

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
TROPICAL

TAÍS BARBOSA ALMEIDA

ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE *Simothraulopsis*
***diamantinensis* Mariano, 2010 (INSECTA: EPHEMEROPTERA)**

SÃO MATEUS
2016

TAÍS BARBOSA ALMEIDA

**ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE *Simothraulopsis*
diamantinensis Mariano, 2010 (INSECTA: EPHEMEROPTERA)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Orientador: Professor Dr. Frederico Falcão Salles

SÃO MATEUS
2016

TAÍS BARBOSA ALMEIDA

**ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE *Simothraulopsis*
diamantinensis Mariano, 2010 (INSECTA: EPHEMEROPTERA)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Aprovado em 16 de agosto de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Falcão Salles
Orientador

Profa. Dra. Roberta Paresque
Coorientadora

Prof. Dr. Vander Calmon Rosa
Membro Interno

Profa. Dra. Ana Carolina Covre Loss
Membro Externo

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Frederico Falcão Salles pela oportunidade, amizade, dedicação, ensinamentos e orientação sempre a postos. Me sinto feliz em fazer parte do seu laboratório, poder absorver um “pouquinho” do seu vasto conhecimento e de ser hoje, completamente fascinada pelo mundo que se esconde por trás de uma ordem chamada Ephemeroptera. Ps.: As melhores coletas são as de insetos aquáticos. Hoje isso hoje é tão óbvio, né?! Está achado meu lugar no mundo, entre cachoeiras e rios mundo afora. Muito obrigada por me apresentar tudo isso Fred.

À minha coorientadora, Prof. Dra. Roberta Paresque (fique claro aqui: qualquer coisa que pronunciarei sobre essa pessoa será pouco), pelo seu acolhimento e amizade que vai muito mais longe do que a de qualquer orientação. Teta, obrigada pela enorme oportunidade e por me ensinar tudo e mais um pouco sobre o universo molecular (diga-se de passagem, que até aprender a pipetar aprendi com você). Hoje me vejo apaixonada por isso, com a clara certeza de que é o que gosto de fazer!! Obrigada por me acolher como sua família e por todo carinho dedicado, espero profundamente que eu lhe tenha devolvido tudo isso na mesma proporção e ter mostrado o quanto sou grata!!! Não poderia deixar de estender esse agradecimento à Ana, Manu e Léo, que me acolheram como membro da família. Fazer parte do dia-a-dia de vocês é muito bom, vou sentir muita falta disso!

Aos meus amigos do LabSEI, Rayner, Keyla, Maísa, Alice, Paula, Marina, Marcos, Daniel, Evandro, Fabiana, Kamyla e Phillipe, obrigada pelas horas divertidas tomando nosso cafézinho, o qual o meu é o melhor de todos, sorry! Obrigada a todos por toda ajuda que recebi seja em identificar material, pedir reagente emprestado ou aquele compartilhamento de um bom artigo. Mamá, Rayner e Keyla, vocês em especial são meus melhores presentes durante esses dois anos! Melhores companhias no campo, em trabalhos nas disciplinas ou simplesmente quando ficamos juntos escrevendo nossas dissertações...

Para minha mãe Cristina toda minha gratidão por apoiar todos meus passos e ser meu maior exemplo de força e determinação! Aos meus irmãos Andiará e Lucas, meu sobrinho Fillipe e minhas agregadas do coração Bia e Alice, vocês são meus espelhos de bondade e amor... enfim, amo vocês!!!! Ao meu pai Antônio de Pádua (*in memoriam*), que sempre foi minha inspiração, que trilhou o caminho da ciência e que fazia isso tão bem, espero um dia ser tão inteligente e dedicada como você foi um dia!

Ao professor Dr. Adolfo Calor e seu aluno Rogério Campos da Universidade Federal da Bahia, por ceder o material proveniente do leste da Chapada Diamantina.

Ao professor Dr. Diego Hoffmann pela ajuda com as análises de modelagem, meu muito obrigada pela colaboração de tanta importância e esclarecimento para este trabalho.

À Universidade Federal do Espírito Santo e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical pelo conhecimento agregado.

Aos servidores da SUPGRAD – Secretaria Unificada de Pós-graduação – pelo apoio com as questões burocráticas do curso e frequentes dúvidas quanto as documentações, em especial as finais.

À FAPES pela concessão da bolsa de mestrado e financiamento deste estudo.

RESUMO

Simothraulopsis Demoulin (1960) pertence à família Leptophlebiidae e é composto por nove espécies endêmicas da região Neotropical. Atualmente os registros de ocorrência de *Simothraulopsis diamantinensis* Mariano (2010) mostram uma distribuição disjunta, podendo ser encontrada no Estado do Espírito Santo, em Minas Gerais (na Serra do Cipó) e na Bahia (na Chapada Diamantina). Neste trabalho buscou-se obter os padrões da variação genética para *S. diamantinensis* e relacioná-los aos eventos passados em um contexto filogeográfico. Foram usadas sequências de duas regiões do gene mitocondrial: COI e COII de 57 e 61 indivíduos, respectivamente. Para isso foram conduzidas análises de diversidade genética, estruturação geográfica e história demográfica. Os resultados de diversidade genética e estrutura geográfica revelaram uma forte estruturação das populações de *S. diamantinensis*, que foram subdivididas em: (Vale do Capão + Serra do Cipó, Lençóis, Mucugê, Santa Teresa, Norte do Espírito Santo e Alegre), além disso os altos valores de F_{st} encontrados demonstraram que várias populações estão isoladas umas das outras e já não existe mais fluxo gênico entre elas. Os resultados de história demográfica sugerem que o padrão de diversificação encontrado para a espécie teve influência do Último Máximo Glacial, entretanto existe a possibilidade de ter ocorrido marcos que coincidam eventos geológicos e climáticos influenciando a diversificação, no mesmo tempo e espaço, que podem ter sido apagados por assinaturas genéticas mais recentes.

Palavras-chave: Filogeografia, distribuição disjunta, fluxo gênico, estruturação das populações.

ABSTRACT

Simothraulopsis Demoulin (1960) belongs to Leptophlebiidae family and consists of nine restricted species to Neotropical region. Currently the records of occurrence of *Simothraulopsis diamantinensis* Mariano (2010) show a disjunct distribution and can be found in the state of Espírito Santo, in the Serra do Cipó - Minas Gerais and in the Chapada Diamantina - Bahia. In this work we tried to get the standard of genetic variation for *S. diamantinensis* and relate them to past events in a phylogeographic context. Were used sequences of two regions of the mitochondrial gene: COII and COII of 57 and 61 individuals, respectively. For this was conducted analysis of genetic diversity, geographic structure and demographic history. The results of genetic diversity and geographical structure revealed a strong organization and the populations of *S. diamantinensis* were subdivided into: (Vale do Capão + Serra do Cipó, Lençóis, Mucugê, Santa Teresa, Northern of Espírito Santo and Alegre), furthermore the high F_{st} values found show that several populations are isolated from each other and there is no more gene flow between them. The demographic history of results suggest that the standard of diversification found for the species had influence of the Last Glacial Maximum, however it is possible to have occurred milestones that coincide geological and climatic events affecting the diversification in time and space, which may have been erased by recent genetic signatures.

Keywords: Phylogeography, disjunctic distribution, gene flow, structure of populations

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DE ESTUDO.....	15
1.2 CONCEITOS DE ESPÉCIE E ESPECIAÇÃO.....	20
1.3 O CONTEXTO FILOGEOGRÁFICO	22
1.4. OBJETIVOS.....	24
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1 AMOSTRA E OBTENÇÃO DOS DADOS MOLECULARES	26
2.2 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DE DNA	29
2.3 MODELAGEM	31
2.3.1 Dados.....	31
2.3.2 Distribuição dos modelos	32
2.3.3 Análises	34
3. RESULTADOS	35
3.1 DIVERSIDADE GENÉTICA.....	35
3.1.1 Teste de saturação, Descritores da Variabilidade Genética e Composição das Sequências	35
3.1.2 Descritores de Variabilidade Genética	36
3.2 ESTRUTURAÇÃO GEOGRÁFICA.....	40
3.2.1 Análise de Variância Molecular (AMOVA)	40
3.2.2 Fluxo gênico	44
3.2.3 Rede de Haplótipos.....	48
3.3 HISTÓRIA DEMOGRÁFICA	50
3.3.1 Testes de neutralidade	50
3.3.2 Árvore, tempo de divergência e modelagem da distribuição	51

4. DISCUSSÃO	56
4.1 ESTRUTURA GENÉTICA E HISTÓRIA DEMOGRÁFICA	56
4.2 DELIMITANDO ESPÉCIES EM <i>SIMOTHRAULOPSIS</i>	60
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
APÊNDICE 1	74
APÊNDICE 2	75

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cladograma com as hipóteses de parentescos entre os táxons alvos do estudo por Nascimento (2014).....18
- Figura 2.** Imago macho de *Simothraulopsis diamantinensis* (Leptophlebiidae)19
- Figura 3.** Pontos amostrados. Os pontos coloridos referem-se a pontos com sucesso de coleta para as espécies envolvidas nas análises, já os pontos em preto fazem referência às localidades onde a espécie ocorre, porém que não se obteve material. Os círculos verdes representam as seguintes localidades: Afonso Claudio, Alegre e norte do Espírito Santo. Os triângulos rosas representam Santa Teresa, Serra do Cipó e Vale do Capão. Por fim, as estrelas vermelhas representam Lençóis e Mucugê.....27
- Figura 4.** Teste de saturação para COI. As linhas sólidas mostram as frequências de transições (s, em azul) e transversões (v, em verde), em relação à distância genética (eixo x)35
- Figura 5.** Teste de saturação para COII. As linhas sólidas mostram as frequências de transições (s, em azul) e transversões (v, em verde), em relação à distância genética (eixo x)36
- Figura 6.** Rede de haplótipos *median-joining* com dados concatenados dos genes COI e COII de *Simothraulopsis diamantinensis*. Cada círculo colorido compreende um haplótipo e o seu tamanho é proporcional a sua frequência. Cada traço na linha que conecta os haplótipos representa um passo mutacional. A codificação dos haplótipos segue de acordo com o Apêndice 249

Figura 7. Topologia com os tempos de divergência das populações de *Simothraulopsis diamantinensis* gerada pelo BEAST. Os números presentes em cada nó são os valores de probabilidade posterior dos agrupamentos. As OTU's estão representadas pelos números tombos para cada indivíduo presente na Coleção Zoológica Norte Capixaba e as populações foram apresentadas na forma de barras com o mesmo padrão de cor apresentado na rede de haplótipos.....53

Figura 8. Resultado da *Extended Bayesian Skiline Plot* (EBSP). A escala temporal é lida da esquerda para a direita, em que o tempo presente é representado por 0 e o tempo passado segue as marcações seguintes. De tal modo 0,001 representa cerca de 6.000 mil anos atrás, 0,002 - 12.000 mil anos atrás, 0,003 - 18 mil anos atrás e assim por diante.....54

Figura 9. Projeção de área com adequabilidade para o período de 120.000 a 140.000 anos atrás do Último interglacial.....54

Figura 10. Projeção de área com adequabilidade para o período de 22.000 anos atrás do Último Máximo Glacial.....55

Figura 11. Projeção de área com adequabilidade para o período de 6.000 anos atrás do Holoceno Médio55

Figura 12. Projeção de área com adequabilidade atual55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distância par-a-par de COI entre as médias das distâncias genéticas dos indivíduos entre as populações de <i>Simothraulopsis diamantinensis</i> , entre as espécies <i>Simothraulopsis</i> sp. nov 4 e <i>Simothraulopsis</i> sp. nov. 2	38
Tabela 2. Distância par-a-par de COII entre as médias das distâncias genéticas dos indivíduos entre as populações de <i>Simothraulopsis diamantinensis</i> , entre as espécies <i>Simothraulopsis</i> sp. nov 4 e <i>Simothraulopsis</i> sp. nov. 2.....	39
Tabela 3. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para COI de <i>Simothraulopsis diamantinensis</i> . Cenário A: Regiões. Os grupos de populações foram: Espírito Santo, Bahia e Minas Gerais.....	40
Tabela 4. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para COI de <i>Simothraulopsis diamantinensis</i> . Cenário B: Regiões. Os grupos de populações foram: Espírito Santo, Vale do Capão + Serra do Cipó e Mucugê + Lençóis	41
Tabela 5. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para COI de <i>Simothraulopsis diamantinensis</i> . Cenário C: Regiões. Os grupos de populações foram: Norte do Espírito Santo, Santa Teresa, Alegre, Serra do Cipó + Vale do Capão, Mucugê e Lençóis.....	41
Tabela 6. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para COI de <i>Simothraulopsis diamantinensis</i> . Cenário D: Regiões. Os grupos de populações foram: Norte do Espírito Santo + Alegre, Santa Teresa, Serra do Cipó + Vale do Capão, Mucugê e Lençóis.....	42
Tabela 7. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para COII de <i>Simothraulopsis diamantinensis</i> . Cenário A: Regiões. Os grupos de populações foram: Espírito Santo, Bahia e Minas Gerais.....	43

Tabela 8. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para COII de <i>Simothraulopsis diamantinensis</i> . Cenário B: Regiões. Os grupos de populações foram: Espírito Santo, Vale do Capão + Serra do Cipó e Mucugê + Lençóis.....	43
Tabela 9. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para COII de <i>Simothraulopsis diamantinensis</i> . Cenário C: Regiões. Os grupos de populações foram: Norte do Espírito Santo, Santa Teresa, Alegre, Serra do Cipó + Vale do Capão, Mucugê e Lençóis.....	44
Tabela 10. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para COII de <i>Simothraulopsis diamantinensis</i> . Cenário D: Regiões. Os grupos de populações foram: Norte do Espírito Santo + Alegre, Santa Teresa, Serra do Cipó + Vale do Capão, Mucugê e Lençóis.....	44
Tabela 11. Cálculo do Fluxo gênico para COI entre as populações de <i>Simothraulopsis diamantinensis</i> provenientes da Bahia (Vale do Capão, Lençóis e Mucugê), Minas Gerais (Serra do Cipó) e Espírito Santo (Santa Teresa, Alegre e Norte). Valores de Fst iguais ou acima de 0,7 foram destacados em cinza, indicando ausência de fluxo gênico entre as populações relacionadas.....	45
Tabela 12. Cálculo do Fluxo gênico para COII entre as populações de <i>Simothraulopsis diamantinensis</i> provenientes da Bahia (Vale do Capão, Lençóis e Mucugê), Minas Gerais (Serra do Cipó) e Espírito Santo (Santa Teresa, Alegre e Norte). Valores de Fst iguais ou acima de 0,7 foram destacados em cinza, indicando ausência de fluxo gênico entre as populações relacionadas	46
Tabela 13. Valores obtidos nos testes de neutralidade para as sequências de <i>Simothraulopsis diamantinensis</i> do gene mitocondrial COI e suas respectivas populações. Os valores significativos (p-valor < 0,05) foram destacados em cinza.....	50

Tabela 14 Valores obtidos nos testes de neutralidade para as sequências de *Simothraulopsis diamantinensis* do gene mitocondrial COII e suas respectivas populações. Os valores significativos (p-valor < 0,05) foram destacados em cinza.....51

1. INTRODUÇÃO

A Região Neotropical é conhecida por apresentar uma grande biodiversidade (Mittermeier, 1998) e por possuir biomas cujas histórias biogeográficas são bastante complexas em decorrência de uma série de eventos climáticos (e.g. Pennington et al., 2004; Carnaval & Moritz, 2008) e geológicos (e.g. Hoorn et al., 2010; Ribas et al., 2007) que contribuíram para o desenvolvimento dos ambientes e afetaram a diversificação tanto positivamente, como negativamente em diferentes grupos biológicos. Contudo, por mais que os cientistas explorem a diversidade de espécies, existe ainda uma grande lacuna de conhecimento, principalmente quanto aos corpos d'água e os indivíduos aquáticos, é válido assumir que ainda estamos longe de estimar tamanha diversidade e entender os processos envolvidos na diversificação dos organismos destes ambientes (e.g. Montoya-Burgos, 2003; Derryberry et al., 2011; Justi et al., 2016).

A história evolutiva de cada ser vivo está diretamente relacionada com a história do ambiente em que vivem (Brown & Lomolino, 2006). Essa certeza faz surgir uma pergunta fundamental: por que os organismos estão onde estão? Apesar de parecer uma pergunta simples, a resposta exige um enfoque multidisciplinar que combine informações da taxonomia, evolução, geografia e geologia. Dessa forma, o primeiro passo para entender como a biodiversidade está organizada no espaço é descrever e entender os padrões de distribuição geográfica e depois verificar e interpretar quais foram os processos que resultaram nesses padrões.

