
Marilena da Silva Peixoto

**Estudos sobre as relações filogenéticas e biogeográficas
de espécies do gênero *Pimelodella* (Siluriformes,
Heptapteridae) Eigenmann & Eigenmann, 1888 do Alto
Paraná**

**Studies on the phylogenetic and biogeographical
relationships of species of the genus *Pimelodella*
(Siluriformes, Heptapteridae) Eigenmann & Eigenmann,
1888 Alto Paraná**

São Paulo

2011

Marilena da Silva Peixoto

**Estudos sobre as relações filogenéticas e biogeográficas
das espécies do gênero *Pimelodella* (Siluriformes,
Heptapteridae) Eigenmann & Eigenmann, 1888 do Alto
Paraná**

**Studies on the phylogenetic and biogeographical
relationships of species of the genus *Pimelodella*
(Siluriformes, Heptapteridae) Eigenmann & Eigenmann,
1888 Alto Parana**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo para obtenção de título de
Doutor em Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientadora: Dra. Lurdes Foresti de Almeida Toledo.
Co-orientador: Dr. Flávio Alicino Bockmann

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica

Peixoto, Marilena da Silva

Estudos sobre as relações biogeográficas das espécies do gênero *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae) Eigenmann & Eigenmann, 1888 do Alto Paraná.
XXXp

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. *Pimelodella* 2. DNA Barcode 3. DNA mitocondrial 4. Microsatélites

I. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Lurdes Foresti de Almeida Toledo

Orientadora

**"E assim, depois de muito esperar, num dia como outro qualquer, decidi triunfar...
Decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesmo buscá-las.
Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar uma solução.
Decidi ver cada deserto como uma possibilidade de encontrar um oásis.
Decidi ver cada noite como um mistério a resolver.
Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz.
Naquele dia descobri que meu único rival não era mais que minhas próprias
limitações e que enfrentá-las era a única e melhor forma de as superar.
Naquele dia, descobri que eu não era o melhor e que talvez eu nunca tivesse sido.
Deixei de me importar com quem ganha ou perde.
Agora me importa simplesmente saber melhor o que fazer.
Aprendi que o difícil não é chegar lá em cima, e sim deixar de subir.
Aprendi que o melhor triunfo é poder chamar alguém de "amigo".
Descobri que o amor é mais que um simples estado de enamoramento, "o amor é
uma filosofia de vida".
Naquele dia, deixei de ser um reflexo dos meus escassos triunfos passados e passei a
ser uma tênue luz no presente.
Aprendi que de nada serve ser luz se não iluminar o caminho dos demais.
Naquele dia, decidi trocar tantas coisas...
Naquele dia, aprendi que os sonhos existem para tornar-se realidade.**

**E desde aquele dia já não durmo para descansar... simplesmente durmo para
sonhar.”**

Walt Disney

**Dedico esta tese à minha amada família,
em especial ao meu noivo Victor.**

Agradecimentos

Quero agradecer a todos que de forma direta ou indireta colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Lurdes Foresti de Almeida Toledo por todo incentivo, dedicação, amizade e principalmente por toda a confiança que depositou em mim.

Ao meu co-orientador Flávio Alicino Bockmann pela ajuda fundamental para a continuidade deste trabalho. Obrigada por todo apoio e palavras de incentivo, foi muito bom ter te conhecido.

À Daniela Calcagnotto, por todo empenho para me ajudar com as análises. Sempre prestativa, me apoiou e me ensinou muita coisa. Obrigada por tudo.

Ao professor Cláudio Oliveira por ter me recebido tão bem e por ter auxiliado no trabalho com a doação de algumas amostras.

A todos os meus amigos do laboratório e do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. Obrigada por todos os momentos agradáveis e por fazerem parte da minha vida.

Em especial gostaria de agradecer aos meus amigos Felipe, Riviane, Juliana, Ricardo, Anita, Rodrigo, a todos que fazem tão especial a nossa convivência. Peço desculpas se esqueci de alguém.

Aos amigos que já concluíram seus trabalhos no laboratório Sabrina, Keila, Ana, Raquel, Caroline, Bianca, Vânia, foi muito bom conviver com vocês.

Quero expressar aqui meus sinceros agradecimentos ao Carlos, um amigo que nunca mediu esforços para auxiliar a todos durante todo o trabalho. Obrigada por todas as coletas, risadas, por todo empenho para me ajudar e por ser esse amigo tão especial.

