016; Pazza; Kavalco, 2018; Gavazzoni et al., 2018; Limeira et al., 2022).

- Implicações evolutivas

A diferenciação de *P. bifasciatus* em três grupos principais — (G1) Paraná–Iguaçu médio/baixo–Jordão, (G2) Alto Iguaçu e (G3) Atlântico Sul — demonstra que a espécie apresenta uma estrutura populacional complexa, refletindo a interação de barreiras naturais (cataratas, rift), barreiras artificiais (hidrelétricas), isolamento geográfico prolongado e plasticidade ambiental.

Esse padrão é consistente com a hipótese de divergência alopátrica como força central na diversificação de populações dulcícolas isoladas (Cracraft, 1982; Rahel, 2007) e reforça a relevância dos otólitos como ferramenta para detectar diferenciação intraespecífica, especialmente em grupos com alta plasticidade fenotípica e potenciais complexos de espécies, como os caracídeos (Tuset et al., 2016; Vasconcelos et al., 2025).

Assim, os resultados sustentam a hipótese de divergência alopátrica associada à história geológica, à ação antrópica e a gradientes ambientais, sugerindo que *P. bifasciatus* apresenta estrutura populacional complexa ao longo de sua distribuição no sul do Brasil. A integração futura de análises morfológicas, genéticas e tróficas permitirá avaliar melhor os limites populacionais e o papel das barreiras naturais e artificiais na diversificação de peixes neotropicais (Moritz, 1994; Fraser; Bernatchez, 2001).

Do ponto de vista aplicado, os resultados indicam que *P. bifasciatus* poderia ser tratado como um conjunto de Unidades Evolutivamente Significativas, cada qual potencialmente demandando estratégias próprias de conservação e manejo. A integração de análises morfológicas com dados moleculares, citogenéticos e ecológicos será determinante para

confirmar o grau de independência evolutiva dessas populações e, possivelmente, revelar novas entidades taxonômicas no grupo (Moritz, 1994; Fraser; Bernatchez, 2001; Limeira et al., 2022).

Considerando implicações práticas, a identificação de três unidades morfológicas indica que as populações de *P. bifasciatus* podem demandar planos de manejo diferenciados, especialmente em regiões impactadas por hidrelétricas e fragmentação longitudinal. A manutenção ou restauração de conectividade entre trechos de rios — por exemplo, por meio de passagens para peixes ou gestão integrada de reservatórios — deve compor estratégias voltadas à preservação da diversidade intraespecífica e da integridade evolutiva dessas populações (Agostinho et al., 2008; Pelicice et al., 2017).

REFERÊNCIAS

- ABILHOA, V.; DUBOC, L. F. A new species of the freshwater fish genus *Astyanax* (Ostariophysi: Characidae) from the rio Iguaçu basin, southeastern Brazil. *Zootaxa*, v. 1587, p. 43-52, 2007.
- AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; GOMES, L. C. Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. *Brazilian Journal of Biology*, v. 68, p. 1119-1132, 2008.
- ALBERT, J. S.; REIS, R. E. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. Berkeley; Los Angeles: University of California Press; London: England, 2011. 389 p.
- ALMEIDA, P. et al. Population structure of the Brazilian Carapeba *Eugerres brasiliensis* in a complex of lagoon systems from Southwest Atlantic Ocean inferred from otolith elemental and shape signatures. In: *Biology and Life Sciences Forum*. MDPI, 2022. p. 60.
- ANDO, K. et al. Otolith radiocarbon signatures provide distinct migration history of walleye pollock around Hokkaido, Japan in the North-Western Pacific. *Ecology and Evolution*, v. 14, n. 7, p. e11288, 2024.
- ARTONI, R. F. et al. *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi basin (Paraná, Brazil). *Neotropical Ichthyology*, v. 4, p. 197-202, 2006.
- ASSIS, C. A. The lagenar otoliths of teleosts: their morphology and its application in species identification, phylogeny and systematics. *Journal of Fish Biology*, v. 62, n. 6, p. 1268-1295, 2003.
- ASSUMPÇÃO, L. de et al. Deep pools: ecological sanctuaries for *Steindachneridion melanodermatum*, a large endemic and endangered pimelodid of the Iguaçu River. *Water*, v. 13, n. 12, p. 1700, 2021.
- AVIGLIANO, E. et al. Using otolith morphometry for the identification of three sympatric and morphologically similar species of *Astyanax* from the Atlantic Rain Forest (Argentina). *Environmental Biology of Fishes*, v. 101, n. 9, p. 1319-1328, 2018.
- BAREILLE, G. et al. Freshwater fish otoliths record signals from both water and physiological processes: new insights from Sr/Ca and Ba/Ca ratios. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 81, n. 2, p. 223-240, 2024.
- BAŞUSTA, N.; DÜRRANI, Ö. Sexual dimorphism in the otolith shape of shi drum, *Umbrina cirrosa* (L.), in the eastern Mediterranean Sea: fish size–otolith size relationships. *Journal of Fish Biology*, v. 99, n. 1, p. 164-174, 2021.
- BAUMGARTNER, G. et al. *Peixes do Baixo Rio Iguaçu*. Maringá: Eduem, 2012.
- BIRD, J. L.; EPPLER, D. T.; CHECKLEY, D. M. Jr. Comparisons of herring otoliths using Fourier series shape analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 43, n. 6, p. 1228-1234, 1986.
- BONHOMME, V.; PICQ, S.; GAUCHEREL, C.; CLAUDE, J. Momocs: outline analysis using R. *Journal of Statistical Software*, v. 56, n. 13, p. 1-24, 2014. DOI: 10.18637/jss.v056.i13.
- BOYLE, K. S.; HERREL, A. Relative size variation of the otoliths, swim bladder, and Weberian apparatus structures in piranhas and pacus (Characiformes: Serrasalminae) with