Estudos filogenéticos e biogeográficos, num contexto evolutivo, vêm mostrando que a diversificação de muitos grupos de insetos foi atribuída aos processos de vicariância (Gauld & Wahl, 2002; Sanmartin & Ronquist, 2004), como por exemplo em Trichoptera (Johanson, 1998) e em famílias de Coleoptera (Farrell, 2001). Por outro lado, eventos de dispersão são

invocados para explicar a diversificação de organismos mais vágéis, como Lepidoptera (Vane-Wright & de Jong, 2003; Zakharov et al., 2004).

Por sua vez, devido ao seu ciclo de vida anfibiótico, a ordem Ephemeroptera apresenta formas de dispersão distintas em seus diferentes estágios: durante a fase juvenil a dispersão é restrita à bacia hidrográfica onde o indivíduo vive, deslocando-se através de nado e/ou *drift*, enquanto que, na fase adulta, o indivíduo alado se desloca através do voo, mas com um alcance limitado devido ao seu curto tempo de vida (Britain & Sartori 2003). Por muito tempo considerou-se que a capacidade de dispersão dos efemerópteros era extremamente limitada (McCafferty, 1998; Edmunds, 1972), entretanto, estudos recentes como o de Monaghan et al. (2005), Vuataz et al. (2013) e Rutschmann et al. (2014) indicaram que a vagilidade da ordem pode ter sido subestimada. No trabalho de Monaghan et al. (2005) foi demonstrado que a capacidade de dispersão dos adultos é maior dentre as espécies que passam a fase larval em água parada, quando comparados àqueles que vivem em corredeiras, indicando que esses habitats considerados instáveis possam selecionar características ecológicas que propiciem a dispersão dos insetos. Em outras palavras, os autores sugerem que os organismos presentes neste tipo de ambiente sejam mais tolerantes e por isso possuam maior capacidade de dispersão.

1.1 CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DE ESTUDO

A ordem Ephemeroptera está presente em habitats de água doce em todos os continentes, exceto na Antártica e está até o momento dividida em 42 famílias, 400 gêneros e mais de 3000 espécies (Barber-James et al., 2008). Dentre os insetos alados (Pterygota), os Ephemeroptera, juntamente com Odonata são considerados os mais antigos (Odgen & Whiting, 2005). Estes dois táxons são incapazes de dobrar suas asas sobre o seu abdômen e são, portanto, classificados como Palaeoptera, e os demais insetos alados como Neoptera. A monofilia dos

Pterygota é bem estabelecida por dados moleculares e morfológicos (Trautwein et al., 2012), mas as relações mais basais continuam com diversas incógnitas para ser estabelecidas.

A evolução dos Ephemeroptera é uma longa história. Os primeiros fósseis foram registrados em diferentes partes do mundo a partir de sedimentos que datam do Carbonífero (Kukalová-Peck, 1985; Knecht et al., 2011) ou do início do Permiano, cerca de 280 m.a.a., (Sartori & Brittain, 2015). Outros fósseis que integram as atuais famílias da ordem, como Leptophlebiidae e Baetidae, foram registrados do Cretáceo inferior (McCafferty, 1997). No Brasil há registros fósseis do sítio de Santana, datado também do Cretáceo (McCafferty, 1990). No entanto, são mais escassos os dados de fósseis que englobem os atuais gêneros ou espécies da ordem, principalmente para a Região Neotropical.

A família Leptophlebiidae é uma das famílias mais diversificadas de Ephemeroptera, com aproximadamente 131 gêneros e 640 espécies descritas para o mundo (Baber-James et al., 2008), possui distribuição global, porém apresenta um alto grau de endemismo na América do Sul (Domínguez et al., 2006). Leptophlebiidae foi previamente dividida em três subfamílias: Leptophlebiinae Banks, 1900; Atalophlebiinae Peters, 1980 e Habrophlebiinae Kluge, 1994. A subfamília Atalophlebiinae tem origem Gondwânica e apresenta grande diversidade e abundância em riachos do Hemisfério Sul, enquanto as subfamílias Leptophlebiinae e Habrophlebiinae são predominantes em cursos d'água do Hemisfério Norte (Savage, 1987; Sartori & Savage, 2005).

Posteriormente Kluge (2009), estabeleceu 3 subfamílias adicionais: Terpidinae, Castanophlebiinae e Calliarcyinae, baseado em caracteres morfológicos. Terpidinae e Castanophlebiinae consistem em 15 espécies que anteriormente eram conferidas à Atalophlebiinae. Calliarcyinae, por sua vez, compreende apenas o gênero *Calliarcys*, que era anteriormente atribuído a Leptophlebiinae. Recentemente, Godunko et al. (2015), em seu estudo filogenético baseado em caracteres morfológicos, confirmaram Leptophlebiinae como

grupo irmão de todos os grupos de Leptophlebiidae. *Calliarcys* foi revelado como grupo irmão de Habrophlebiinae e do complexo proposto por Kluge (Terpidinae, Castanophlebiinae e Calliarcyinae), justificando assim a sua classificação como subfamília Calliarcyinae.

Savage (1987) em seu estudo de classificação biogeográfica dos Leptophlebiidae da Região Neotropical propôs uma organização para alguns gêneros baseando-se nos padrões de distribuição geográfica das espécies para estabelecer linhagens adaptadas a diferentes zonas de temperatura: gêneros adaptados ao clima mais frio do escudo patagônico ou adaptados a climas mais quentes relacionados ao escudo Guiana-Brasil.

Dentre as linhagens propostas por Savage (1987), a linhagem Farrodes incluiu os gêneros *Homothraululus* Demoulin (1955), *Simothraulopsis* Demoulin (1966) e *Farrodes* Peters (1971). Domínguez et al. (1997) redefiniram o nome da linhagem para complexo *Homothraululus*, mantendo os três gêneros propostos inicialmente e apresentando características diagnósticas para o complexo, como por exemplo projeções posterolaterais presentes apenas nos segmentos abdominais VIII e IX e garras tarsais com um denticulo apical maior nas ninfas e características referentes à venação alar e genitália nos adultos.

Mais tarde, Domínguez (2009), realizou a primeira tentativa de relacionamento filogenético para os Atalophlebiinae da América do Sul, buscando representar todas as “linhagens” definidas por Savage (1987) e os resultados mostraram que o complexo *Homothraululus* composto unicamente por *Farrodes*, *Homothraululus* e *Simothraulopsis*, era parafilético.

O gênero *Simothraulopsis* é composto por cinco espécies: *S. demerara* Traver (1947), *S. sabalo* Kluge (2007), *S. plesius* Kluge (2007), *S. janae* Mariano (2010) e *S. diamantinensis* Mariano (2010), todas com distribuição para a Região Neotropical. Em uma revisão baseada em dados morfológicos, Nascimento (2014) sugeriu quatro novas espécies para o gênero, que foram definidas como: *Simothraulopsis* sp. nov.1, *Simothraulopsis* sp. nov.2, *Simothraulopsis*

sp. nov.3 e *Simothraulopsis* sp. nov.4., avaliou o monofiletismo do grupo, forneceu a primeira hipótese das relações filogenéticas interespecíficas (Figura 1) e acrescentou novos registros que ampliaram as áreas de distribuição das espécies para mais regiões do Brasil.

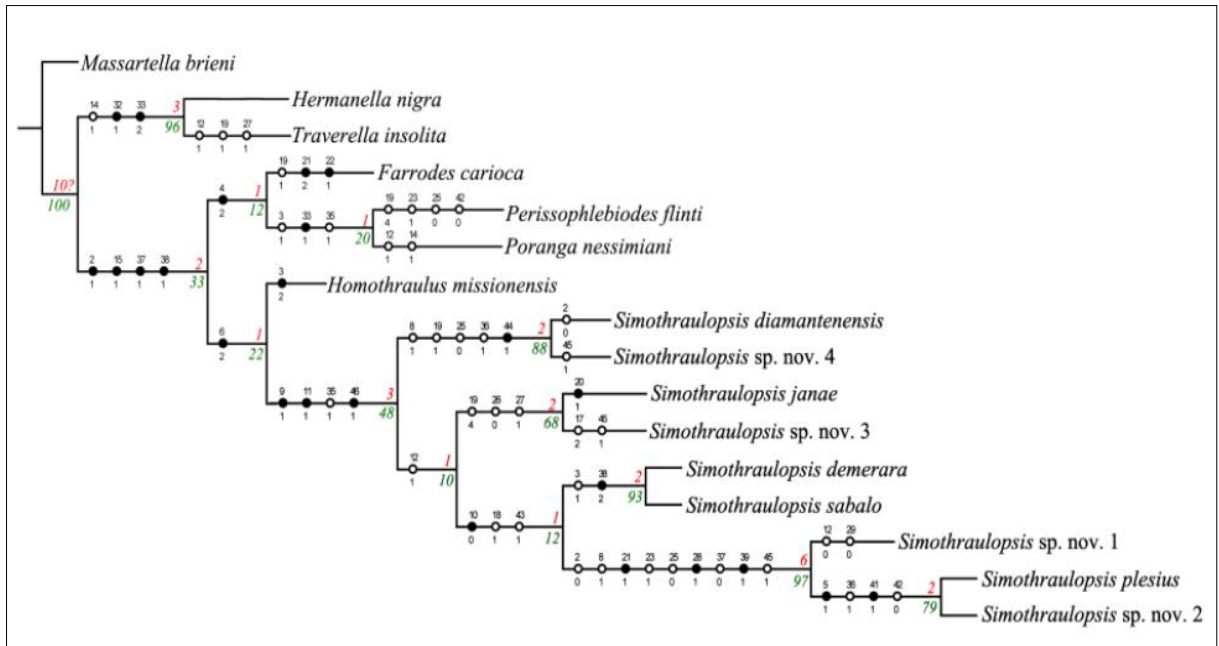


Figura 1. Cladograma com as hipóteses de parentescos entre os táxons alvos do estudo por Nascimento (2014).

A espécie alvo do presente estudo, *Simothraulopsis diamantinensis*, foi descrita por Mariano (2010) baseando-se apenas em imagos machos (Figura 2) coletados no Parque Nacional Chapada Diamantina – BA e foi separada das demais espécies do gênero pela combinação dos seguintes caracteres: (1) cavidades do fórceps unidas; (2) penes dividido no 3/4 apical; e (3) espinhos do pênis direcionados para a região mediana do corpo. As ninfas dessa espécie são encontradas em diferentes tipos de corpos d’água, desde os mais estreitos até os rios mais largos, porém é notória a preferência desses indivíduos por porções do rio que contém pedras soltas em seu leito e de corredeira mais acentuada (Nascimento, 2014).

Atualmente a distribuição conhecida de *S. diamantinensis* está restrita a sua localidade tipo, mas de acordo com os dados de Nascimento (2014) e com base em material depositado na

Coleção Zoológica Norte Capixaba (CZNC), a distribuição da espécie também inclui pontos de norte a sul no estado do Espírito Santo e em altitudes que variam de 24 a 718m (dados referentes ao presente estudo), em mais localidades na Chapada Diamantina - Bahia (Nascimento, 2014) e por fim, na Serra do Cipó - Minas Gerais (dados referentes ao presente estudo). Desta forma, a distribuição conhecida para *S. diamantinensis* é exibida em flancos opostos da Serra do Espinhaço e possui até então, um padrão disjunto.



Figura 2. Imago macho de *Simothraulopsis diamantinensis* (Leptophlebiidae). Foto: Frederico F. Salles

Apesar das recentes contribuições na sistemática de *Simothraulopsis*, os aspectos que tratam da variação genética do grupo nunca foram investigados. Além disso, pouco se sabe sobre mecanismos evolutivos envolvidos na especiação do gênero. Dentro deste contexto, a falta de um panorama que contemple as hipóteses de diversificação do grupo, em especial para a região da Mata Atlântica, somado a distribuição disjunta observada em *S. diamantinensis*, fez surgir o interesse em estudar os processos envolvidos na história evolutiva desta espécie.

1.2 CONCEITOS DE ESPÉCIE E ESPECIAÇÃO

Para melhor esclarecimento dos fatos aqui discutidos é necessário determinar com clareza os conceitos envolvidos na determinação de espécie e justificar qual deles será adotado aqui.

De forma geral, há unanimidade de que espécie é uma unidade fundamental da biodiversidade, distinguível de outras com base em seus caracteres fenéticos (Ridley, 2006). Contudo, existem discussões teóricas acerca dos critérios utilizados para definir o que é uma espécie corretamente, uma vez que é extremamente difícil abranger um conceito universal que englobe tanto os organismos sexuados, quanto assexuados, híbridos viáveis e férteis, viventes ou extintos, ou que vivem em uma variação contínua ou separados (Wilkins, 2011).

Diante do exposto, vários conceitos de espécie surgiram com o intuito de responder às múltiplas variações dos padrões da natureza. O primeiro conceito abordado aqui é o de **“Espécie Biológica”**, proposto por Mayr (1942; 1963). Amplamente citado na literatura, este conceito define uma espécie como sendo uma população de organismos que apresenta isolamento reprodutivo em relação a outras. Desta maneira, Mayr conceitua espécie como uma propriedade das populações, não dos indivíduos. Porém, alguns dos problemas deste conceito são refletidos em sua aplicação para os fósseis e também para organismos assexuados (já que não há cruzamento, o conceito de isolamento reprodutivo torna-se inaplicável) (Brown & Lomolino, 2006).

Os fatores não considerados no conceito biológico de espécie de Mayr (1942; 1963) foram abordados por Simpson (1951) e Wiley (1981), quando propuseram o **“Conceito Evolutivo de Espécie”**. Tal conceito define espécie como uma única linhagem evolutiva independente, ou seja, evolui independentemente de outras e tem destinos evolutivos unificados e tendências próprias. Este conceito elimina o defeito do conceito biológico quando considera apenas o isolamento reprodutivo real para o reconhecimento de espécies, porém seu principal

problema se dá pelo fato de não ser possível observar os destinos evolutivos e tendência das espécies (Brown & Lomolino, 2006).

O último conceito aqui abordado, e adotado ao longo dessa dissertação, é o “**Conceito Filogenético de Espécie**” (Cracraft, 1983), o qual reconhece uma espécie como o menor agrupamento de organismos diagnosticável no qual todos os indivíduos compartilham ao menos uma única característica derivada ou apomórfica, a qual não está presente em seus ancestrais ou parentes. Assim, os indivíduos das espécies são tratados nesse conceito como Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU's) e a possibilidade de recuperar a história evolutiva usando determinados marcadores nos indivíduos amostrados faz com que não haja necessidade de elaborar premissas sobre a história das populações, que passam, portanto, a ser definidas a posteriori, depois da reconstrução filogenética (Martins & Dominguez, 2011). Dessa forma, esse conceito oferece ao presente trabalho uma segurança para determinar os limites interespecíficos consistentes com a história evolutiva das populações analisadas.

O surgimento de novas espécies, é, na maioria das vezes, explicado pelo modelo de especiação alopátrica (também chamada de especiação geográfica), no qual a diferenciação se dá por uma barreira geográfica que separa a espécie ancestral em duas ou mais populações, a tal ponto que o fluxo gênico entre elas não aconteça mais. Essas populações ficam isoladas por tempo suficiente, sob pressões seletivas diferentes que vão alterar a frequência gênica desses indivíduos, ao ponto de que não haverá mais fluxo gênico caso elas voltem a se reunir (Mayr, 1942, 1963). Não obstante, existem outros modelos de diversificação que não envolvem as barreiras geográficas para reduzir o fluxo gênico, como a especiação simpátrica e parapátrica (Schluter, 2001). Sabe-se que entender os processos evolutivos e como eles desencadeiam a diversidade, ainda é um tópico intrínseco em pesquisas dentro do campo biológico, e processos como isolamento geográfico, redução do fluxo genético e adaptação local direcionam os modelos de especiação.

Para Endler (1977), a especiação parapátrica começa com a evolução de uma clina escalonada, ou seja, as populações com distribuição contínua possuem ao longo dela gradientes ecológicos ou clinas, e a seleção natural/deriva atuaria ou mantendo a clina estável ou de forma direcional sobre as populações. Esta hipótese converge com o conceito de isolamento por distância que diz que pode haver diversificação entre os extremos da distribuição de uma espécie caso a distância seja suficientemente grande para que as condições ambientais sejam distintas e, conseqüentemente, levem à divergência entre as populações (Wright, 1943). Por fim, na especiação simpátrica, a espécie se separa da ancestral sem que haja qualquer divisão na distribuição geográfica, ou seja, para esta teoria a existência de um polimorfismo surge independentemente de um espaço intrapopulacional, e mais tarde se fixa na população (Bush et al., 1977).