Aos amigos que fazem parte de outros laboratórios Christiane, Alayne, Andressa, Lilian, Larissa, Naila, Nane, Antonia, Adam, Márcia, Danilo, Juliana, são tantos amigos que fiz durante esses anos... Obrigada a todos.

Márcia Pincerati, obrigada por toda companhia, desde a entrevista de ingresso, até

a fase tão difícil de conclusão da tese.

Aos amigos que fiz em Ribeirão Preto. Foi ótimo ter conhecido você, obrigada por toda ajuda nas análises, em especial obrigada Verônica e Flávia.

À Luci pelo apoio técnico no sequenciamento das amostras e que sem querer se tornou minha amiga.

Aos meus amigos que não fazem parte do “mundo acadêmico”, Ana, Raquel, Luzia, Pedro, e a todos os meus amigos do fretado,

À minha família, cujo apoio, estímulo e carinho possibilitaram a realização deste trabalho. Mesmo longe, nunca me esqueço de vocês. Mãe, espero que você esteja orgulhosa de mim, sinto muito a sua falta!!!

À família do meu noivo, que me acolheu como filha e sempre esteve ao meu lado. Vocês são pessoas especiais.

Ao meu amado noivo Victor, pelo amor, amizade, carinho, incentivo, ajuda e por estar sempre ao meu lado. Minha vida se transformou depois que te encontrei, você faz cada dia especial. Muito obrigada por fazer parte da minha vida!

Ao Instituto de Biociências da USP e Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, pela estrutura oferecida para o desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP pela bolsa concedida durante o doutorado.

Sumário

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	vi
Introdução Geral.....	01
Ordem Siluriformes.....	01
Família Heptapteridae.....	02
Gênero <i>Pimelodella</i>	04
Abordagens morfológicas e moleculares.....	08
O DNA mitocondrial e nuclear.....	10
A Bacia do Paraná.....	13
Objetivos.....	19
Capítulo 2: Identificação das espécies de <i>Pimelodella</i> através do código de barras de DNA e caracteres morfológicos.....	20
Resumo.....	21
Introdução.....	22
Materiais e métodos.....	24
Resultados e discussão.....	29
Considerações finais.....	81
Capítulo 3: Análise filogenética do gênero <i>Pimelodella</i> por sequenciamento do DNA mitocondrial.....	88
Resumo.....	89
Introdução.....	90
Materiais e métodos.....	94
Resultados e discussão.....	99
Referências Bibliográficas.....	106