different ecologies and its implications for the detection of sound stimuli. *Journal of Morphology*, v. 279, n. 12, p. 1849-1871, 2018.

CAMPANA, S. E.; CASSELMAN, J. M. Stock discrimination using otolith shape analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 50, n. 5, p. 1062-1083, 1993.

CAMPANA, S. E.; THORROLD, S. R. Otoliths, increments, and elements: keys to a comprehensive understanding of fish populations? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 58, n. 1, p. 30-38, 2001.

CANÑÁS, L. et al. Use of the otolith shape analysis in stock identification of anglerfish (*Lophius piscatorius*) in the Northeast Atlantic. *ICES Journal of Marine Science*, v. 69, n. 2, p. 250-256, 2012. DOI: 10.1093/icesjms/fss006.

CASTRO, J. P. et al. Evidence of incipient speciation in *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, v. 12, n. 2, p. 429-438, 2014. DOI: 10.1590/1982-0224-20130222.

CLARK, F. J. K.; LIMA, C. S. S.; PESSANHA, A. L. M. Otolith shape analysis of the Brazilian silverside in two northeastern Brazilian estuaries with distinct salinity ranges. *Fisheries Research*, v. 243, p. e106094, 2021.

CRACRAFT, J. Geographic differentiation, cladistics, and vicariance biogeography: reconstructing the tempo and mode of evolution. *American Zoologist*, v. 22, n. 2, p. 411-424, 1982.

CRELIER, C. et al. Mobility of South America's transcontinental drainage divide and shrinkage of the Paraná River Basin linked to lithologic and geodynamic controls. *Scientific Reports*, v. 15, n. 1, p. 3134, 2025.

DAGOSTA, F. C. P.; PINNA, M. de. Biogeography of Amazonian fishes: deconstructing river basins as biogeographic units. *Neotropical Ichthyology*, v. 15, n. 3, p. e170034, 2017.

DAGOSTA, F. C. P. et al. Fishes of the upper rio Paraná basin: diversity, biogeography and conservation. *Neotropical Ichthyology*, v. 22, n. 1, p. e230066, 2024.

DALCIN, R. H.; ABILHOA, V. Discriminating *Scleromystax barbatus* (Siluriformes: Callichthyidae) populations from Atlantic Rainforest streams employing otolith shape. *Neotropical Ichthyology*, v. 22, n. 01, p. e230129, 2024.

DAL PONT, G. et al. Monitoring fish communities through environmental DNA metabarcoding in the fish pass system of the second largest hydropower plant in the world. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 23167, 2021.

DEVRIES, D. A.; GRIMES, C. B.; PRAGER, M. H. Using otolith shape analysis to distinguish Eastern Gulf of Mexico and Atlantic Ocean stocks of king mackerel. *Fisheries Research*, v. 57, n. 1, p. 51-62, 2002.

DOMINGUES, M. D. S. et al. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. *Neotropical Ichthyology*, v. 5, n. 1, p. 37-44, 2007. DOI: 10.1590/S1679-62252007000100005.