1.3 O CONTEXTO FILOGEOGRÁFICO

Cunhado por Avise et al. (1987), a filogeografia é um campo de estudo integrativo da ciência que usa a informação genética para compreender a distribuição geográfica ao longo da história genealógica das populações de uma espécie (Avise et al., 2000). Como o próprio nome indica, essa abordagem busca não somente obter as relações filogenéticas entre os táxons estudados, mas também se preocupa com os componentes históricos responsáveis pela distribuição espacial das linhagens, tais como seleção natural, deriva genética, demografia, taxa de migração entre outros.

Inicialmente, o marcador molecular escolhido para os estudos filogeográficos de animais foi o DNA mitocondrial, por possuir as seguintes características que o torna mais adequado para o estudo: é haploide, herdado matematicamente, não apresenta recombinação significativa, evolui rapidamente, além de ser de facilmente extraído e amplificado (Avise et al., 1987). Neste mesmo estudo, Avise et al. (1987) postularam três premissas cruciais para os

estudos filogeográficos: (1) a maior parte das espécies é composta de populações geograficamente estruturadas cujos membros ocupam ramos distintos em uma genealogia; (2) espécies que possuem pouca ou nenhuma estrutura filogeográfica possuem hábitos que incluem dispersão de indivíduos ou grupos e ocupam áreas onde não existem barreiras físicas conspícuas que impeçam o fluxo gênico; e (3) grupos intraespecíficos monofiléticos separados por grandes distâncias genéticas surgem de barreiras que impedem o fluxo gênico.

Desde os primeiros estudos filogeográficos até hoje, o avanço das técnicas de bioinformática e estatísticas permitiram o emprego de abordagens explicitamente computacionais em filogeografia, de forma que ao longo da história importantes passos foram dados nessa disciplina. A Teoria da Coalescência (Kingman, 1982), por exemplo, engloba um conjunto de tratamentos matemáticos formais para as relações de ancestralidade e descendência a partir de uma amostragem e vem sendo considerada o maior avanço em genética de populações dos últimos 20 anos (Nordborg, 2001). Junto à coalescência vieram os enfoques da “Teoria Neutra” postulada por Kimura (1968), segundo a qual a maior parte da variação alélica e substituições do DNA são neutras, de forma que a maior parte da variabilidade observada dentro de uma espécie é fixada nas populações por deriva genética e não por seleção.

Existe uma tendência de que a distribuição geográfica das espécies varie de uma forma regular ao longo de gradientes geográficos de latitude, altitude e habitat em resposta à adaptação e à seleção ou a fixação dos alelos por deriva. Todavia, alguns estudos filogeográficos envolvendo diversos organismos da Mata Atlântica, como por exemplo em abelhas (Batalha-Filho et al., 2010), anfíbios (Carnaval et al., 2009) e répteis (Pellegrino et al., 2005) demonstram que nem sempre essa tendência é seguida pelas espécies e demonstram a existência de descontinuidades filogeográficas entre as populações, ou seja, uma quebra no padrão genético ou no padrão de distribuição espacial das linhagens intraespecíficas.

A principal hipótese utilizada para explicar essas discontinuidades filogeográficas foi a teoria dos refúgios, proposta por Hafer (1969), Simpson & Hafer (1978) e Vanzolini & Williams (1970) para a Amazônia. Posteriormente Prance (1982) sugeriu que ela fosse aplicada também para a Mata Atlântica. Essa teoria basicamente é explicada por meio das mudanças climáticas, especialmente as glaciações do Quaternário, que alteraram a distribuição de biomas florestais e de vegetação aberta, formando blocos isolados, ou refúgios, que podiam voltar a expandir em períodos mais quentes e úmidos. Entretanto, Leite et al. (2016) mostraram resultados que mostram uma hipótese alternativa a teoria dos refúgios, abordando que a plataforma continental brasileira (área que atualmente se encontra submersa ao longo da costa) pode ter abrigado uma extensa área de Mata Atlântica há cerca de 21 mil anos (no Último Máximo Glacial), a qual permitiu que espécies caracteristicamente de floresta ocupassem estas áreas e expandissem suas populações, ao invés de reduzi-las e isolá-las. Segundo estes autores não se deve descartar a ideia da Teoria dos Refúgios para explicar a origem da diversidade que se vê hoje, porém acredita-se que a história deve ter sido mais complexa do que isso.

1.4. OBJETIVOS

Considerando que *S. diamantinensis* apresenta uma ampla ocorrência, com uma forte evidência que existem *gaps* ao longo da sua distribuição atual o presente trabalho buscou (i) obter os padrões da variação genética para este grupo e (ii) relacioná-los aos eventos passados em um contexto filogeográfico. Caso sejam detectados sinais de estruturação genética entre as localidades isoladas por distância, deve-se hipotetizar que a divergência entre as populações tenha ocorrido essencialmente por isolamento influenciado pela distância. A premissa para esta hipótese é que quanto maior a distância geográfica, maiores serão as diferenças acumuladas observadas. Caso este não seja o quadro da diversidade genética em questão, espera-se encontrar as assinaturas genéticas que evoquem outras hipóteses, como dos refúgios. No caso

dos refúgios, de acordo com Lessa et al. (2003) e Emerson et al. (2001) espera-se encontrar as seguintes assinaturas genéticas deixadas nas populações: (1) falta de estruturação geográfica; (2) excesso de haplótipos únicos (alelos raros); e (3) sinais de expansão demográfica datadas do Pleistoceno. Os eventos vicariantes são os responsáveis pela divergência genética, então espera-se encontrar uma quebra na distribuição com uma estruturação geográfica forte. Mesmo que as populações entrem em contato novamente, em virtude de uma expansão, não haverá associação entre o aumento da divergência molecular com o aumento da distância geográfica quando olharmos para a atual distribuição da espécie, mas fará sentido e irá coincidir com eventos geológicos passados que possivelmente separaram as populações.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Uma das primeiras etapas de uma análise filogeográfica é delimitar grupos que reflitam na relação entre a distribuição dos alelos e a ancestralidade dos indivíduos, o que em geral é definido *a priori* conforme as características biogeográficas que se adequem à pergunta em questão. Para descrever a variação geográfica, e especificamente detectar a estruturação geográfica ao longo da distribuição de *S. diamantinensis*, e também identificar quais fatores paleológicos influenciaram a distribuição observada foi explorado, inicialmente, a distribuição dos haplótipos sem a adoção de uma estrutura de diferenciação pré-definida, onde toda a amostra foi tratada como pertencentes a uma única população. Em um segundo momento foram obtidas árvores filogenéticas e, a partir dos clados formados, pode-se identificar as relações entre os indivíduos e assim os grupos foram definidos sem a necessidade de um critério *a priori*. De forma a descrever a variação molecular em torno da distribuição geográfica utilizou-se das localidades registradas para os indivíduos para formar os grupos, ou populações, e assim prosseguir com as análises de comparações par-a-par. Para isso, foram então testados quatro cenários: **(A)** em que a espécie está subdividida em três grupos (ES × BA × MG); **(B)** a espécie também está subdividida em três grupos (ES × Serra do Cipó-MG + Vale do Capão-BA × Mucugê-BA + Lençóis); **(C)** em que a espécie está subdividida em seis grupos (Norte do ES × Santa Teresa × Alegre × Serra do Cipó-MG + Vale do Capão-BA × Mucugê-BA × Lençóis), **(D)** em que a espécie está subdividida em cinco grupos (Norte do Espírito Santo + Alegre × Santa Teresa × Serra do Cipó + Vale do Capão × Mucugê × Lençóis).

2.1 AMOSTRA E OBTENÇÃO DOS DADOS MOLECULARES

Foram obtidos 63 indivíduos de três espécies do gênero (*Simothraulopsis diamantinensis*, *Simothraulopsis* sp. nov. 2 e *Simothraulopsis* sp. nov. 4) para as análises filogeográficas, a partir de 12 pontos de coleta amostrados pela equipe do Laboratório de

Sistemática e Ecologia de Insetos (Labsei - UFES), que abrangem os estados do Espírito Santo (ES), Minas Gerais (MG) e Bahia (BA). Ainda três indivíduos do leste da Chapada Diamantina foram cedidos pelo Laboratório de Entomologia Aquática (LEAq) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). No apêndice 1 é possível visualizar os dados referentes às localidades e procedência dos espécimes analisados, número tomo da Coleção Zoológica Norte Capixaba, bem como suas coordenadas geográficas e na Figura 3 estão exemplificados os pontos amostrados.

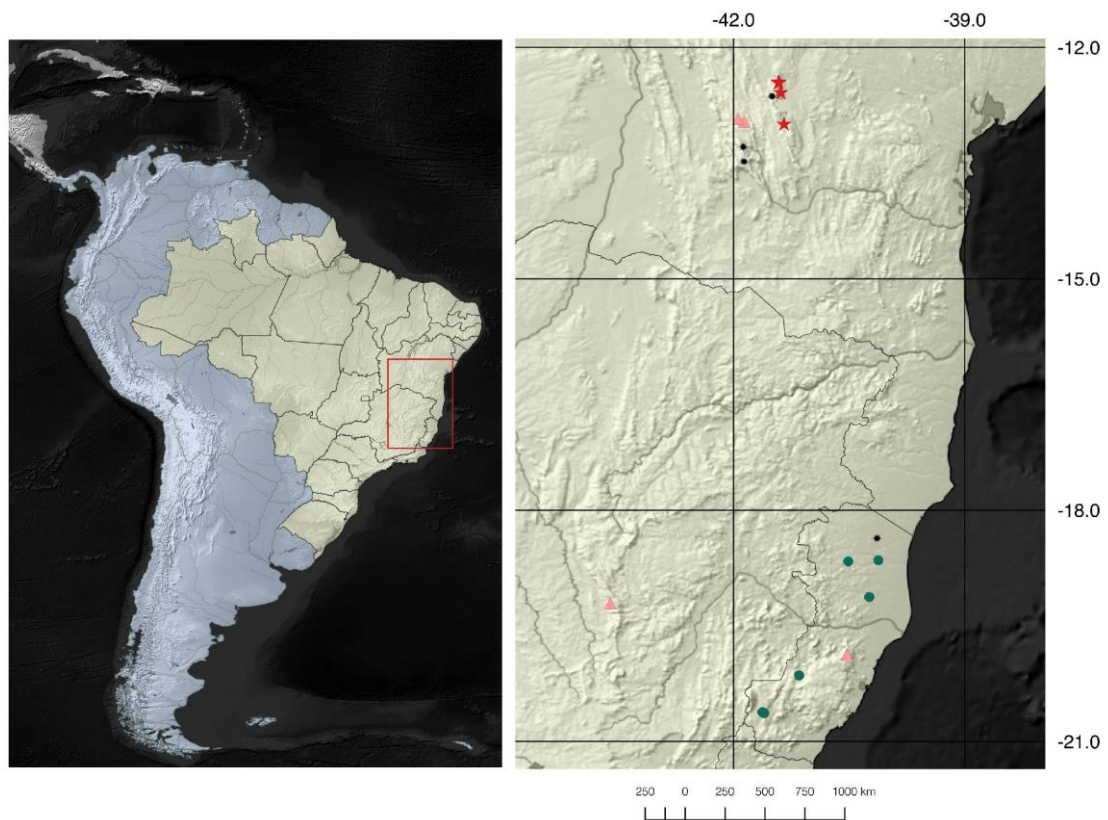


Figura 3. Pontos amostrados. Os pontos coloridos referem-se a pontos com sucesso de coleta para as espécies envolvidas nas análises, já os pontos em preto fazem referência às localidades onde a espécie ocorre, porém que não se obteve material. Os círculos verdes representam as seguintes localidades: Afonso Claudio, Alegre e norte do Espírito Santo. Os triângulos rosas representam Santa Teresa, Serra do Cipó e Vale do Capão. Por fim, as estrelas vermelhas representam Lençóis e Mucugê.

Todas as amostras foram fixadas e conservadas em etanol 96%, acondicionadas em freezer a -6°C e encontram-se depositadas e tombadas na Coleção Zoológica Norte Capixaba (CZNC), Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, Brasil.

Para obter o DNA genômico dos indivíduos seus tecidos foram acessados de duas formas: através das pernas (cerca de três pernas retiradas de um dos lados) ou a partir do seu tórax; as porções restantes foram retidas como vouchers. Posteriormente, os tecidos foram submetidos ao protocolo de extração de DNA a partir do Kit Wizard® SV *Genomic DNA Purification System Kit* (Promega®) e seus produtos foram submetidos a checagem de sua integridade e qualidade com o espectrofotômetro NanoDrop.

Para amplificação da região Citocromo c Oxidase subunidade I (COI - parcial) foram utilizados os primers C1-J-1718 e HCO-2198 (Folmer et al., 1994 e Simon et al., 1994), que amplificaram um fragmento com 400pb. A fim de amplificar o Citocromo c Oxidase subunidade II (COII), com 527pb, foram usados os primers TL2-J-3037 e C2-N-3661 (Takyia et al., 2006). Então, para cada 1µL de DNA genômico extraído, foram adicionados: 17,775 µL de água ultra-pura (ddH₂O), 1 µL de Promega® DNTp 100mM, Buffer MgCl₂ 10x; 2,5µL de Invitrogen® MgCl₂ 50mM; 0,3 µL de cada primer (5mM); e 0,125 µL de Invitrogen® Platinum Taq DNA Polymerase, obtendo um volume final de 25µL por tubo. O perfil utilizado para a amplificação dos fragmentos de COI seguiu o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos a 94° C por 45 segundos, 47°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos, seguidos de uma extensão final da fita a 72°C por 5 minutos. Os fragmentos de COII foram amplificados seguindo os seguintes parâmetros de temperatura: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, e extensão final da fita a 72°C por 7 minutos.

Em ambas, foram utilizados os controles negativos contendo os elementos da mistura da reação, com exceção do DNA. Posteriormente, as bandas foram checadas quanto ao seu

tamanho em gel de agarose a 1,5% e os produtos de PCR foram purificados utilizando ExoSAP-IT® (diluição de 1:4), adicionando-se 1 µL da solução já diluída para cada 10 µL de produto de PCR; no termociclador, a temperatura de 37°C por 30 minutos e 80°C por 15 minutos. Por fim, as amostras foram sequenciadas na Macrogen® e no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da UNESP de Jaboticabal.

2.2 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DE DNA

Ao todo foram obtidas 57 sequências de COI e 61 de COII para três espécies de *Simothraulopsis* (*S. diamantinensis*, *S. sp. nov. 2* e *S. sp. nov. 4*), as quais foram conferidas, editadas manualmente e, posteriormente, alinhadas com a ferramenta Clustal W (Chenna et al., 2003) implementada no software Geneious R7.

No software DAMBE (Xia et al., 2003; Xia & Lemey, 2009) foi testada a possibilidade de saturação na terceira posição dos códons, assim como em todas as posições, a proporção entre transversões (Iss.C) e transições (Iss), sendo que, para que não haja evidências de saturação nas sequências o Iss deve apresentar valores menores que Iss.C.

As relações entre os haplótipos foram inferidas utilizando-se redes de haplótipos pelo método *median-joining* (Bandelt et al., 1999), implementado no programa PopArt (www.popart.otago.ac.nz), baseando-se no algoritmo. As análises de distância par-a-par foram implementadas no programa MEGA versão 6.06 (Tamura et al., 2013), usando a opção ‘calcular distância’ com o modelo de Kimura 2-parâmetros.

O FST é um método utilizado para estimar a diferenciação populacional a partir da variância das frequências alélicas (Holsinger & Wier, 2009). Deste modo, se duas populações têm frequências alélicas idênticas, elas não serão geneticamente diferenciadas e, portanto, o FST será igual a 0. Por outro lado, se possuírem frequências alélicas completamente diferentes, o valor de FST será próximo a 1. Valores maiores do que 0,7 indicam ausência de fluxo gênico.

Para obter os índices de fixação F_{ST} par a par foi utilizado o programa Arlequin 3.01 (Excoffier et al., 2005).