Lista de Figuras

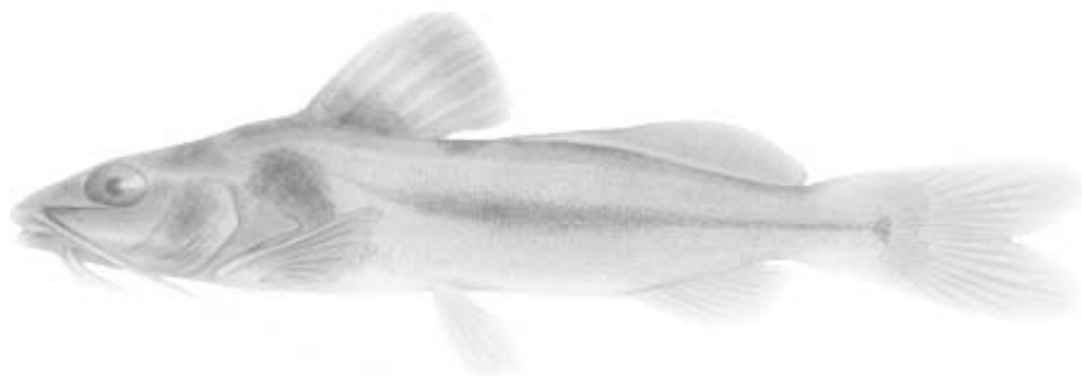
Figura 1.1: Exemplar de <i>Pimelodella avanhandavae</i> . Fonte: foto de Ivan Sazima no site www.planetcatfish.com	04
Figura 1.2: Dendograma de seis espécies de Pimelodidae obtido pelo índice de Jaccard e pelo método de UPGMA (Almeida & Sodré, 2002).....	10
Figura 1.3: Mapa do Brasil Em destaque a Bacia do Paraná. Fonte: Quantum GIS 1.6.0-Capiapo.....	15
Figura 1.4: Mapa com a região da cidade de Guararema em destaque, onde é possível notar a trajetória do rio Paraíba. Fonte: Google Earth.....	17
Figura 2.1: Pontos de coleta marcados no mapa do Brasil. Fonte: Quantum GIS 1.6.0-Capiapo.....	26
Figura 2.2: Árvore Filogenética construída a partir do sequenciamento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I.....	30
Figura 2.3: Distribuição dos valores de distância intra e interespecífica das espécies estudadas de <i>Pimelodella</i>	35
Figura 2.4: Gráficos para <i>P. transitoria</i> em comparação com <i>P. lateristriga</i>	53
Figura 2.5: Gráficos para <i>P. transitoria</i> em comparação com <i>P. kronei</i> e <i>P. lateristriga</i>	56
Figura 2.6: Gráficos para <i>P. gracilis</i> em comparação com <i>P. avanhandavae</i>	58
Figura 2.7: Gráficos para <i>P. gracilis</i> (Paranapanema e Pardo).....	60
Figura 2.8: Gráficos para <i>P. gracilis</i> (Paranapanema, Pardo e Mogi).....	62
Figura 2.9: Gráficos para <i>P. gracilis</i> (Pardo e Mogi).....	64
Figura 2.10: Gráficos para <i>P. gracilis</i> (Turvo).....	67
Figura 2.11: Gráficos para <i>P. gracilis</i> (Mogi).....	69
Figura 2.12: A - <i>Pimelodella australis</i> LIRP0424; B - <i>Pimelodella lateristriga</i> LIRP6839, vista lateral.....	83
Figura 2.13: A - <i>Pimelodella transitoria</i> ; B - <i>Pimelodella kronei</i> , vista lateral.....	84
Figura 2.14: A - <i>Pimelodella gracilis</i> LIRP2926; B - <i>Pimelodella avanhandavae</i> LIRP6955, vista lateral.....	85
Figura 2.15: A - <i>Pimelodella spelaea</i> MZUSP817266; B - <i>Pimelodella laurenti</i> LIRP4258, vista lateral.....	86

Figura 2.16: A – <i>Pimelodella</i> sp nova (Amazonas); B – <i>Pimelodella mucosa</i> LIRP0710; vista lateral.....	87
Figura 3.1: Pontos de coleta marcados no mapa do Brasil. Fonte: Quantum GIS 1.6.0-Capiapo.....	96
Figura 3.2: Árvore filogenética mais parcimoniosa com base na análise simultânea dos quatro genes mitocondriais.....	101
Figura 3.3: Gráfico mostrando a frequência de transições (s) e transversões (v) versus a divergência das seqüências utilizando o modelo Tamura-Nei (1993), para os todos os genes concatenados.....	103

Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Estudos citogenéticos realizados em <i>Pimelodella</i>	07
Tabela 2.1: Espécies identificadas e informações sobre os pontos de coleta e nº de tombo.....	25
Tabela 2.2: Distâncias genéticas Kimura 2 Parametros entre espécies do gênero <i>Pimelodella</i>	36
Tabela 2.3: Estados de caracteres de 64 posições de nucleotídeos do gene Cox1 para nove espécies de <i>Pimelodella</i>	38
Tabela 2.4: Dados morfométricos de <i>P. lateristriga</i>	72
Tabela 2.5: Dados morfométricos de <i>P. australis</i>	73
Tabela 2.6: Dados morfométricos de <i>P. transitória</i>	74
Tabela 2.7: Dados morfométricos de <i>P. kronei</i>	75
Tabela 2.8: Dados morfométricos de <i>P. avanhandavae</i>	76
Tabela 2.9: Dados morfométricos de <i>P. laurenti</i>	77
Tabela 2.10: Dados morfométricos de <i>P. gracilis</i>	78
Tabela 2.11: Dados morfométricos de <i>P. mucosa</i>	79
Tabela 2.11: Dados morfométricos de <i>Pimelodella</i> sp. n.....	80
Tabela 3.1: Locais de coletas das espécies e suas respectivas coordenadas geográficas.....	95
Tabela 3.2: Programas utilizados para a amplificação dos genes mitocondriais	97
Tabela 3.3: <i>Primers</i> utilizados para a amplificação do genoma mitocondrial, suas seqüências e referências bibliográficas.....	98
Tabela 3.4: Comprimento das seqüências obtidas, número de sítios invariáveis, número de sítios variáveis não informativos e informativos para a parcimônia, taxas de transição e transversão (Ti/Tv) e frequência de bases para os táxons estudados.....	100
Tabela 3.5: Valor absoluto de contribuição de cada um dos genes para todos os ramos.....	102