DOS REIS, R. B. et al. Freshwater fishes from Paraná State, Brazil: an annotated list, with comments on biogeographic patterns, threats, and future perspectives. *Zootaxa*, v. 4868, n. 4, p. 451-494, 2020.

- EIGENMANN, C. H. New characins in the collection of the Carnegie Museum. *Annals of Carnegie Museum*, v. 8, n. 1, p. 164-181, 1911.
- FEDERICA, S. et al. Population-level shape variation and otolith asymmetry in *Diplodus annularis*. *Scientific Reports*, v. 15, n. 1, p. 2464, 2025.
- FRASER, D. J.; BERNATCHEZ, L. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*, v. 10, n. 12, p. 2741-2752, 2001.
- FROTA, A.; OTA, R. R.; DEPRÁ, G. C.; GANASSIN, M. J. M.; DA GRAÇA, W. J. A new inventory for fishes of headwater streams from the rio das Cinzas and rio Itararé basins, rio Paranapanema system, Paraná, Brazil. *Biota Neotropica*, v. 20, n. 1, p. e20190833, 2020. DOI: 10.1590/1676-0611.
- GAVAZZONI, M. et al. Morphologically cryptic species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup diagnosed through cytogenetic characters. *Zebrafish*, v. 15, p. 382-388, 2018. DOI: 10.1089/zeb.2018.1574.
- GENÇAY, R.; SELÇUK, F.; WHITCHER, B. Differentiating intraday seasonalities through wavelet multi-scaling. *Physica A*, v. 289, p. 543-556, 2001.
- GRANADOS-AMORES, E. et al. Geometric morphometrics in the sulcus acusticus of the sagittae otolith as tool to discriminate species of the genus *Centropomus* (Centropomidae: Perciformes) from the southeastern Gulf of California. *Marine Biodiversity*, v. 50, n. 1, p. 10, 2020.
- HARRISSON, K. A. et al. Otolith and genomic data reveal temporal insights into stocking across a large river basin in a mobile, long-lived Australian freshwater fish species. *Molecular Ecology*, v. 34, n. 7, p. e17714, 2025.
- HENNIG, W. Phylogenetic systematics. *University of Illinois Press*, 1999.
- INGENITO, L. F. S.; DUBOC, L. F.; ABILHOA, V. Contribuição ao conhecimento da ictiofauna do alto Iguaçu, Paraná, Brasil. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar*, v. 7, n. 1, p. 23-36, 2004.
- KANG, Z. et al. Exploring the drivers of otolith Sr/Ca during the early life stages of *Larimichthys polyactis*: insights from cultured and wild populations. *Frontiers in Marine Science*, v. 12, p. 1513070, 2025.
- KUHL, F. P.; GIARDINA, C. R. Elliptic Fourier features of a close contour. *Computer Graphics and Image Processing*, v. 18, p. 259-278, 1982.
- LADICH, F. Peripheral hearing structures in fishes: diversity and sensitivity of catfishes and cichlids. Fish Hearing and Bioacoustics: An Anthology in Honor of Arthur N. Popper and Richard R. Fay, p. 321-340, 2016.
- LADICH, F.; SCHULZ-MIRBACH, T. Diversity in fish auditory systems: one of the riddles of sensory biology. *Frontiers in Ecology and Evolution*, v. 4, p. 28, 2016.
- LARENTIS, C. et al. Ichthyofauna of streams from the lower Iguaçu River basin, Paraná State, Brazil. *Biota Neotropica*, v. 16, n. 3, p. e20150117, 2016.
- LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. *Numerical ecology*. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2012.
- LIBUNGAN, L. A.; PÁLSSON, S. Shaper: an R package to study otolith shape variation among fish populations. *PLoS One*, v. 10, p. e0121102, 2015a.