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) testa a heterogeneidade genética particionando a variância molecular em variância interpopulacional e variância intrapopulacional, de acordo com estruturas populacionais definidas *a priori* (Excoffier et al., 1992; Excoffier et al., 2005). Essa análise foi implementada no programa Arlequin 3.01,

Os testes de neutralidade Tajima D (Tajima 1989) e F_S de Fu (Fu 1997) foram utilizados para verificar a existência de desvio à hipótese nula de neutralidade nas sequências (Excoffier et al., 2005). Estes testes permitem verificar a ocorrência de seleção em regiões do genoma, encontrar um desvio significativo nos resultados pode-se sugerir que as populações estejam em expansão ou redução populacional recente (Fu & Li, 1993; Tajima, 1996; Rand & Kann, 1998).

Para responder as questões relacionadas ao tempo de divergência e a estrutura populacional da espécie foi empregado o método de inferência coalescente usando o programa BEAST v1.4.8 (Drummond & Rambaut, 2007) com as sequências concatenadas. Foram realizadas três simulações de cadeia de Markov independentes com os seguintes parâmetros: Yule prior, árvore inicial randômica, modelo HKY + G (dado pelo AIC implementado no MEGA), distribuição gamma e relógio stricto. Devido à ausência de registros fósseis para a calibração do nó foi aplicada uma taxa evolutiva de 1.5% como reportada por Pereira da Conceicao et al. (2012) e Papadopoulou et al. (2010), para mtDNA de insetos.

Possíveis eventos de expansão demográfica foram inferidos pelo método de inferência coalescente *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP) (Heled & Drummond, 2008) que também foi implementado no BEAST v1.4.8. Foram realizadas duas corridas independentes do EBSP (150 a 250 milhões de gerações de MCMC) para cada filogruppo mitocondrial com os seguintes parâmetros: uma árvore inicial de UPGMA, modelo linear, parâmetros amostrados a cada 10000 gerações, e um *burn-in* de 10% a 30%. Utilizou-se o strict clock e o modelo evolutivo

foi estimado no MEGA com o critério de informação Akaike (AIC). Como calibração para a análise, utilizou-se uma taxa de mutação conhecida para o DNA mitocondrial em invertebrados de 1,5% por sítio por linhagem por milhão de anos, sob um prior de distribuição normal.

2.3 MODELAGEM

2.3.1 Dados

Para verificar a propensão de um habitat conhecido a ser ocupado pela espécie, estimar prováveis áreas geográficas de ocorrência que, até então, não são conhecidas como sendo ocupadas pela espécie, bem como estimar as alterações na adequação do habitat ao longo do tempo, foram utilizadas as análises de modelagem.

A área de estudo está localizada no leste do Brasil entre 36°- 49°W e 9°- 25°S. A média de projeção dos modelos de distribuição da espécie consistiu em um *buffer* de 300 km em torno de todos os registros de ocorrência (e.g. Anderson, 2013; Brown, 2014). Os registros de ocorrência foram obtidos por meio de coletas realizadas pela equipe do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Insetos e também a partir dos registros presentes no trabalho de Nascimento (2014) e as coordenadas foram determinadas por GPS. Um total de 24 registros foram compilados para *S. diamantinensis*.

Os dados atuais e passados do clima foram compilados a partir do banco de dados disponível em WorldClim v1.4 (<http://worldclim.org/>) (Hijmans et al., 2005). Ao todo foram selecionadas 19 variáveis do BIOCLIM, antes do processo de modelagem foram eliminadas as variáveis espacialmente correlacionadas (de todas as 19 variáveis do clima), usando a função “corr” em R (pacote estatístico), após a análise do coeficiente de correlação de Pearson foram retidas sete variáveis climáticas, consideradas menos correlacionadas (Pearson de <0,7).

As variáveis utilizadas foram: duração média do dia, isotermalidade (duração média do dia anual/temperatura), sazonalidade de temperatura, temperatura do trimestre mais quente, precipitação anual, precipitação do trimestre mais quente e precipitação de trimestre mais frio.

As variáveis selecionadas foram obtidas para o cenário atual (interpolações dos dados observados entre o período de 1950-2000), e cenários passados. Para o cenário passado foram considerados três períodos: Holoceno médio (cerca de 6.000 anos atrás), Último Máximo Glacial (cerca de 22.000 anos atrás) e Último interglacial (cerca de 120.000 - 140.000 anos atrás). Para o Holoceno médio foram considerados cinco modelos climáticos globais (GCMs: CCSM4, HadGEM2-ES, IPSL-CM5A-LR, MIROC-ESM, MPI-ESM-P), três modelos para o Último Máximo Glacial (GCMs: CCSM4, MIROC-ESM, MPI -ESM-P) e um modelo para o Último interglacial.

2.3.2 Distribuição dos modelos

Os modelos de distribuição das espécies (SDMS) foram criados modelando suas exigências ambientais, para isso foi utilizada a estrutura Biomod2 (Thuiller et al., 2009) para o ambiente de programação R (RStudio Team, 2015). O Biomod2 é um método SDMS que hospeda dez técnicas de modelagem amplamente utilizadas e que hoje, por sua precisão em modelar as espécies com distribuição localizada (Ledig et al., 2010; Ledig et al., 2012), estão na vanguarda da modelagem de distribuição de espécies (Araújo et al., 2005; Marmion et al., 2008; Roberts & Hamann 2012; Li & Wang 2013).

Para criar os modelos com o Biomod2 são necessários pontos de pseudo-ausências (PAs). Estes pontos são feitos para serem comparados com os dados de presença e ajudam a diferenciar as condições ambientais sob as quais uma espécie pode potencialmente ocorrer, se ocorrer a seleção ao longo de uma grande medida, o modelo tende a ser *overfit* porque o critério de seleção favorecerá um modelo que não consegue prever os habitats climaticamente

adequados para os quais a espécie não colonizou (Anderson & Raza 2010; Barbet-Massin et al., 2012). Assim, um estudo de maior extensão espacial pode levar à seleção de uma proporção mais elevada de pontos que tenham um fundo menos informativo (Barbet-Massin et al., 2012). De acordo com Merow et al. (2013), os PAs devem ser selecionados de acordo com o objetivo do estudo. Se o objetivo é descobrir áreas adequadas, os habitats desocupados poderiam ser informativos e incluídos como pontos de ausência. Neste caso, pretende-se determinar a extensão da ocorrência de *S. diamantinensis* em todo o Brasil oriental. Assim, um método comum constitui em criar pontos PAs de amostragem dentro de uma distância de um raio máximo de ocorrências conhecidas (Thuiller et al., 2009). No entanto, a seleção do parâmetro de distância máxima pode ser difícil escolher. Para determinar a distância máxima foi usada a equação proposta por Brown & Yoder (2015) que transforma as áreas mínimas do polígono convexo, a partir de todos os pontos de ocorrência, de modo que estes reflitam uma curva logística dos valores máximos de distância, variando entre 30 a 300 km. Assim, foram gerados aleatoriamente os pontos PAs em uma área de tamponamento com uma distância máxima de raio de 300 km, em torno de todos os registros da ocorrência da espécie.

A calibração do modelo foi realizada sobre uma amostra aleatória de dados (70%), e a avaliação do modelo foi efetuada com os restantes 30% (5 repetições) com o true skill statistic (TSS) (Allouche et al., 2006), a área sob a curva (AUC) do receiver operating characteristic (ROC) (Fielding & Bell, 1997) e Cohen's kappa statistic (Cohen, 1960). A variação do TSS está entre -1 a +1, onde +1 indica a concordância perfeita (Allouche et al., 2006). Em relação à AUC, os valores maiores que 0,8 indicam uma alta precisão modelo (Pearce & Ferrier 2000) e os valores de Kappa variam de -1 a +1, onde valores próximos de 1 indicam uma alta performance (Cohen, 1960).

Em seguida, foram selecionados os métodos que produziram um conjunto de modelos com o melhor desempenho em média, com base na pontuação AUC / ROC e de TSS. Para obter mais informações sobre a execução de cada algoritmo ver Thuiller et al. (2009).

Para obter os métodos SDMS com melhor desempenho foram selecionados os modelos com TSS com pontuações superiores a 0,85. Esses modelos foram projetados sobre a área de estudo, produzindo projeções contínuas que foram constrangidas para permanecerem dentro do intervalo dos valores atribuídos a priori (Elith et al., 2011), pela seleção da função clamp no Biomod2. Cada projeção do modelo com $TSS > 0,85$ foi transformada em presença / ausência (este limiar de corte foi definido com a finalidade de maximizar a sensibilidade e especificidade do modelo).

2.3.3 Análises

A distribuição potencial atual foi obtida pela soma dos mapas digitais com $TSS > 0,85$. Para cada um dos períodos passados um único mapa de consenso foi obtido pela soma de 80 mapas binários (16 modelos x 5 GCMs) para o Holoceno médio, 48 mapas binários (16 modelos x 3 GCMs) para o Último Máximo Glacial e 16 mapas binários (16 modelos x 1 GCMs) para o Último inter-glacial. A espécie foi considerada presente apenas nas células com valores de frequência de 50% ou mais nas projeções.

3. RESULTADOS

3.1 DIVERSIDADE GENÉTICA

3.1.1 Teste de saturação, Descritores da Variabilidade Genética e Composição das Sequências

As sequências utilizadas para o presente estudo possuem valores de Iss menores que os de Iss.c de acordo com o teste de Xia et al. (2003), o que indica baixa saturação e a possibilidade de utilização delas para estudos em filogenia e filogeografia (Figura 4 e 5).

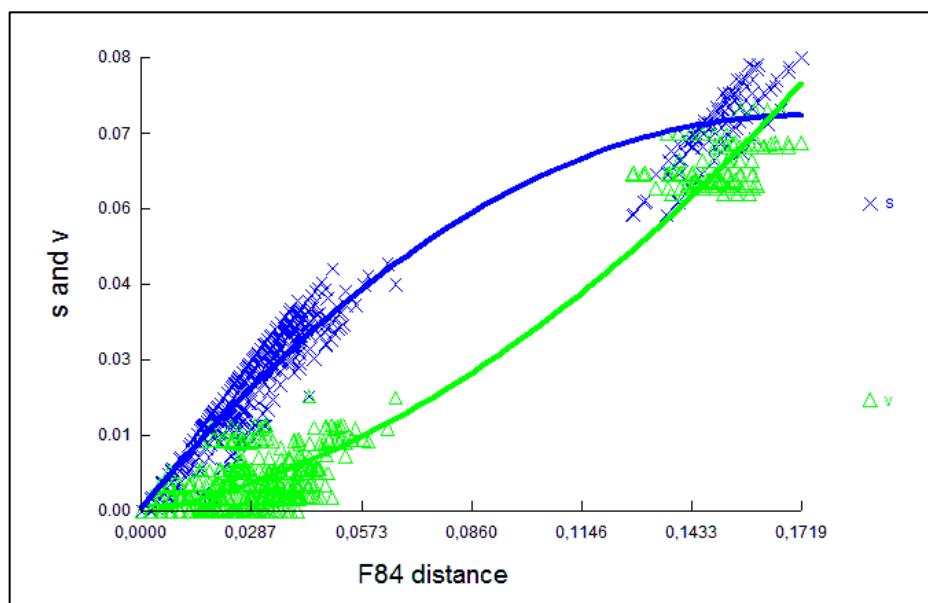


Figura 4. Teste de saturação para COI. As linhas sólidas mostram as frequências de transições (s, em azul) e transversões (v, em verde), em relação à distância genética (eixo x).

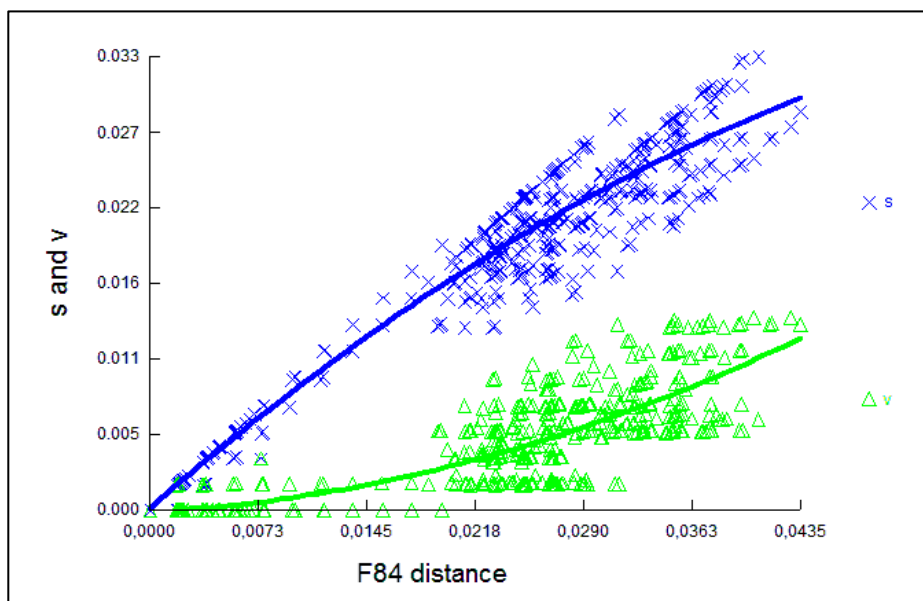


Figura 5. Teste de saturação para COII. As linhas mostram as frequências de transições (s, em azul) e transições (v, em verde) em relação à distância genética (eixo x).

3.1.2 Descritores de Variabilidade Genética

Em relação ao marcador COI, das 49 seqüências que abrangeram apenas a espécie *S. diamantinensis*, 368 sítios informativos foram obtidos, dos quais 41 são sítios polimórficos, acumulando 44 mutações e permitindo definir 21 haplótipos. A diversidade nucleotídica encontrada foi de 0,02506 e a diversidade haplotípica de 0,932. As frequências de bases nucleotídicas foram: C = 17,95%; T = 26,34%; A = 36,78%; G = 18,93%.

Das 53 sequencias para COII de *S. diamantinensis*, 399 sítios informativos foram obtidos, dos quais 42 são sítios polimórficos, acumulando 45 mutações e permitindo definir 25 haplótipos. A diversidade nucleotídica encontrada foi de 0,02299 e a diversidade haplotípica de 0,935. As frequências de bases nucleotídicas foram: C = 17,21%; T = 37,33%; A = 30,70%; G = 14,76%.

3.1.2 Distância par-a-par (p-distance)

Para o marcador COI, a média da distância par-a-par (Tabela 1) do grupo *S. diamantinesnis* foi de 0,029%. Grande parte dos valores de distância par-a-par intraespecíficos mantiveram-se abaixo de 0,030 para a maioria das duplas de sequências comparadas, com exceção dos indivíduos de Mucugê, Lençóis, Vale do Capão (BA) e Serra do Cipó (MG) que apresentaram médias dos valores de distância entre 0,030 e 0,045 quando comparados com indivíduos provenientes do Espírito Santo ou, quando comparados entre Mucugê e Lençóis vs. Vale do Capão e Serra do Cipó.

As distâncias par-a-par para COII (Tabela 2) mostraram no geral valores mais baixos que os apresentados para COI, contudo mantiveram o mesmo padrão, a média encontrada foi de 0,026%, os indivíduos de Mucugê, Lençóis, Vale do Capão (BA) e Serra do Cipó (MG) apresentaram médias dos valores de distância entre 0,030 e 0,038 quando comparados com indivíduos das populações do Espírito Santo e também quando comparados entre Mucugê e Lençóis vs. Vale do Capão e Serra do Cipó.

Entre as espécies os valores de distância genética foram maiores do que os valores observados dentro da espécie, mais de 12% de divergência. A espécie identificada a priori como *Simothraulopsis* sp. nov. 4 quando comparada a *S. diamantinensis* mostrou valores de distâncias muito parecido aos obtidos para a variação intraespecífica observada em *S. diamantinensis*.

Tabela 1. Distância par-a-par de COI entre as médias das distâncias genéticas dos indivíduos entre as populações de *Simothraulopsis diamantinensis*, entre as espécies *Simothraulopsis* sp. nov. 4 e *Simothraulopsis* sp. nov. 2.

	Cipó	Vale do Capão-BA	Norte-ES	Alegre-ES	Santa Teresa-ES	Lençóis-BA	Mucugê-BA	S. sp. nov. 4
Serra do Cipó-MG	-							
Vale do Capão-BA	0,012	-						
Norte-ES	0,031	0,036	-					
Alegre-ES	0,035	0,041	0,008	-				
Santa Teresa-ES	0,029	0,034	0,019	0,019	-			
Lençóis-BA	0,045	0,041	0,032	0,030	0,022	-		
Mucugê-BA	0,033	0,038	0,026	0,023	0,020	0,021	-	
S. sp. nov. 4	0034	0,039	0,018	0,018	0,018	0,034	0,028	-
S. sp. nov. 2	0,140	0,134	0,137	0,135	0,136	0,130	0,124	0,136

Tabela 2. Distância par-a-par de COII entre as médias das distâncias genéticas dos indivíduos entre as populações de *Simothraulopsis diamantinensis*, entre as espécies *Simothraulopsis* sp. nov. 4 e *Simothraulopsis* sp. nov. 2.