Resumo
e
Abstract



Resumo

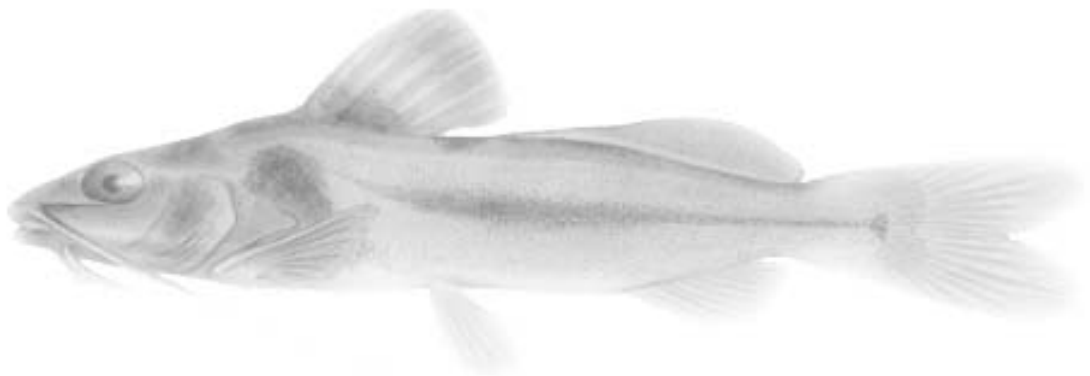
Pimelodella Eigenmann & Eigenmann, 1888 é um dos gêneros mais especiosos pertencentes à família Heptapteridae, com 71 espécies distribuídas desde o sul da América do Sul até o Panamá e América Central. A compreensão das relações filogenéticas desse grupo é ainda bastante confusa devido a dificuldades na identificação das espécies por suas semelhanças morfológicas, além da sua ampla diversidade e distribuição. Para melhor entendermos as relações existentes entre as espécies pertencentes a este gênero, nosso trabalho utilizou abordagens moleculares e morfológicas e foi organizado em quatro capítulos. No primeiro é apresentada uma breve revisão da bibliografia relacionada à *Pimelodella*, a área de estudo e as ferramentas que foram utilizadas para tentarmos compreender as relações filogenéticas e biogeográficas das espécies pertencentes ao gênero. Assim, para respondermos às questões propostas, no segundo capítulo avaliamos o potencial do método do código de barras do DNA para auxiliar na identificação das espécies, combinado com a análise de alguns caracteres morfológicos diagnósticos. Essas metodologias se mostraram muito úteis e eficazes, e nossos resultados indicam que é possível identificar grande parte das espécies com as metodologias escolhidas. O terceiro capítulo teve como objetivo estabelecer, as relações filogenéticas entre as espécies de *Pimelodella* incluídas nesse estudo, utilizando para tanto quatro genes mitocondriais (ATPase 6 e 8, citocromo b, COI e ND2). Através da análise de parcimônia foram obtidas seis árvores mais parcimoniosas. Os valores de suporte foram maiores nos nós mais internos.

Abstract

Pimelodella Eigenmann & Eigenmann, 1888 is one of the most specious genus of the Siluriform family Heptapteridae, with 71 species distributed from southern South America to Panamá and Central America. The understanding of phylogenetic relationships within the genus is somewhat confusing due to the difficulties in morphological identification and its broad distribution. In order to assess the problems with species identification and phylogenetic relationships our work employed morphological and molecular tools is it is organized in four chapters. The first chapter contains an introduction to the problems and a revision of what is known in *Pimelodella*, as well as a brief description of the tools used. The second chapter deals with species identification and its subdivided into: morphology and the used of DNA barcoding. The results obtained with the combination of these two methodologies indicated, for example, that *Pimelodella gracilis* might comprise more than one species. The third chapter presents a phylogenetic analysis of the species included in this work based on nucleotide sequences of the mitochondrial genome. The parsimony analysis recovered six most parsimonious trees as expected the support values are larger towards the deeper nodes.