- LIBUNGAN, L. A.; PÁLSSON, S. Shaper: collection and analysis of otolith shape data. Version 0.1-5. *R package*, 2015b.
- LIMEIRA, D. M. et al. Molecular data reveal a complex population genetic structure for *Psalidodon scabripinnis* (Teleostei: Characidae) in the Atlantic Rainforest, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, v. 45, p. e20210048, 2022.
- LUNDBERG, J. G. et al. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In: MALABARBA, L. R. et al. (eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 13-48.
- MAACK, R. *Geografia física do Estado do Paraná*. 2. ed. Rio de Janeiro: J. Olympio, 1981.
- MAISTRO, E. L. et al. Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetica*, v. 87, n. 2, p. 101-106, 1992.
- MAKRAKIS, S. et al. Hydropower development and fishways: a need for connectivity in rivers of the Upper Paraná Basin. *Sustainability*, v. 11, n. 13, p. 3749, 2019.
- MELO, Bruno F. et al. Phylogenomics of Characidae, a hyper-diverse Neotropical freshwater fish lineage, with a phylogenetic classification including four families (Teleostei: Characiformes). *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 202, n. 1, p. zlae101, 2024.
- MÉLOTTE, G. et al. Hearing capacities and morphology of the auditory system in Serrasalminidae (Teleostei: Otophysi). *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1281, 2018.
- MERELES, M. A. et al. Discrimination of species and populations of the genus *Cichla* (Cichliformes: Cichlidae) in rivers of the Amazon basin using otolithic morphometry. *Neotropical Ichthyology*, v. 19, n. 4, p. e200149, 2021. DOI: 10.1590/1982-0224-2020-0149.
- MÉRIGOT, B.; LETOURNEUR, Y.; LECOMTE-FINIGER, R. Characterization of local populations of the common sole *Solea solea* (Pisces, Soleidae) in the NW Mediterranean through otolith morphometrics and shape analysis. *Marine Biology*, v. 151, n. 3, p. 997-1008, 2007.
- MIZOGUCHI, S. M. H. N.; MARTINS-SANTOS, I. C. Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Hereditas*, v. 127, n. 3, p. 249-253, 1997.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 14, p. 331-357, 1991.
- MORITZ, C. Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 9, n. 10, p. 373-375, 1994.
- NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. *Fishes of the world*. 5. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2016.
- NEVES, M. P. et al. First record of *Astyanax bifasciatus* Garavello & Sampaio, 2010 (Teleostei, Ostariophysi, Characidae) in the Piquiri River basin, upper Paraná River basin. *Check List*, v. 16, n. 1, p. 93-101, 2020.
- NISHIYAMA, P. B. et al. Karyotypic diversity among three species of the genus *Astyanax* (Characiformes: Characidae). *Brazilian Journal of Biology*, v. 76, p. 360-366, 2016.
- OOMS, J. magick: advanced graphics and image-processing in R. *R package version 2.8.7*, 2025. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=magick>.

- PARISI-BARADAD, V. et al. Otolith shape contour analysis using affine transformation invariant wavelet transforms and curvature scale space representation. *Marine and Freshwater Research*, v. 56, p. 795-804, 2005.
- PAROLIN, M.; RIBEIRO, C. V.; LEANDRINI, J. A. *Abordagem ambiental interdisciplinar em bacias hidrográficas no Estado do Paraná*. Campo Mourão: Editora da Fecilcam, 2010.
- PAVANELLI, C. S.; OLIVEIRA, C. A. M. A redescription of *Astyanax gymnodontus* (Eigenmann, 1911), new combination, a polymorphic characid fish from the rio Iguaçu basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 7, p. 569-578, 2009.
- PAXTON, J. R. Fish otoliths: do sizes correlate with taxonomic group, habitat and/or luminescence? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 355, n. 1401, p. 1299-1303, 2000.
- PAZZA, R.; DERGAM, J.A.; KAVALCO, K. F. Trends in karyotype evolution in *Astyanax* (Teleostei, Characiformes, Characidae): insights from molecular data. *Frontiers in Genetics*, v. 9, p. 131, 2018.
- PAZZA, R. et al. The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei, Characiformes): a multidisciplinary approach. *Journal of Fish Biology*, v. 72, n. 8, p. 2002-2010, 2008. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2008.01837.x.
- PELICICE, F. M. et al. Neotropical freshwater fishes imperilled by unsustainable policies. *Fish and Fisheries*, v. 18, n. 6, p. 1119-1133, 2017.
- PINI, S. F. R. et al. Ichthyofauna in the last free-flowing river of the Lower Iguaçu basin: the importance of tributaries for conservation of endemic species. *ZooKeys*, v. 1041, p. 183-200, 2021.
- POSTUMA, K. H. The nucleus of the herring otolith as a racial character. *ICES Journal of Marine Science*, v. 35, n. 2, p. 121-129, 1974.
- R CORE TEAM. *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2025. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.
- RAHEL, F. J. Biogeographic barriers, connectivity and homogenization of freshwater faunas: it's a small world after all. *Freshwater Biology*, v. 52, n. 4, p. 696-710, 2007.
- REIS VASCONCELOS, J. P. et al. Identifying populations of the blue jack mackerel (*Trachurus picturatus*) in the Northeast Atlantic by using geometric morphometrics and otolith shape analysis. *Fishery Bulletin*, v. 116, n. 1, p. 81-92, 2018.
- RIBEIRO, A. C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, v. 4, n. 2, p. 225-246, 2006.
- SANTOS, J. de A. et al. Otolith shape analysis supports three cryptic species in the *Stellifer punctatissimus* complex (Acanthuriformes: Sciaenidae). *Neotropical Ichthyology*, v. 20, p. e220005, 2022.
- SANTOS, R. S. et al. Different sagitta otolith morphotypes for the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* in the Southwestern Atlantic coast. *Fisheries Research*, v. 195, p. 222-229, 2017. DOI: 10.1016/j.fishres.2017.07.027.