	Cipó	Vale do Capão-BA	Norte-ES	Alegre-ES	Santa Teresa-ES	Lençóis-BA	Mucugê-BA	S. sp. nov. 4
Serra do Cipó-MG								
Vale do Capão-BA	0,008							
Norte-ES	0,031	0,031						
Alegre	0,031	0,031	0,013					
Santa Teresa-ES	0,023	0,024	0,024	0,025				
Lençóis-BA	0,038	0,031	0,033	0,034	0,033			
Mucugê-BA	0,027	0,032	0,023	0,023	0,025	0,026		
S.sp.nov.4	0,031	0,032	0,017	0,018	0,024	0,034	0,023	
S. sp. nov. 2	0,126	0,126	0,120	0,126	0,118	0,119	0,128	0,120

3.2 ESTRUTURAÇÃO GEOGRÁFICA

3.2.1 Análise de Variância Molecular (AMOVA)

As análises de Variância Molecular, a partir das sequências do gene mitocondrial COI mostrou que o cenário C, que considera seis grupos em *S. diamantinensis*, apresentou a maior variação genética entre os grupos (43,45%) e menor entre as populações dentro dos grupos (12,07%) (Tabela 5). Para as hipóteses de agrupamento dos cenários A e B os valores encontrados entre os grupos foram iguais (20,23%) e apresentaram divergência intrapopulacional com 36,68% (Tabela 3 e 4) e para o cenário D, os valores entre os grupos foi igual a 29,39% e apresentou divergência populacional de 27,03% (Tabela 6), sendo assim descartados.

Tabela 3. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para COI de *Simothraulopsis diamantinensis*. Cenário A: Regiões.

Os grupos de populações foram: Espírito Santo, Bahia e Minas Gerais

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação
Entre os Grupos	2	248.019	4.22311 Va	20.23
Entre as populações dentro dos grupos	4	243.801	7.65609 Vb	36.68
Dentro do grupo	43	386.721	8.99350 Vc	43.09
TOTAL	49	878.540	20.87270	

Tabela 4. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para COI de *Simothraulopsis diamantinensis*. Cenário B: Regiões.

Os grupos de populações foram: Espírito Santo, Vale do Capão + Serra do Cipó e Mucugê + Lençóis

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação
Entre os Grupos	2	248.019	4.22311 Va	20.23
Entre as populações dentro dos grupos	4	243.801	7.65609 Vb	36.68
Dentro do grupo	43	386.721	8.99350 Vc	43.09
TOTAL	49	878.540	20.87270	

Tabela 5. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para COI de *Simothraulopsis diamantinensis*. Cenário C: Regiões.

Os grupos de populações foram: Norte do Espírito Santo, Santa Teresa, Alegre, Serra do Cipó + Vale do Capão, Mucugê e Lençóis

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação
Entre os Grupos	5	465.196	8.78445 Va	43.45
Entre as populações dentro dos grupos	1	26.624	2.44114 Vb	12.07
Dentro do grupo	43	386.721	8.99350 Vc	44.48
TOTAL	49	878.540	20.21909	

Tabela 6. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para COI de *Simothraulopsis diamantinensis*. Cenário D: Regiões.

Os grupos de populações foram: Norte do Espírito Santo + Alegre, Santa Teresa, Serra do Cipó + Vale do Capão, Mucugê e Lençóis

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação
Entre os Grupos	4	377.746	6.06523 Va	29.39
Entre as populações dentro dos grupos	2	114.074	5.57924 Vb	27.03
Dentro do grupo	43	386.721	8.99350 Vc	44.48
TOTAL	49	878.540	20.63797	

As análises de Variância Molecular, a partir das sequências do gene mitocondrial COII mostraram os mesmos cenários propostos para COI. O cenário C, que considera seis grupos em *S. diamantinensis*, apresentou a maior variação genética entre os grupos, com 43,45% e menor entre as populações dentro dos grupos com 12,07% (Tabela 9). Para as hipóteses de agrupamento dos cenários A e B, os valores encontrados entre os grupos foram de -1,56% e 20,23% e apresentaram divergência intrapopulacional com 55,60% e 36,68%, respectivamente (Tabela 7 e 8) e para o cenário D, os valores entre os grupos foi igual a 29,39% e apresentou divergência populacional de 27,03% (Tabela 10), sendo assim descartados.

Tabela 7. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para COII de *Simothraulopsis diamantinensis*. Cenário A: Regiões.

Os grupos de populações foram: Espírito Santo, Bahia e Minas Gerais.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação
Entre os Grupos	2	172.016	-0.30476 Va	-1.56
Entre as populações dentro dos grupos	4	319.804	10.88264 Vb	55.60
Dentro do grupo	43	386.721	8.99350 Vc	45.95
TOTAL	49	878.540	19.57138	

Tabela 8. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para COII de *Simothraulopsis diamantinensis*. Cenário B: Regiões.

Os grupos de populações foram: Espírito Santo, Vale do Capão + Serra do Cipó e Mucugê + Lençóis.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação
Entre os Grupos	2	248.019	4.22311 Va	20.23
Entre as populações dentro dos grupos	4	243.801	7.65609 Vb	36.68
Dentro do grupo	43	386.721	8.99350 Vc	43.09
TOTAL	49	878.540	20.87270	

Tabela 9. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para COII de *Simothraulopsis diamantinensis*. Cenário C: Regiões.

Os grupos de populações foram: Norte do Espírito Santo, Santa Teresa, Alegre, Serra do Cipó + Vale do Capão, Mucugê e Lençóis.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação
Entre os Grupos	5	465.196	8.78445 Va	43.45
Entre as populações dentro dos grupos	1	26.624	2.44114 Vb	12.07
Dentro do grupo	43	386.721	8.99350 Vc	44.48
TOTAL	49	878.540	20.21909	

Tabela 10. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para COII de *Simothraulopsis diamantinensis*. Cenário D:

Regiões. Os grupos de populações foram: Norte do Espírito Santo + Alegre, Santa Teresa, Serra do Cipó + Vale do Capão, Mucugê e Lençóis

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação
Entre os Grupos	4	377.746	6.06523 Va	29.39
Entre as populações dentro dos grupos	2	114.074	5.57924 Vb	27.03
Dentro do grupo	43	386.721	8.99350 Vc	44.48
TOTAL	49	878.540	20.63797	

3.2.2 Fluxo gênico

Para COI, os valores de F_{st} (Tabela 11) observados foram menores entre as populações do Espírito Santo, em que os valores foram: 0,28 (Alegre × Norte), 0,51 (Santa Teresa × Norte), 0,62

(Alegre × Santa Teresa). Entre as populações da Serra do Cipó (MG) e Vale do Capão (BA), o valor encontrado foi de 0,49, entre Santa Teresa (ES) e Serra do Cipó (MG) foi de 0,64 e entre Mucugê e Santa Teresa foi de 0,68. As demais comparações apresentaram valores elevados, variando de 0,71 (Norte do ES × Cipó) até 0,91 (Lençóis × Cipó e Lençóis × Mucugê).

Em COII, os valores de Fst (Tabela 12) apresentaram o mesmo padrão visto para COI. Os menores índices foram encontrados entre as populações do Espírito Santo, variando entre 0,28 a 0,68 e por fim, os maiores valores variaram de 0,71 a 0,91.

Tabela 11. Cálculo do Fluxo gênico para COI entre as populações de *Simothraulopsis diamantinensis* provenientes da Bahia (Vale do Capão, Lençóis e Mucugê), Minas Gerais (Serra do Cipó) e Espírito Santo (Santa Teresa, Alegre e Norte). Valores de F_{st} iguais ou acima de 0,7 foram destacados em cinza, indicando ausência de fluxo gênico entre as populações relacionadas.

	Cipó	Vale do Capão-BA	Norte-ES	Alegre-ES	Santa Teresa-ES	Lençóis-BA	Mucugê-BA
Serra do Cipó-MG							
Vale do Capão-BA	0,49718						
Norte-ES	0,71772	0,76085					
Alegre	0,80268	0,82800	0,28377				
Santa Teresa-ES	0,64727	0,70994	0,51030	0,62842			
Lençóis-BA	0,91463	0,90437	0,85556	0,89192	0,80702		
Mucugê-BA	0,82873	0,85019	0,74882	0,78300	0,68576	0,91396	

Tabela 12. Cálculo do Fluxo gênico para COII entre as populações de *Simothraulopsis diamantinensis* provenientes da Bahia (Vale do Capão, Lençóis e Mucugê), Minas Gerais (Serra do Cipó) e Espírito Santo (Santa Teresa, Alegre e Norte). Valores de Fst iguais ou acima de 0,7 foram destacados em cinza, indicando ausência de fluxo gênico entre as populações relacionadas.

	Cipó	Vale do Capão-BA	Norte-ES	Alegre-ES	Santa Teresa-ES	Lençóis-BA	Mucugê-BA
Serra do Cipó-MG							
Vale do Capão-BA	0,49718						
Norte-ES	0,71772	0,76259					
Alegre	0,80268	0,82800	0,28377				
Santa Teresa-ES	0,64727	0,70994	0,51030	0,62842			
Lençóis-BA	0,91463	0,90437	0,85556	0,89192	0,80702		
Mucugê-BA	0,82873	0,85019	0,74648	0,78084	0,91304	0,91304	

3.2.3 Rede de Haplótipos

Para a confecção da rede de haplótipos (Figura 6) foi utilizado o alinhamento de dados concatenados com 44 indivíduos de *S. diamantinensis*. Foram encontrados 27 haplótipos, dos quais seis não foram exclusivos a um indivíduo: (1) o haplótipo 4 foi o mais abundante, compartilhado por oito indivíduos provenientes do Vale do Capão (BA), (2) seguido do haplótipo 1, compartilhado por quatro indivíduos da Serra do Cipó (MG), (3) e o haplótipo 22, também compartilhado por quatro indivíduos originários de Lençóis (BA). Outros haplótipos foram menos frequentes: (4) haplótipo 26 encontrado em três indivíduos procedentes de Santa Teresa (ES), (5) haplótipo 8 compartilhado por dois indivíduos de Alegre e, por fim, (6) o haplótipo 15 resgatou dois indivíduos procedentes de Sooretama e Nova Venécia (ES). Os demais haplótipos ocorreram em apenas um indivíduo cada.

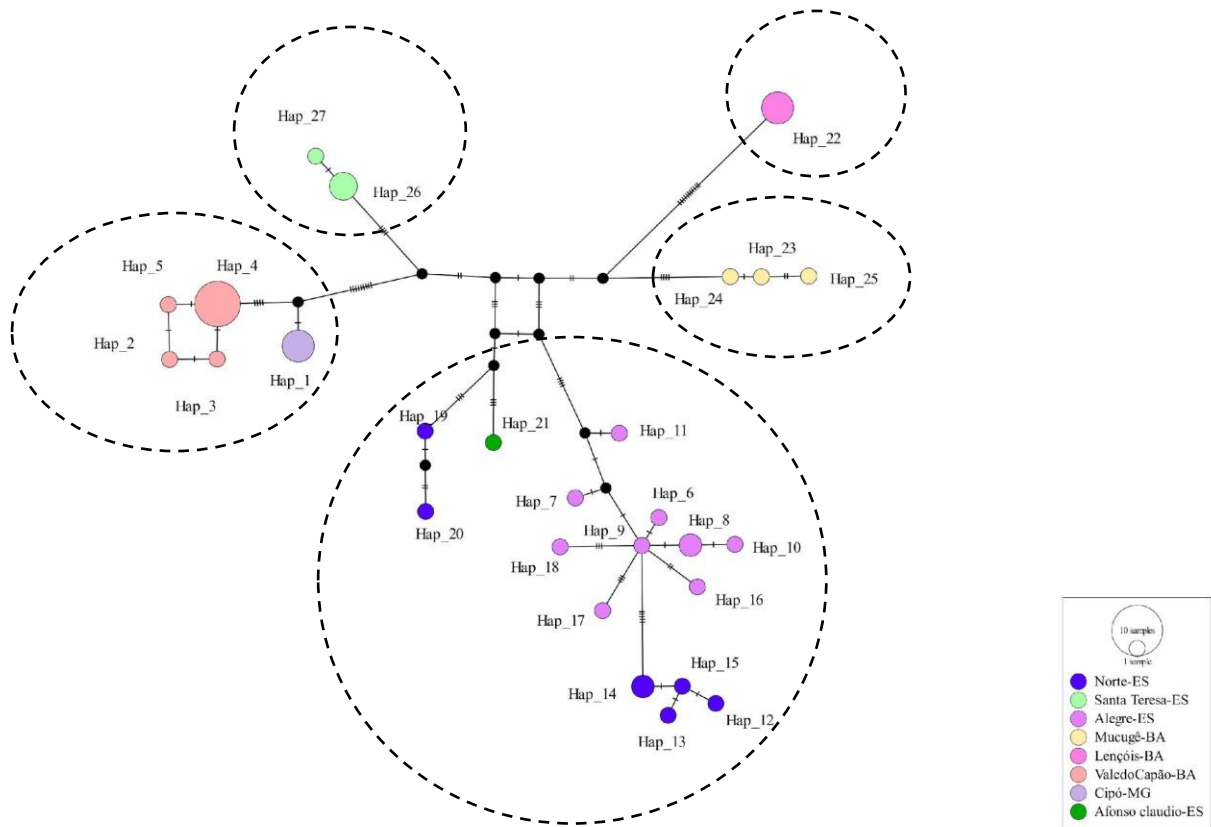


Figura 6. Rede de haplótipos *median-joining* com dados concatenados dos genes COI e COII de *Simothraulopsis diamantinensis*. Cada círculo colorido compreende um haplótipo e o seu tamanho é proporcional a sua frequência. Cada traço na linha que conecta os haplótipos representa um passo mutacional. A codificação dos haplótipos segue de acordo com o Apêndice 2.

3.3 HISTÓRIA DEMOGRÁFICA

3.3.1 Testes de neutralidade

Os testes de D de Tajima e Fs de Fu, visaram testar a aderência dos dados observados à teoria neutra da evolução molecular. Em relação aos cálculos obtidos a partir da matriz de sequências de COI (Tabela 13), as populações de Santa Teresa (ES), Alegre (ES) e Vale do Capão (MG) apresentaram valores negativos e significativos ($p < 0,05$) para os testes de D de Tajima. Entretanto, os resultados do teste Fs de Fu não revelaram nenhum valor significativo.

Os cálculos obtidos a partir da matriz de sequências de COII (Tabela 14) também apresentaram valores negativos e significativos ($p < 0,05$) para os testes de D de Tajima, abrangendo as mesmas populações (Santa Teresa, Alegre e Vale do Capão). Igualmente aos dados obtidos para COI, os resultados do teste Fs de Fu não revelaram valores significativos.

Tabela 13. Valores obtidos nos testes de neutralidade para as sequências de *Simothraulopsis diamantinensis* do gene mitocondrial COI e suas respectivas populações. Os valores significativos (p -valor $< 0,05$) foram destacados em cinza.

Grupos	N	D-Tajima (P-valor)	Fs de Fu (P-valor)
Serra do Cipó-MG	5	-0.95427 (0.23700)	5.79837 (0.97900)
Vale do Capão-BA	12	-2.00753 (0.01300)	15.37222 (1.00000)
Norte-ES	10	-0.54549 (0.30100)	4.00000 (0.95100)
Alegre	10	-1.77778 (0.02600)	6.74907 (0.99300)
Santa Teresa-ES	6	-1.64350 (0.00000)	4.23286 (0.96400)
Lençóis-BA	4	0.00000 (1.00000)	0.00000 (N.A)
Mucugê-BA	3	0.00000 (1.00000)	4.69033 (0.95100)

Tabela 14. Valores obtidos nos testes de neutralidade para as sequências de *Simothraulopsis diamantinensis* do gene mitocondrial COII e suas respectivas populações. Os valores significativos (p-valor < 0,05) foram destacados em cinza.