Capítulo 1

Introdução Geral e Objetivos



Introdução Geral

Ordem Siluriformes:

Os peixes representam o grupo mais diversificado e um dos mais interessantes para estudos da genética e de evolução entre os vertebrados (NELSON, 2006). Nos últimos anos, novas espécies estão sendo descritas aumentando as estimativas da diversidade de espécies da ictiofauna de água doce Neotropical. Esses levantamentos indicam que a diversidade de espécies é maior do que as relatadas anteriormente. Calcula-se, desse modo, que a fauna de peixes de água doce das Américas do Sul e Central chegue atualmente a um total de 8000 espécies, representando 25% de toda a diversidade da fauna de peixes mundial, tanto marinha quanto de água doce (MALABARBA, 1998).

Os Siluriformes, popularmente conhecidos como bagres, cascudos, mandis, peixe-gato, são os peixes mais amplamente distribuídos dentro da Superordem Ostariophysi. A ordem é composta por 38 famílias, aproximadamente 485 gêneros e cerca de 2800 espécies (NELSON, 2006). A maior diversidade de bagres ocorre em regiões tropicais, especialmente América do Sul, África sub-Saara e sudeste da Ásia (MALABARBA, 1998).

Os Siluriformes Neotropicais compreendem oito grupos monofiléticos: Diplomystidae, Cetopsidae, Loricaridae, Doradeidae, Aspredinidae, Pimelodidae, Heptapteridae e Pseudopimelodidae (MALABARBA, 1998).

Duas famílias incluem representantes marinhos: Ariidae e Plotosidae (LOWE-MCCONNEL, 1975) embora muitos sejam de água doce. Dentro das famílias Auchenipteridae, Aspredinidae e Pangassiidae algumas espécies são adaptadas à vida em ambientes estuarinos ou apresentam certa tolerância a ambientes marinhos (de PINNA, 1998).

Os Siluriformes podem ser facilmente identificados morfológicamente: corpo nu, envolto por pele espessa, a qual pode estar total ou parcialmente coberta por placas ósseas (BRITSKI et al., 1988); nadadeiras raiadas e bem separadas, sendo que o primeiro raio das nadadeiras dorsal e peitoral

apresenta um acúleo forte e pungente; nadadeira adiposa encontra-se presente e é, em geral, bem desenvolvida, e a nadadeira caudal assume formato variável; presença, geralmente, de três pares de barbilhões sensitivos (MEES, 1974). As espécies desta ordem possuem em sua maioria hábitos sedentários, habitando o fundo dos rios e escondendo-se por entre as pedras e vegetação (BRITSKI, 1981). Sua atividade é predominantemente crepuscular ou noturna, quando saem à procura de alimento, utilizando-se para isso o olfato. Sua alimentação é constituída principalmente por vermes e insetos (STERBA, 1973).

Devido à dificuldade de identificação das espécies por suas semelhanças morfológicas, ainda é muito confusa as relações filogenéticas desse grupo. Outro fator que dificulta o estudo do grupo é a ampla diversidade e distribuição. Hipóteses filogenéticas propostas por Hardman (2005) com base em dados morfológicos e através do seqüenciamento do gene mitocondrial citocromo b para 170 espécies de 29 famílias das 38 existentes, corroboraram o monofiletismo da ordem. Sullivan et al. (2006) através do estudo utilizando os genes nucleares *rag1* e *rag2* confirmaram o monofiletismo de Siluriformes, apesar de os clados representados por algumas famílias terem sido recuperados em posições diferentes. Desse modo, a utilização de outras metodologias é necessária para um melhor entendimento das relações intra-familiares.

Família Heptapteridae:

Lundberg et al. (1991a, 1991b) e de Pinna (1998) verificaram a ocorrência de três grupos monofiléticos dentro de Pimelodidae, correspondendo às subfamílias Pimelodinae, Heptapterinae (Rhamdiinae) e Pseudopimelodinae. Esses grupos foram elevados à categoria de família (NELSON, 2006; FERRARIS, 2007).

A família Heptapteridae é endêmica da região Neotropical, sendo um dos principais componentes da ordem Siluriformes nos rios da América do Sul e Central incluindo peixes de pequeno a médio porte, que dificilmente ultrapassam 20 cm de comprimento. Os membros dessa família apresentam

registros de distribuição desde o México até o sul da Argentina (BOCKMANN & GUAZZELLI, 2003). Alguns gêneros desta família, por exemplo, *Pimelodella* e *Rhamdia* parecem estar entre os Siluriformes de água doce mais comuns da América do Sul, apesar disso, a sua biologia ainda é pouco conhecida (MALABARBA, 1998).