- SOETH, M. et al. Stock structure of Atlantic spadefish *Chaetodipterus faber* from Southwest Atlantic Ocean inferred from otolith elemental and shape signatures. *Fisheries Research*, v. 211, p. 81-90, 2019.
- SCHULZ-MIRBACH, T. et al. Enigmatic ear stones: what we know about the functional role and evolution of fish otoliths. *Biological Reviews*, v. 94, n. 2, p. 457-482, 2019.
- TERÁN, G. E.; BENITEZ, M. F.; MIRANDE, J. M. Opening the Trojan horse: phylogeny of *Astyanax*, two new genera and resurrection of *Psalidodon* (Teleostei: Characidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 190, n. 4, p. 1217-1234, 2020.
- TONELLA, L. H. et al. Neotropical freshwater fishes: a dataset of occurrence and abundance of freshwater fishes in the Neotropics. *Neotropical Ichthyology*, v. 21, n. 1, p. e230005, 2023.
- TUSET, V. M. et al. Otolith shape lends support to the sensory drive hypothesis in rockfishes. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 29, n. 10, p. 2083-2097, 2016.
- VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. Neotropical ichthyology: an overview. In: MALABARBA, L. R. et al. (eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 1-12.
- VASCONCELOS, et al. Investigating *Aphanopus spp.* in the Atlantic waters using otolith contour: converging population hypotheses. 2023.
- VASCONCELOS, J. et al. Choosing wavelet methods for otolith contour studies. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 35, p. 201-216, 2025. DOI: 10.1007/s11160-024-09896-6.
- VASCONCELOS, J. et al. Phenotypic variation in otolith shape of American shad across eastern North American rivers. *Scientific Reports*, v. 15, n. 1, p. 29748, 2025.
- VAZ-DOS-SANTOS, A. M. et al. Geographic variation in *Opisthonema oglinum* (Lesueur, 1818) in the Southeastern Brazilian Bight inferred from otolith shape and chemical signatures. *Fishes*, v. 8, n. 5, p. 234, 2023.
- VETTERLI, M.; KOVAČEVIĆ, J. Wavelets and subband coding. *Englewood Cliffs: Prentice Hall PTR*, 1995.
- VICARI, M. R. et al. Cytogenetics and biogeography: considerations about the natural origin of *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) on the Iguaçu River. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 49, n. 2, p. 297-303, 2006.
- WILEY, E. O.; LIEBERMAN, B. S. Phylogenetics: theory and practice of phylogenetic systematics. *John Wiley & Sons*, 2011.
- WINEMILLER, K. O.; AGOSTINHO, A. A.; CARAMASCHI, E. P. Fish ecology in tropical streams. In: DUDGEON, D. (ed.). *Tropical stream ecology*. San Diego: Academic Press, 2008. p. 107-146.
- WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 2, n. 1-3, p. 37-52, 1987. DOI: 10.1016/0169-7439(87)80084-9.
- YANG, T. et al. Otolith morphometrics and variations between two populations of *Sillago sinica* (Perciformes, Sillaginidae) in the East China Sea and the Yellow Sea. *Thalassas: An International Journal of Marine Sciences*, v. 40, n. 2, p. 1007-1017, 2024. DOI: 10.1007/s41208-024-00711-4.

YEDIER, S.; BOSTANCI, D.; TÜRKER, D. Morphological and morphometric features of the abnormal and normal saccular otoliths in flatfishes. *The Anatomical Record*, v. 306, n. 3, p. 672-687, 2023.

ZABEL, R. W.; HAUGHT, K.; CHITTARO, P. M. Variability in fish size/otolith radius relationships among populations of Chinook salmon. *Environmental Biology of Fishes*, v. 89, n. 3, p. 267-278, 2010.

ZELDITCH, M.; SWIDERSKI, D.; SHEETS, H. D. *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2012.