Grupos	N	D-Tajima (P-valor)	Fs de Fu (P-valor)
Serra do Cipó-MG	4	-0.95427 (0.22900)	5.79837 (0.98600)
Vale do Capão-BA	12	-2.00753 (0.00700)	15.37222 (1.00000)
Norte-ES	10	-0.54549 (0.29600)	4.00000 (0.95000)
Alegre	10	-1.77778 (0.02500)	6.74907 (0.99000)
Santa Teresa-ES	6	-1.64350 (0.00000)	4.23286 (0.96300)
Lençóis-BA	3	0.00000 (1.00000)	0.00000 (N.A)
Mucugê-BA	3	0.00000 (1.00000)	4.69033 (0.95700)

3.3.2 Árvore, tempo de divergência e modelagem da distribuição

A topologia recuperada por coalescência no BEAST (Figura 7) foi congruente com os grupos formados pela rede de haplótipos, agrupando em clados irmãos as populações de [Lençóis/BA + Mucugê/BA], [Santa Teresa/ES + (Vale do Capão/BA + Serra do Cipó/MG)], e por fim [(Norte/ES + (Alegre/ES) + (Afonso Cláudio/ES+S. sp. nov. 4)]. A maioria dos ramos na árvore apresentou alto suporte, contudo alguns valores baixos de probabilidade posterior foram encontrados nos ramos intermediários da filogenia. A datação dos tempos de divergência das populações pela coalescência estimada pelo BEAST revelou uma recente diversificação há 3.333 mil anos atrás (0.0033 mya).

As estimativas da variação do tamanho populacional (N_e) ao longo do tempo com base em todos os locus combinados pelo *Extended Bayesian Skiline Plot* (ESBP) evidenciaram expansão demográfica (Figura 8), datado entre oito a seis mil anos atrás.

As análises de modelagem da distribuição potencial atual são congruentes com a distribuição conhecida para *S. diamantinensis* (Figura 12). A projeção das áreas com adequabilidade para períodos passados mostra que durante o último interglacial (120 -140 mil anos atrás) a espécie possuía uma distribuição mais ampla, mais ao sul do território brasileiro (Figura 9) e posteriormente, durante o último máximo glacial (22 mil anos atrás), houve um

deslocamento no padrão de distribuição, que passa a ser visto mais ao norte (Figura 10). Por fim, a projeção de área com adequabilidade para seis mil anos atrás (Figura 11) demonstra uma forte contração, mostrando áreas de distribuição restrita, espaçadas e muito semelhantes às atuais.

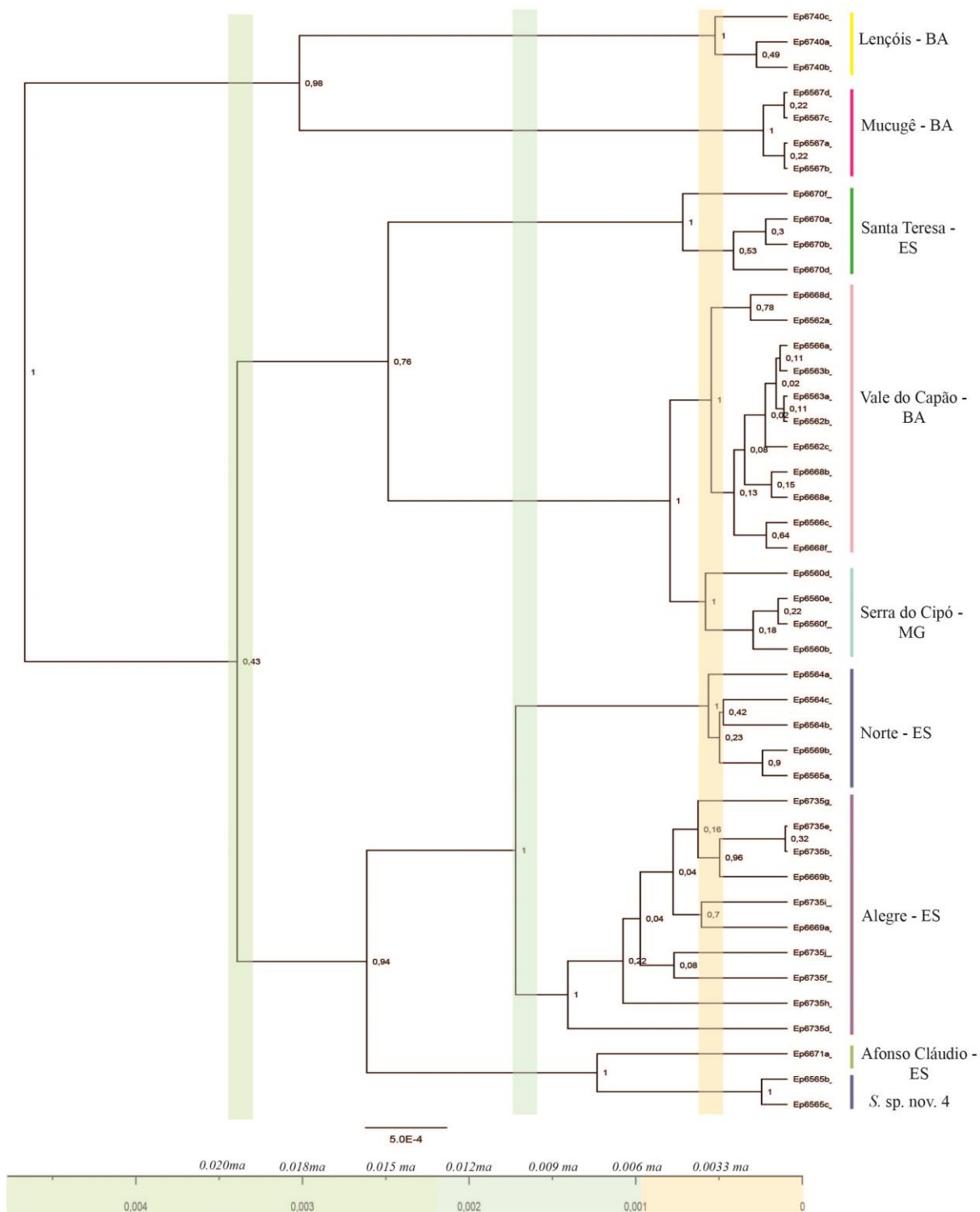


Figura 7. Topologia com os tempos de divergência das populações de *S. diamantinensis* gerada pelo BEAST. Os números presentes em cada nó são os valores de probabilidade posterior dos agrupamentos. As OTU's estão representadas pelos números tombos para cada indivíduo presente na Coleção Zoológica Norte Capixaba e as populações foram apresentadas na forma de barras com o mesmo padrão de cor apresentado na rede de haplótipos.

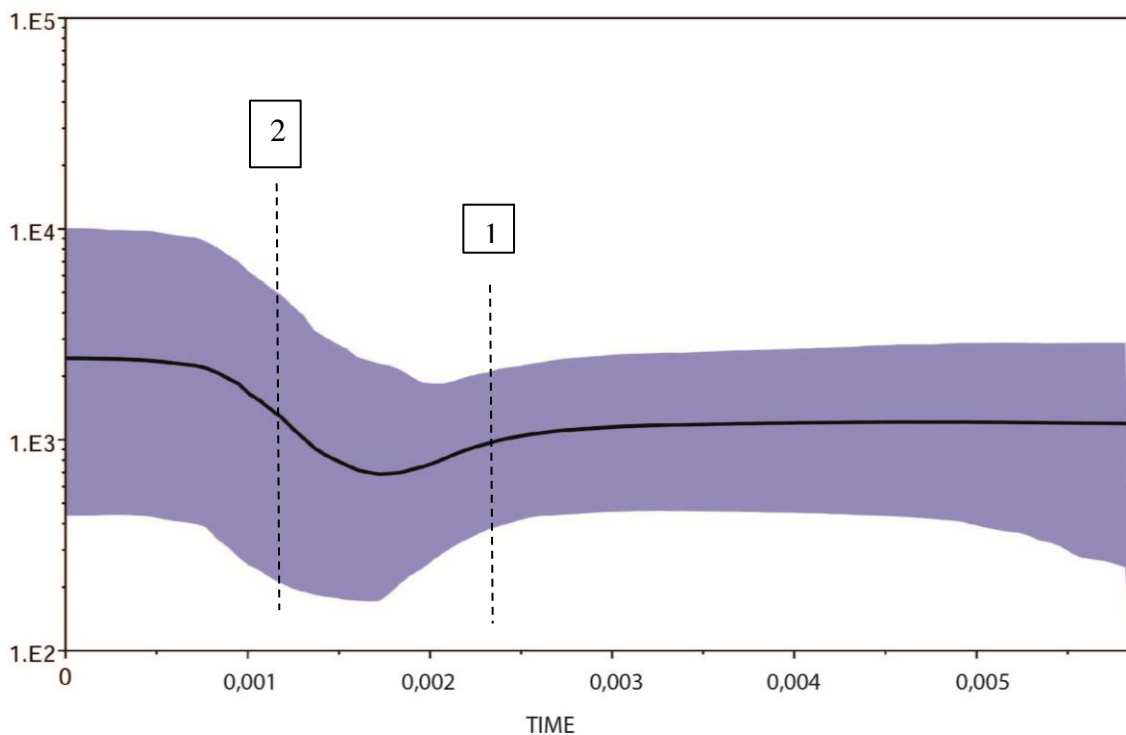


Figura 8. Resultado da *Extended Bayesian Skiline Plot* (EBSP). A escala temporal é lida da esquerda para a direita, em que o tempo presente é representado por 0 e o tempo passado segue as marcações seguintes. De tal modo 0,001 representa cerca de 6.000 mil anos atrás, 0,002 - 12.000 mil anos atrás, 0,003 - 18 mil anos atrás e assim por diante.

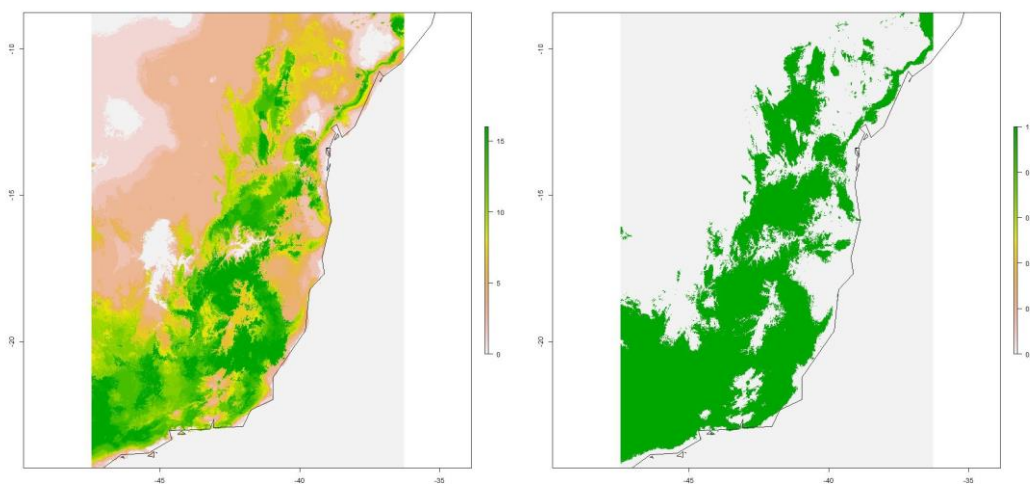


Figura 9. Projeção de área com adequabilidade - Último interglacial (120.000 – 140.000 anos atrás)

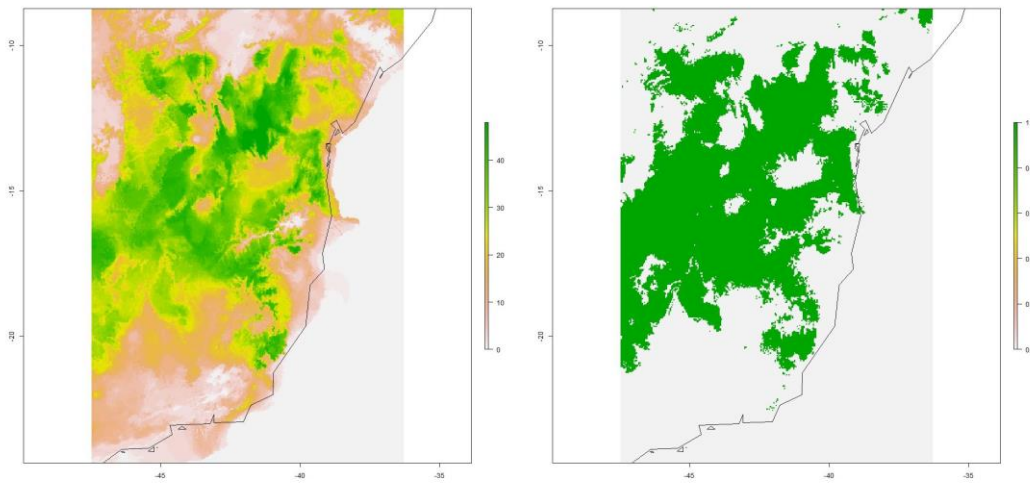


Figura 10. Projeção de área com adequabilidade – Último Máximo Glacial (22.000 anos atrás)

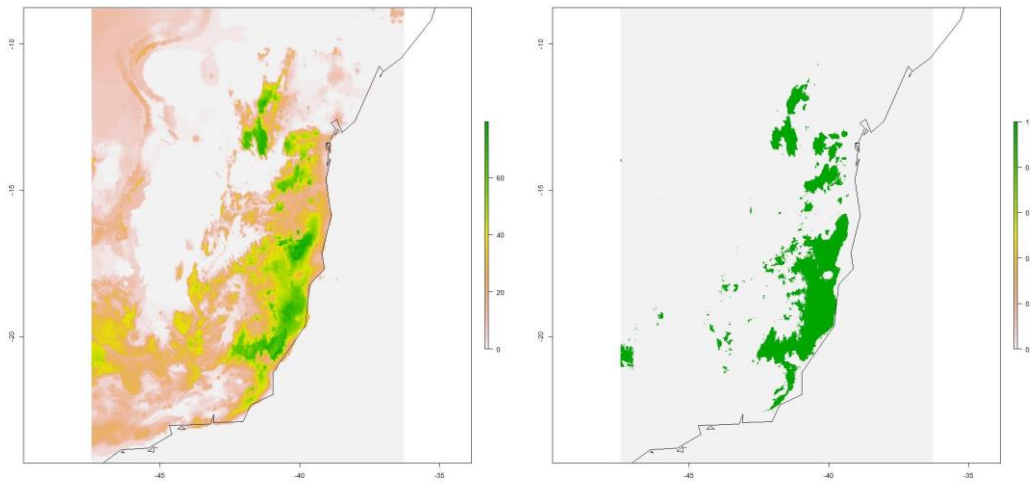


Figura 11. Projeção de área com adequabilidade – Holoceno médio (6.000 anos atrás)

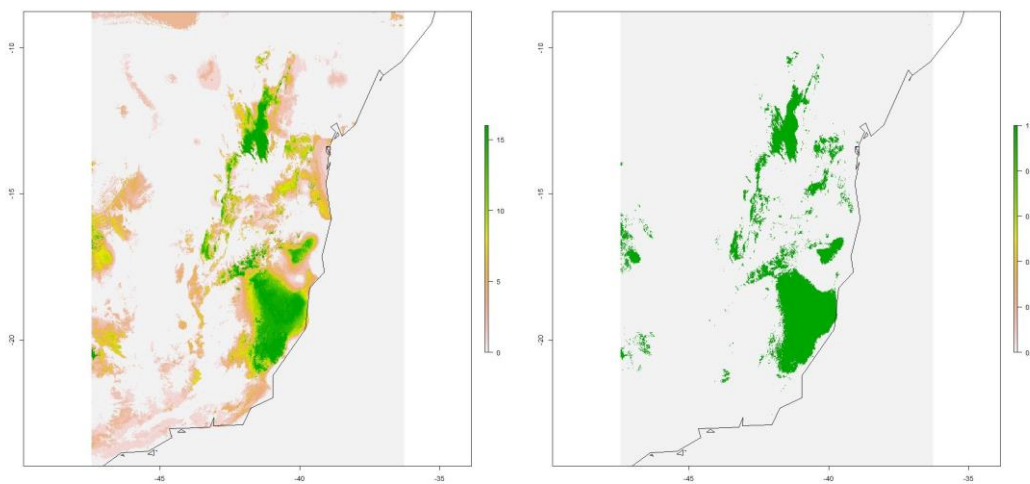


Figura 12. Projeção de área com adequabilidade atual

4. DISCUSSÃO

4.1 ESTRUTURA GENÉTICA E HISTÓRIA DEMOGRÁFICA

Para os dois marcadores mitocondriais COI e COII foram observados que os haplótipos iguais são compartilhados entre os indivíduos das mesmas localidades e não há haplótipos comuns compartilhados entre as populações de lugares diferentes, caracterizando uma alta variabilidade intra e interpopulacional. A alta diversidade haplotípica somada a uma baixa diversidade nucleotídica indica excesso de alelos raros e pode sugerir as seguintes hipóteses envolvidas na diversificação das populações: (i) que as populações sofreram uma divergência muito rápida, associada a uma expansão demográfica influenciada por eventos históricos recentes; e (ii) a ocorrência de um ou mais eventos de contração recente, seguido de uma expansão populacional, diversificação recente ou pressão seletiva.