Alguns gêneros de heptapterídeos são exclusivos de fundo, outros não como o gênero *Pimelodella*, cujos componentes fazem incursões frequentes na coluna de água. Na sua maioria apresentam hábitos crípticos e o período de maior atividade ocorre durante o crepúsculo e à noite; durante o dia geralmente procuram refúgio em espaços entre pedras, na folhagem e na vegetação marginal ou, até mesmo escondem-se sob a areia. Geralmente são solitários, embora haja registros de que os espécimes dos gêneros *Brachyrhamdia* e *Pimelodella* tendem a se organizar em pequenos grupos (BOCKMANN, 1998).

Após revisões taxonômicas (de Pinna, 1998; Bockmann, 1998), a família Heptapteridae passou a ser composta por 31 gêneros: *Acentronichthys*, *Brachyglanis*, *Brachyrhamdia*, *Caecorhamdella*, *Caecorhamdia*, *Cetopsorhamdia*, *Chasmocranus*, *Gladioglanis*, *Goeldiella*, *Heptapterus*, *Horiomyzon*, *Imparales*, *Imparfinis*, *Leptoryrhamdia*, *Mastiglanis*, *Medemichthys*, *Myoglanis*, *Nannoglanis*, *Nannorhamdia*, *Nemuroglanis*, *Pariolius*, *Phreatobius*, *Phenacorhamdia*, *Pimelodella*, *Rhamdella*, *Rhamdia*, *Rhamdioglanis*, *Rhamdiopsis*, *Taunayia* e *Typholobagrus*. Destes gêneros, apenas dois, *Gladioglanis* (LUNDBERG et al., 1991) e *Mastiglanis* (BOCKMANN, 1994) foram cladisticamente diagnosticados e os demais foram estabelecidos por combinações de caracteres, geralmente da morfologia externa (BOCKMANN, 1998).

Em sua tese de doutorado, Bockmann (1998), utilizou 278 caracteres morfológicos em uma análise cladística para testar o monofiletismo de Heptapteridae que foi corroborado por 17 caracteres. Com base nestes dados o autor propôs a subdivisão de Heptapteridae em duas tribos: Phreatobiini (gêneros *Phreatobius*, *Gladioglanis* e os demais gêneros que possuem os músculos *adductor mandibulae* hipertrofiados) e Heptapteriinae (que inclui

os outros gêneros e a maior parte das espécies de pequeno porte). Bockmann (1998) também demonstrou que os gêneros *Brachyrhamdia*, *Caecorhamdella*, *Caecorhamdia*, *Imperales*, *Medemichthys*, *Nannorhamdia*, *Pimelonotus* e *Trophlobagrus*, eram, na verdade, sinônimas de outros gêneros da família, como *Rhamdia*, *Pimelodella* e *Imparfinis*.

Segundo o mesmo autor, os registros fósseis da família Heptapteridae são escassos, restritos a fragmentos dos raios espinhosos das nadadeiras dorsal e peitorais oriundos do Cenozóico da Província de Buenos Aires, na Argentina.

Gênero *Pimelodella*:

Pimelodella (Eigenmann & Eigenmann, 1888) é um dos gêneros mais especiosos pertencentes à família Heptapteridae, com 71 espécies distribuídas desde o sul da América do Sul até o Panamá e América Central.

Este peixe de pequeno porte (tamanho médio 12 cm) facilmente encontrado em córregos estreitos com vegetação abundante é popularmente conhecido como “mandi-chorão” devido aos sons que emite durante sua captura. De hábitos noturnos, o “mandi-chorão” é onívoro e possui o primeiro raio das nadadeiras peitorais e dorsais modificado na forma de acúleo pungente, o qual pode provocar ferimentos dolorosos.



Figura 1.1: Exemplar de *Pimelodella avanhandavae*. Fonte: foto de Ivan Sazima no site www.planetcatfish.com.

A última revisão do gênero foi a de Eigenmann em 1917 quando o autor publicou duas chaves de identificação, uma para as espécies Cis-Andinas e outra para as espécies Trans-Andinas de *Pimelodella*. Além disso, Eigenmann descreveu 34 espécies incluindo dados de distribuição, referência e descrição de alguns caracteres.