As populações mostraram forte estruturação genética e este fato foi demonstrado pelos resultados encontrados na rede de haplótipos (*median-joining*), pelos altos valores de F_{st} e pela topologia resgatada pelo Beast. Olhando para estes resultados pode-se presumir que as barreiras físicas que existem entre as populações, os processos históricos as quais estas foram submetidas e as características biológicas intrínsecas desta espécie podem ter confluído e gerado o padrão genético observado entre elas.

Os haplótipos encontrados no Vale do Capão (BA) diferem em três passos mutacionais para aqueles provenientes da Serra do Cipó (MG), além disso foi observado que os indivíduos dessas populações mantêm fluxo gênico. Porém, o mesmo não ocorre quando comparamos a população da Serra do Cipó (MG) em relação à outra face baiana da Serra do Espinhaço (populações de Lençóis e Mucugê), que diferem-se em mais de 25 passos mutacionais e os valores de F_{st} foram extremamente altos, comprovando a ausência de fluxo gênico entre essas populações. Valores altos de F_{st} e de divergência genética também foram encontrados entre as vertentes leste e oeste da Chapada Diamantina [(Vale do Capão ×

Mucugê), (Vale do Capão × Lençóis)], bem como mostraram que não existe fluxo entre Mucugê (porção mais ao sul da Chapada Diamantina) e Lençóis (porção localizada mais ao norte da Chapada Diamantina), ambas na vertente leste.

A segregação existente entre a Chapada Diamantina e a porção mineira da cadeia do Espinhaço foi demonstrada em estudos prévios, como a existência de espécies de anfíbios distintas, próximas filogeneticamente e com distribuição disjunta entre as duas porções da Cadeia do Espinhaço (e.g. Lugli & Haddad, 2006a; Lugli & Haddad, 2006b). Estes trabalhos sugeriram a existência de uma conexão passada entre as porções norte e sul da cadeia e um posterior evento vicariante, que teria levado ao isolamento geográfico de populações ancestrais, seguido de eventos de uma especiação alopátrica. Rapini et al. (2008) observaram que a similaridade florística entre as áreas norte e sul do Espinhaço costuma ser surpreendentemente baixa, mesmo que em localidade vizinhas. Por outro lado, a comparação entre as vertentes leste e oeste da Chapada Diamantina são mais escassas na literatura, o único estudo encontrado que fez esta abordagem encontrou baixa similaridade florística entre as duas vertentes (Kamino et al., 2008).

Alcançando as terras mais ao sul e a leste da distribuição de *S. diamantinensis*, as análises de estrutura genética e demográfica revelaram que a população de Santa Teresa (ES) está mais próxima das regiões da Serra do Cipó (MG) e Vale do Capão (BA), do que as outras populações do Espírito Santo, este fato pode estar ligado às semelhanças entre as características físicas dos ambientes, principalmente àquelas relacionadas ao clima e altitude. Em geral observou que há fluxo gênico entre as três populações do Espírito Santo, sendo os valores de fluxo e divergência genética mais próximos entre as populações de Alegre e norte do ES.

Avaliando todos estes padrões de fluxo e de divergência genética compilados acima: Mucugê diferente de Lençóis, Vale do Capão diferente de Mucugê + Lençóis e Santa Teresa mais próxima de Vale do Capão + Cipó do que das outras duas populações do ES, pode-se

descartar a hipótese que existe relação entre as distâncias geográficas e genéticas, em outras palavras, a divergência genética observada entre as populações deste estudo não pode ser explicada pelo isolamento por distância.

A modelagem com projeção da distribuição atual mostrou um padrão muito parecido com o presente registro de coleta para a espécie, evidenciando uma distribuição disjunta. Entretanto, um contínuo pode ser observado entre a vertente oeste da Chapada Diamantina até a porção mineira da Cadeia do Espinhaço (Figura 12). Desta forma, é muito provável que com um esforço maior de coleta, encontre-se indivíduos de *S. diamantinensis* ao longo desse gradiente, o que explicaria melhor o fluxo gênico existente entre Vale do Capão, Serra do Cipó e Santa Teresa.

Além de todas as hipóteses aqui já citadas para explicar a estruturação das populações, a capacidade de dispersão limitada de *S. diamantinensis* parece ter influência e pode ter acentuado a divergência genética entre as populações, o que pode ser considerado um fator limitante já que esta é uma espécie altamente exigente, que vive em córregos de corredeira mais acentuada. No estudo de Rizzi (2016), que buscou explicar a estrutura filogeográfica de *Terpides sooretamae*, uma outra espécie de Leptophlebiidae que vive em cursos d'água de corrente fraca, percebe-se um padrão justamente ao contrário do encontrado aqui, onde as populações apresentaram na verdade um alto fluxo gênico, relacionados à uma alta capacidade de dispersão. Esse padrão de maior dispersão para indivíduos que passam a maior parte de sua vida em água parada é congruente com o estudo de Monaghan et al. (2005) e pode corroborar o fato de *S. diamantinensis* apresentar justamente um comportamento contrário, com baixa capacidade de dispersão.

As análises de modelagem de projeção da distribuição para períodos passados mostraram um resultado interessante: há cerca de 22 mil anos atrás as populações que estavam consolidadas mais ao sul deslocaram-se para regiões mais ao norte, o que coincide com o

Último Máximo Glacial, que teria provocado o deslocamento da espécie para áreas mais quentes. Posteriormente, entre os períodos de 12 a 6 mil anos atrás, a espécie teria passado por uma queda demográfica, seguida de uma expansão e posterior estabilização, todos estes eventos foram legitimados pelas análises de modelagem e ESBP. Já a topologia resgatada pelo Beast mostra que a primeira separação ocorreu entre as populações do leste da Chapada Diamantina (Mucugê + Lençóis) das demais populações, e foi seguida das separações entre Mucugê e Lençóis, e entre Santa Teresa + Vale do Capão + Cipó do Norte do ES + Alegre. A diversificação encontrada atualmente é recente, e foi datada para cerca 3.300 mil anos atrás.

O modelo paleogeográfico proposto por Carnaval e Moritz (2008), com base em modelagem ecológica de nicho prediz que durante o Último Máximo Glacial, a Mata Atlântica foi mais estável em sua porção central-norte, ao passo de que a parte sul foi bastante instável durante esse período. Tal cenário é corroborado pelas análises de projeção da distribuição passada para *S. diamantinensis*, porém, o sinal de expansão só é evidenciado pelo gráfico de ESBP e os resultados de F_s de F_u e D de Tajima não corroboraram com uma possível expansão populacional. Mesmo que as populações de Alegre, Santa Teresa e Vale do Capão tenham apresentado um valor de D de Tajima negativo e significativo, os valores de F_s de F_u que são mais acurados para determinar expansão populacional (Fu, 1997), não foram significativos.

Contudo, a história evolutiva de *S. diamantinensis* não deve ter sido linear, ou seja, pode ter ocorrido ao longo da história evolutiva marcos que coincidam eventos geológicos e climáticos influenciando a diversificação no mesmo tempo e espaço. Existe uma linha tênue em distingui-los e deve-se levar em consideração que assinaturas genéticas mais recentes, como a do Último Máximo Glacial, podem ter apagado eventos mais antigos as quais as populações foram submetidas e por este motivo não foi possível detectá-las.

4.2 DELIMITANDO ESPÉCIES EM *SIMOTHRAULOPSIS*

As hipóteses das relações interespecíficas apresentadas para o gênero até o momento mostraram que *Simothraulopsis* sp. nov. 2 é claramente uma espécie distinta, separando-se de *S. diamantinensis* e de *Simothraulopsis* sp. nov. 4 por valores altos de distâncias genéticas que variam de 12% a 14%, além disso, as diferenças morfológicas entre elas são numerosas, tanto quanto ao padrão de coloração, diferenças entre as genitálias dos machos e por fim, no ângulo das asas posteriores. Essas características são consideradas facilmente identificáveis, confiáveis e consistentes.

Embora *Simothraulopsis* sp. nov. 4 (que até o momento possui uma distribuição restrita para o norte do Espírito Santo) e *S. diamantinensis* tenham constituído clados irmãos de acordo com Nascimento (2014), as distâncias genéticas obtidas entre *Simothraulopsis* sp. nov. 4 e *S. diamantinensis* são muito baixas (cerca de 1%). Além disso, as mesmas distâncias genéticas são encontradas quando ambas são comparadas às demais populações. Desta forma, os dados sugerem que podem se tratar da mesma espécie. Não obstante, a diferença morfológica encontrada entre elas se dá por *Simothraulopsis* sp. nov. 4 possuir os lobos do pênis mais afastados entre si, quando comparados a *Simothraulopsis diamantinensis*. Levando em consideração todas as questões abordadas acima, essa característica pode se tratar apenas de uma variação morfológica entre os indivíduos de uma mesma espécie. No entanto, a pequena amostra, com apenas dois indivíduos utilizados nas análises do presente estudo não permitiram chegar a uma conclusão taxonômica robusta.

A definição de espécie para o presente trabalho resgatou o conceito filogenético e, portanto, os haplótipos foram tratados aqui como OTU's, a história evolutiva foi recuperada usando dois marcadores mitocondriais e por fim as premissas foram definidas e elaboradas a *posteriori*, após a reconstrução da árvore do Beast.

Neste cenário, *Simothraulopsis* sp. nov. 2 foi determinada como uma possível espécie válida que precisa ser descrita e, *Simothraulopsis* sp. nov. 4 possivelmente é uma sinonímia de *S. diamantinensis*. A pergunta que fica é: será que as populações de *S. diamantinensis* estariam em um processo de especiação? Os resultados sugerem que as populações de Mucugê e Lençóis da Chapada Diamantina estejam isoladas há muito tempo e que assim tenham acumulado diferenças genéticas significativas quando comparadas as demais populações, que variaram de 3% a 4%, valores estes que são considerados inclusive o limiar para separar espécies de insetos aquáticos, como apresentado no trabalho de Hebert et al. (2003).

O grande problema em definir novas espécies é que elas são como uma fotografia, estamos olhando para algo que parece estático, mas na verdade, por trás dela existiu e continua existindo um processo dinâmico, o qual não conseguimos enxergar plenamente. Mucugê e Lençóis ainda não apresentam características morfológicas robustas e consistentes que as caracterizem como novas espécies, mas diante do conceito filogenético, a segregação deste clado em relação aos demais, é a evidência suficiente para suportar essa hipótese.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allouche O, Omri A, Asaf T and Ronen K (2006). Assessing the accuracy of species distribution models: prevalence, kappa and the true skill statistic (TSS). *J Appl Ecol* 43:1223–1232.

Anderson RP and Ali R (2010). The effect of the extent of the study region on GIS models of species geographic distributions and estimates of niche evolution: preliminary tests with montane rodents (genus *Nephelomys*) in Venezuela. *J Biogeography* 37:1378–1393.

Avise J (1987). Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial-DNA Bridge Between Population Genetics And Systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 18:489–522.

Avise JC, Nelson WS, Bowen BW and Walker D (2000). Phylogeography of colonially nesting seabirds, with special reference to global matrilineal patterns in the sooty tern (*Sterna fuscata*). *Mol Ecol* 9:1783–1792.

Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37-48.

Barber-James HM, Jean-Luc G, Michel S and Hubbard MD (2008). Global diversity of mayflies (Ephemeroptera, Insecta) in freshwater. *Hydrobiologia* 595:339–350.

Barbet-Massin M, Morgane B-M, Frédéric J, Albert CH and Wilfried T (2012). Selecting pseudo-absences for species distribution models: how, where and how many? *Methods Ecol Evol* 3:327–338.

Batalha-Filho H, Henrique B-F, Waldschmidt AM, Campos LAO, Tavares MG and Fernandes-Salomão TM (2010). Phylogeography and historical demography of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie* 41:534–547.

Brown JH and Lomolino MV (2006). *Biogeografia*. Biogeografia. 2ª ed. Trad: Iulo Feliciano Afonso. Ribeirão Preto: FUNPEC Editora.

Brown JL and Yoder AD (2015). Shifting ranges and conservation challenges for lemurs in the face of climate change. *Ecol Evol* 5:1131–1142.

Bush GL, Case SM, Wilson AC and Patton JL (1977). Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:3942–3946.

Britain JE and Sartori M (2003). Ephemeroptera (Mayflies). *Encyclopedia of Insects*. California, Academic Press, an imprint of Elsevier Science pp 373-380.

Carnaval AC and Craig M (2008). Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *J Biogeogr* 35:1187–1201.

Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT e Moritz C (2009). Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science* 323:785–789.

Cohen J (1960). A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educ Psychol Meas* 20:37–46.

Cracraft J (1983). The significance of phylogenetic classifications for systematic and evolutionary biology. *In: Proceedings NATO Advanced Study Institute on Numerical Taxonomy* (Felsenstein, J. ed.), Springer-Verlag. pp 1–17

Derryberry EP, Claramunt S, Derryberry G, Chesser RT, Cracraft J, Aleixo A, Pérez-Emán J, Remsen JV Jr and Brumfield RT (2011). Lineage diversification and morphological evolution in a large-scale continental radiation: the neotropical ovenbirds and woodcreepers (aves: Furnariidae). *Evolution* 65:2973–2986.

Domínguez E, Peters WL, Peters JG and Savage HM (1997). The image of *Simothraulopsis Demoulin* with a redescription of the nymph (Ephemeroptera: Leptophlebiidae: Atalophlebiinae). *Aquatic Insects*, 19:141–150.

Domínguez E, Molineri C, Pescador ML; Hubbard DM and Nieto C (2006). Ephemeroptera of South America. *Aquatic Biodiversity of Latin America (ABLA Series)*. Sofia-Moscow.

Domínguez E, Eduardo D and del Carmen Zúñiga M (2009). First description of the larva of *Farrodes roundsi* (Traver) (Ephemeroptera: Leptophlebiidae: Atalophlebiinae) with comments on its phylogenetic relationships. *Aquat Insects* 31:73–81.

Drummond AJ, Rambaut A (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7:214.

Edmunds GF (1972). Biogeography and Evolution of Ephemeroptera. *Annu Rev Entomol* 17:21–42.

Elith J, Jane E, Phillips SJ, Trevor H, Miroslav D, Chee YE and Yates CJ (2010). A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions* 17:43–57.

Emerson E (2001). *Challenging Behavior. Analysis and intervention in people with severe intellectual disabilities*. Second Edition. Cambridge University Press.

Endler JA (1977). Geographic variation, speciation, and clines. *Monogr Popul Biol* 10:1–246.

Excoffier L, Smouse P and Quattro J (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131:479-491.

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005). ARLEQUIN ver. 3.0: an integrated software package for population genetics analysis. *Evol Bioinf Online* 1:47–50

Farrell BD (2001). Evolutionary assembly of the milkweed fauna: Cytochrome oxidase I and the age of *Tetraopes* beetles. *Molecular Phylog and Evol* 18:467–478.

Fielding AH and Bell JF (1997). A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. *Environ Conserv* 24:38–49.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R and Vrijenhoek R (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology & Biotechnology*. 3:294-297.

Fu YX (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915–925.

Fu YX and Li WH (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*. 133: 693-709.

Gauld ID and Wahl DB (2002). The Eucerotinae: a Gondwanan origin for a cosmopolitan group of Ichneumonidae? *J Nat Hist* 36:2229–2248.

Godunko RJ, Sroka P, Soldán T and Bojková J (2015). The higher phylogeny of Leptophlebiidae (Insecta: Ephemeroptera), with description of a new species of *Calliarcys* Eaton, 1881. *Arthrop System and Phylogeny* 73(2):259–279.

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

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL and Waard JR (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270, 313–321.

Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG and Andy J (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int J Climatol* 25:1965–1978.

Holsinger KE and Weir BS (2009). Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting *F_{ST}*. *Nat Rev Genet* 10:639–650.

Hoorn C, Wesselingh FP, ter Steege H, Bermudez MA, Mora A, Sevink J, Sanmartín I, Sanchez-Meseguer A, Anderson CL and Figueiredo JP (2010). Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* 330:927–931.

Introduction to R and RStudio (2015). Using R and RStudio for Data Management, Statistical Analysis, and Graphics, Second Edition. pp 211–236

Johanson KA (1998). Phylogenetic and Biogeographic Analysis of the Family Helicopsychidae (Insecta: Trichoptera).

Justi SA, Galvão C and Schrago CG (2016). Geological Changes of the Americas and their Influence on the Diversification of the Neotropical Kissing Bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *PLoS Negl Trop Dis* 10:e0004527.

Kamino LHY, Oliveira-Filho AT, Stehmann JR (2008). Relações florísticas entre as fitofisionomias florestais da Cadeia do Espinhaço, Brasil. *Megadiversidade* 4:39–49.

Kimura M (1968). Genetic variability maintained in a finite population due to mutational production of neutral and nearly neutral isoalleles. *Genet Res* 11:247–269.

Kingman JFC (1982). The coalescent. *Stochastic Process Appl* 13:235–248.

Kluge NJ (2015). Contribution to the knowledge of Terpidinae Kluge 2009 (Ephemeroptera: Leptophlebiidae). *Zootaxa* 3999:151–189.

Knecht RJ, Engel MS and Benner JS (2011). Late Carboniferous paleoichnology reveals the oldest full-body impression of a flying insect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:6515–6519.

Kukalova-Peck J and Jarmila K-P (1978). Origin and evolution of insect wings and their relation to metamorphosis, as documented by the fossil record. *J Morphol* 156:53–125.

Ledig FT, Rehfeldt GE, Sáenz-Romero C and Flores-López C (2010). Projections of suitable habitat for rare species under global warming scenarios. *Am J Bot* 97:970–987.

Ledig FT and Thomas Ledig F (2012). Climate Change and Conservation. *Acta Silvatica et Lignaria Hungarica*. doi: 10.2478/v10303-012-0005-4

Leite YLR, Costa LP, Loss AC, Rocha RG, Batalha-Filho H, Bastos AC, Quaresma VS, Fagundes V, Paresque R, Passamani M et al. (2016). Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:1008–1013.

Lessa EP, Cook JA and Patton JL (2003). Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the late Quaternary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 100: 10331-10334.

Lugli L, Luciana L and Haddad CFB (2006a). New Species of *Bokermannohyla* (Anura, Hylidae) from Central Bahia, Brazil. *J Herpetol* 40:7–15.

Lugli L, Luciana L and Haddad CFB (2006b). A new species of the *Bokermannohyla pseudopseudis* group from Central Bahia, Brazil (Amphibia, Hylidae) *J Herpetol* 62:453–465.

- Mariano R (2010). Two new species of *Simothraulopsis* Traver, 1947 (Ephemeroptera: Leptophlebiidae: Atalphebiinae) from northeastern Brazil. *Aquatic Insects*, 32:129–134.
- Martins F and Domingues MV (2011). *Filogeografia. Revista da Biologia* 7:26–30.
- Mayr E (1942). *Systematics and the Origin of Species, from the Viewpoint of a Zoologist*. Harvard University Press.
- Mayr E (1963). *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- McCafferty WP (1998). Ephemeroptera and the Great American Interchange. *J North Am Benthol Soc* 17:1–20.
- McCafferty WP (1990). Toward a phylogenetic classification of the Ephemeroptera (Insecta): a commentary on systematics. *Annals of the Entom Society of America* 84:343–360.
- McCafferty WP (1997). Ephemeroptera and the great American interchange. *Journal of the North American Benthological Society* 17:1–20.
- Merow C, Cory M, Smith MJ and Silander JA (2013). A practical guide to MaxEnt for modeling species' distributions: what it does, and why inputs and settings matter. *Ecography* 36:1058–1069.
- Mittermeier R, Bowles I and Konstant W (1998). Biodiversity hotspots revealed. *People Planet* 7:10–15.
- Monaghan MT, Gattolliat J-L, Sartori M, Elouard J-M, James H, Derleth P, Glaizot O, de Moor F and Vogler AP (2005). Trans-oceanic and endemic origins of the small minnow mayflies (Ephemeroptera, Baetidae) of Madagascar. *Proc Biol Sci* 272:1829–1836.

Montoya-Burgos JI (2003). Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Mol Ecol* 12:1855–1867.

Nascimento J (2014). Sistemática de *Simothraulopsis* Demoulin, 1966 (Ephemeroptera: Leptophlebiidae: Atalophlebiinae).

Nordborg M (2001). Coalescent Theory. *Handbook of Statistical Genetics*. pp 843–877

Ogden TH, Heath Ogden T and Whiting MF (2005). Phylogeny of Ephemeroptera (mayflies) based on molecular evidence. *Mol Phylogenet Evol* 37:625–643.

Papadopoulou A, Anastasiou I, Vogler AP (2010). Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: The Mid-Aegean Trench Calibration. – *Mol Bio and Evol* 27: 1659 –1672.

Paresque R (2010). Diversificação das espécies do gênero *Oligoryzomys* Bangs, 1900 (Rodentia, cricetidae) na região neotropical.

Pearce J, Ferrier S and Scotts D (2001). An evaluation of the predictive performance of distributional models for flora and fauna in north-east New South Wales. *J Environ Manage* 62:171–184.

Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Waite AN, Mariana M, Yassuda YY and Sites JW (2005). Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. *Biol J Linn Soc Lond* 85:13–26.

Pennington RT, Lavin M, Prado DE, Pendry CA, Pell SK and Butterworth CA (2004). Historical climate change and speciation: neotropical seasonally dry forest plants show patterns of both tertiary and quaternary diversification. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359:515–537.

Pereira-da-Conceicao LL, Price BJ, Barber-James HM, Barker NP, Moor FC and Villet MH (2012). Cryptic variation in an ecological indicator organism: mitochondrial and nuclear DNA sequence data confirm distinct lineages of *Baetis harrisoni* Barnard (Ephemeroptera: Baetidae) in southern Africa. *BMC Evol Biology*, 12(26):1471-2148.

Rand DM and Kann LM (1998) Mutation and selection at silent and replacement sites in the evolution of animal mitochondrial DNA. *Contemporary Issues in Genetics and Evolution*. pp 393–407

Rapini A, Ribeiro PL, Lambert S e Pirani JC (2008). A Flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4: 16–24.

Ribas CC, Moyle RG, Miyaki CY and Cracraft J (2007). The assembly of montane biotas: linking Andean tectonics and climatic oscillations to independent regimes of diversification in Pionus parrots. *Proc Biol Sci* 274:2399–2408.

Ridley M (2006). *Evolução*. 3a. ed. Porto Alegre: ArtMed Editora

Rizzi, EA (2016). Filogeografia de de *Terpides sooretamae* Boldrini & Salles (Ephemeroptera: Leptophlebiidae).

Rutschmann S, Sereina R, Jean-Luc G, Hughes SJ, Marcos B, Michel S and Monaghan MT (2014). Evolution and island endemism of morphologically cryptic *Baetis* and *Cloeon* species (Ephemeroptera, Baetidae) on the Canary Islands and Madeira. *Freshw Biol* 59:2516–2527.

Sanmartín I and Ronquist F (2004). Southern hemisphere biogeography inferred by event-based models: plant versus animal patterns. *Syst Biol* 53:216–243.

Sartori M Brittain JE (2015). Order Ephemeroptera. In: Thorp and Covich's *Freshwater Invertebrates* 873–891.

Sartori M and Michel S (2005). A new species of the genus *Paramaka* Savage & Dominguez, 1992 with some comments on related genera (Ephemeroptera, Leptophlebiidae, Atalophlebiinae). *Stud Neotrop Fauna Environ* 40:237–245.

Savage HM (1987). Biogeographic classification of the Neotropical Leptophlebiidae (Ephemeroptera) based upon geological centers of ancestral origin and ecology. *Stud Neotrop Fauna Environ* 22:199–222.

Schluter D (2001). Parallel speciation with allopatry. *Trends Ecol Evol* 16:283–284.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H and Flook P (1994). Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Ann. Entomol. Soc. Am* 87(6):651-701.

Simpson GG (1951). The Species Concept. *Evolution* 5:285.

Simpson BB, Haffer J (1978). Speciation patterns in the Amazonian forest biota. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 9:49-518.

Tajima F (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.

Takiya DM, Tran PL, Dietrich CH, Moran NA (2006). Co-cladogenesis spanning three phyla: leafhoppers (Insecta: Hemiptera: Cicadellidae) and their dual bacterial symbionts. *Molecular Ecology* 15:4175–4191.

Trautwein MD, Wiegmann BM, Beutel R, Kjer KM and Yeates DK (2012). Advances in insect phylogeny at the dawn of the postgenomic era. *Annu Rev Entomol* 57:449–468.

Thomas JA, Trueman JWH, Rambaut A and Welch JJ (2012). Relaxed Phylogenetics and the Palaeoptera Problem: Resolving Deep Ancestral Splits in the Insect Phylogeny. *Syst Biol* 62:285–297.

Thuiller W, Wilfried T, Bruno L, Robin E and Araújo MB (2009). BIOMOD - a platform for ensemble forecasting of species distributions. *Ecography* 32:369–373.

Vane-Wright RI, de Jong R. (2003). Butterflies of Sulawesi: Annotated checklist for a critical island fauna. *Zool Verh Leiden* 343:1–267.

Vanzolini P; Williams EE (1970). South American anoles: geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arq. Zool. São Paulo*, 19:1-298.

Vuataz L, Sartori M, Gattolliat J-L and Monaghan MT (2013). Endemism and diversification in freshwater insects of Madagascar revealed by coalescent and phylogenetic analysis of museum and field collections. *Mol Phylogenet Evol* 66:979–991.

Wiley EO (1981). Remarks on Willis' Species Concept. *Syst Biol* 30:86–87.

Wilkins JS (2011). The Species Problem: A Philosophical Analysis. *Systematic biology* 61: 362–363.

Wright S (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 28:114–138.

Xia X, Xie Z, Salemi M, Chen L and Wang Y (2003). An index of substitution saturation and its application. *Mol Phylogenet Evol* 26:1–7.

Xia X, Lemey P (2009). Assessing substitution saturation with DAMBE, 615-630. In Lemey P, Salemi M, Vandamme AM (Eds.) *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*. Cambridge University Press, Cambridge.

Zakharov E, Evgueni Z, Michael C and Felix S (2004). Molecular Phylogeny, Historical Biogeography, and Divergence Time Estimates for Swallowtail Butterflies of the Genus *Papilio* (Lepidoptera: Papilionidae). *Syst Biol* 53:193–215.

APÊNDICE 1

Lista dos espécimes utilizados no presente estudo, incluindo informações das espécies amostradas, o número de indivíduos, a localidade de procedência bem como suas coordenadas geográficas e o número tombo.

Espécie	N	Localidade	Latitude	Longitude	Coleção	Nº tombo
<i>S. diamantinensis</i>	4	Rio São José, Sooretama –ES	S 19° 07' 33.1"	W 40° 14' 26.1"	CZNC	Ep-6564 a, b, c / Ep6565 a
<i>S. diamantinensis</i>	1	Rio Cricaré, São Mateus –ES	S 18° 39' 2.2"	W 40 °7' 23.4"	CZNC	Ep-6041
<i>S. diamantinensis</i>	2	Rio Cricaré, Nova Venécia –ES	S 18°39' 51.4"	W 40° 30' 44.9"	CZNC	Ep-6569 a, b
<i>S. diamantinensis</i>	10	Cachoeira do Firmino, Alegre –ES	S 20° 37' 11.40"	W 41° 37' 33.40"	CZNC	Ep-6669 a, b / Ep-6735 a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k
<i>S. diamantinensis</i>	3	REBIO Augusto Ruschi, Santa Teresa –ES	S 19° 52' 31.70"	W 40° 31' 47.30"	CZNC	Ep-6742 a, b, c
<i>S. diamantinensis</i>	6	Pinguela, Santa Teresa –ES	S 19° 52' 16"	W 40° 31' 43.10"	CZNC	Ep-6670 a, b, c, d, e, f
<i>S. diamantinensis</i>	1	Cachoeira do Funil, Afonso Claudio –ES	S 20° 8' 35.10"	W 41° 9' 2.0"	CZNC	Ep-6671 c
<i>S. diamantinensis</i>	4	Córrego das Pedras, Serra do Cipó –MG	S 19° 12' 17"	W 43° 36' 2.20"	CZNC	Ep-6560 b, c, d, e, f
<i>S. diamantinensis</i>	8	Rio Grande, Vale do Capão, Chapada Diamantina –BA	S 12° 55' 11.85"	W 41° 55' 98.60"	CZNC	Ep-6562 a, b, c / Ep-6668 a, b, c, d, e, f
<i>S. diamantinensis</i>	2	Riachinho, Vale do Capão, Chapada Diamantina –BA	S 12° 57' 22.70"	W 41° 51' 45.95"	CZNC	Ep-6563 a, b
<i>S. diamantinensis</i>	4	Rio Mucugêzinho, Lençóis, Chapada Diamantina –BA	S 12° 27' 6.38"	W 41° 25' 2.05"	CZNC	Ep-6567 a, b, c, d
<i>S. diamantinensis</i>	3	Córrego do Tirbutino, Mucugê, Chapada Diamantina –BA	S 12° 59' 43.25"	W 41° 20' 49.19"	CZNC	Ep-6740 a, b, c
<i>S. diamantinensis</i>	2	REBIO 2 Bocas, Cariacica –ES	S 20° 15' 28.50"	W 40 29' 38.30"	CZNC	Ep-4674 b, d
<i>S. sp. nov. 4</i>	2	Rio São José, Sooretama –ES	S 19° 07' 33.1"	W 40° 14' 26.1"	CZNC	Ep-6565 b, c
<i>S. sp. nov 2</i>	9	Rio Cricaré, Nova Venécia –ES	S 18°39' 51.4"	W 40° 30' 44.9"	CZNC	Ep-5971 (a, b) / Ep-5972 (a, b, c, e) / Ep-6032 /Ep-6034
<i>S. sp. nov 2</i>	1	Rio Cricaré, São Mateus –ES	S 18° 39' 2.2"	W 40 °7' 23.4"	CZNC	Ep-6040

APÊNDICE 2

Lista dos haplótipos para as sequências concatenadas de *S. diamantinensis*. Os indivíduos estão representados pelo seu respectivo número tomo e seguidos de suas localidades.

Haplótipo	N	Nº Tombo	Localidade
Haplótipo 1	4	Ep6560b / Ep6560d / Ep6560e / Ep6560f	Serra do Cipó
Haplótipo 2	1	Ep6562a	Vale do Capão
Haplótipo 3	1	Ep6566c	Vale do Capão
Haplótipo 4	8	Ep6562b / Ep6668b / Ep6668f / Ep6668e / Ep6566a / Ep6562c / Ep6563a / Ep6563b	Vale do Capão
Haplótipo 5	1	Ep6668d	Vale do Capão
Haplótipo 6	1	Ep6735f	Alegre
Haplótipo 7	1	Ep6735i	Alegre
Haplótipo 8	2	Ep6735e / Ep6669b	Alegre
Haplótipo 9	1	Ep6735g	Alegre
Haplótipo 10	1	Ep6735b	Alegre
Haplótipo 11	1	Ep6669a	Alegre
Haplótipo 12	1	Ep6564a	Sooretama
Haplótipo 13	1	Ep6564b	Sooretama
Haplótipo 14	1	Ep6564c	Sooretama
Haplótipo 15	2	Ep6565a / Ep6569b'	Sooretama / Nova Venécia
Haplótipo 16	1	Ep6735h	Alegre
Haplótipo 17	1	Ep6735d	Alegre
Haplótipo 18	1	Ep6735j	Alegre
Haplótipo 19	1	Ep6565b	Sooretama

Haplótipos	N	Nº Tombo	Localidade
Haplótipo 20	1	Ep6565c	Sooretama
Haplótipo 21	1	Ep6671a	Afonso Claudio
Haplótipo 22	4	Ep6567a / Ep6567b / Ep6567c / Ep6567d	Lençóis
Haplótipo 23	1	Ep6740a	Mucugê
Haplótipo 24	1	Ep6740b	Mucugê
Haplótipo 25	1	Ep6740c	Mucugê
Haplótipo 26	3	Ep6670b / Ep6670d / Ep6670a	Santa Teresa
Haplótipo 27	1	Ep6670f	Santa Teresa