Desde então, novas espécies foram descritas, tornando-se necessária uma nova revisão da taxonomia do grupo. Guazzelli (1997) revisou a taxonomia de espécies de *Pimelodella* da região costeira do sul e sudeste do Brasil: *P. laticeps australis*, *P. pappenheimi*, *P. ignobilis*, *P. transitoria*, *P. kronei*, *P. brasiliensis*, *P. hartii*, *P. enochi*, *P. lateristriga* e *P. pectinifera*., apresentando uma chave de identificação destas espécies e descrevendo caracteres que podem auxiliar na elucidação das relações filogenéticas do gênero.

Até os dias atuais pouco foi feito em relação à caracterização das espécies de *Pimelodella*. Entre os fatores responsáveis por essa dificuldade podemos citar: sua ampla distribuição, o que dificulta a obtenção de um número amostral satisfatório; dificuldades para encontrar caracteres diagnósticos eficazes para a determinação das espécies; poucas publicações relacionadas ao gênero, entre outras. O uso de marcadores moleculares pode ser útil como ferramenta para elucidar relações filogenéticas, auxiliar na identificação das espécies, em estudos de conservação, enfim, são inúmeras suas aplicações e quando associados a outras abordagens, tornam o estudo mais informativo e interessante.

Estudos realizados em *Pimelodella*:

Os primeiros estudos citogenéticos no Brasil envolvendo o gênero *Pimelodella* foram desenvolvidos por Toledo & Ferrari (1976) evidenciando um número cromossômico $2n=46$. Estudos recentes realizados neste gênero têm demonstrado extensiva variabilidade cariotípica apesar da quantidade ainda limitada de informações citogenéticas disponíveis (Tabela 1). Algumas

análises mostraram que o número diplóide desse gênero pode variar de 46 a 58 cromossomos, sendo que $2n=46$ é o número diplóide mais frequentemente encontrado. A presença de um micro-cromossomo supranumerário foi já descrita em um espécime de *Pimelodella* da caverna Areias no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR), indicando a provável ocorrência de cromossomos B no gênero (ALMEIDA-TOLEDO et al., 1992).

Novas técnicas para complementar os estudos citogenéticos têm sido utilizadas e, entre elas, destaca-se a hibridação *in situ* com sondas de DNA ribossômico 18S e 5S. Vidotto et al. (2004) e Swarça et al. (2003), utilizaram sondas de rDNA 18S em estudos com populações de *Pimelodella meeki* e *Pimelodella* aff. *avanhandavae*, respectivamente. Os resultados obtidos em ambos os trabalhos evidenciaram a coincidência entre as marcações obtidas pelo uso desta sonda e pelas técnicas de impregnação por nitrato de prata e de coloração por Cromomicina A₃. Até o momento, não foi ainda utilizada a sonda de rDNA 5S em *Pimelodella*.

Em peixes é rara a ocorrência de sistemas cromossômicos sexuais diferenciados. A maioria dos relatos sobre a presença de cromossomos sexuais em Siluriformes foi registrada na família Loricariidae (CENTOFANTE et al., 2006). O único caso já descrito em Heptapteridae de diferenciação cromossômica envolvendo sexo foi encontrado em *Pimelodella*, onde foi identificada a existência de um sistema cromossômico sexual simples, do tipo XX/XY (DIAS & FORESTI, 1993) na população de *Pimelodella boschmai*, coletada no Rio Mogi-Guaçu em Araras, no estado de São Paulo.

Garcia & Almeida-Toledo (2010) através de análises citogenéticas realizadas em cinco espécies de *Pimelodella* das principais sub-bacias do Alto Rio Paraná e Rio Paraíba do Sul verificaram que o número diplóide variou de $2n=46$ a $2n=58$ cromossomos e que todas as populações diferiram na constituição cariotípica. Observou-se a ocorrência de um polimorfismo de heterocromatina envolvendo o primeiro par cromossômico do cariótipo, o qual se mostrou restrito a alguns machos dessa população.

Tabela 1.1: Estudos citogenéticos realizados em *Pimelodella*:

Espécie	Localidade	2n	Fórmula cariotípica	NF	RON (localização)	Referências
<i>P. avanhandavae</i>	R. Araguá, R. Capivara – SP	46	20M+20SM+6ST	92	Braço curto, SM	1
<i>P.aff. avanhandavae</i>	R. Tibagi – PR	52	30M+22SM	104	Braço curto, SM	2
<i>P. boshmai</i>	Araras-SP	46	33M+13SM♂ 34M+12SM♀	92	Braço curto, SM	3
<i>P. kronei</i>	Iporanga – SP	58	20M+32SM+6ST/A	110	Braço curto, SM	4
<i>P. meeki</i>	R. Tibagi – PR	46	30M+12SM+4ST	92	Braço curto, SM	5
	R. Gabriel da Cunha - PR	46	30M+12SM+4ST	92	Braço curto, SM	5
	R. Couro de Boi – PR	46	30M+12SM+4ST	92	Braço curto, SM	5
	Ribeirão Claro- SP	46	30M+12SM+4ST	92	Braço curto, SM	9
	R. Parapanema – S.Miguel Arcanjo - SP	46	28M+12SM+6ST	92	Braço curto, SM	3
	R. Parapanema – Pilar do Sul - SP	46	28M+12SM+6ST	92	Braço curto, SM	3
<i>Pimelodella sp</i>	R. Mogi-Guaçu, R. Pardo - SP	46	28M+10SM+8A	82		6
	R. Mogi-Guaçu - SP	46	40M/SM+6ST/A♀ 38M/SM+6ST/A+1SM♂	86	M/SM variação no nº de segmentos	7
<i>Pimelodella sp8</i>	R. Paraná	46	20M+20SM+6A	86	Braço curto, SM(par 12)	8
	R. Paraná	52	22M+22SM+8ST	104	Braço curto, SM	8
<i>P. transitoria</i>	Iporanga – SP	58	20M+32SM+6ST/A	110	Braço curto, SM	4

Legenda: 1- Vissoto et al., 1999; 2- Swarça et al., 2003; 3- Garcia & Almeida-Toledo, 2010; 4- Almeida-Toledo et al., 1992; 5- Vidotto et al., 2004; 6- Toledo & Ferrari, 1976; 7- Dias & Foresti, 1993; 8- Vasconcelos & Martins Santos, 2000; 9- Borba et al, 2008.

2n = número diplóide, NF = número fundamental, RON = região organizadora do nucléolo, M = metacêntrico, SM = submetacêntrico, ST = subtelocêntrico, A = acrocêntrico.

Abordagens morfológicas e moleculares:

Os caracteres morfológicos são a principal fonte de informação na descrição e identificação de espécies. Destes, os caracteres osteológicos são os mais utilizados, sendo os relacionados a morfologia craniana os mais frequentes. Entretanto, caracteres merísticos e da musculatura são também informativos para tal finalidade.

Nos peixes, a maior parte das características usadas na identificação das espécies é descritiva (exemplo: forma da barbatana caudal), morfométricas (exemplo: comprimento da cabeça como fração do comprimento do corpo) ou merísticas (exemplo: número de raios na nadadeira dorsal).

Com o intuito de diferenciação de espécies próximas, pesquisadores vem utilizando dados morfológicos e citogenéticos. Contudo, ferramentas moleculares são eficientes quando essa identificação se torna complicada.

A biologia molecular vem sendo amplamente utilizada com inúmeras finalidades, dentre elas a detecção de variabilidade genética, viabilizando a obtenção de um número grande de marcadores moleculares (microssatélites e sequências de DNA nuclear e mitocondrial) (OLIVEIRA et al., 2006; SUNNUCKS, 2000).

Com o objetivo de estudar a diversidade genética, a estrutura populacional e as relações filogenéticas entre representantes do gênero *Eigenmannia* diferentes abordagens fizeram parte do trabalho de Moysés (2005). Marcadores microssatélites, ISSR e sequenciamento do DNA mitocondrial contribuíram para explicar a diferenciação encontrada neste gênero, que possivelmente ocorreu por combinação de eventos históricos.

Outra ferramenta molecular que vem sendo utilizada para auxiliar a identificação das espécies e para a realização de comparação de populações é o sequenciamento do gene COI (NWANI et al, 2010; QUEZADA-ROMEGELLI, 2010; ARDURA et al., 2010; WONG, 2011).

Nevado et al. (2009), utilizou-se de seqüências de DNA mitocondrial e nuclear de espécies coletadas no lago Tanganyika na África para esclarecer

as relações evolutivas entre os ciclídeos *Lamprologus callipterus* e *Neolamprologus fasciatus*.

Calcagnotto e DeSalle (2001) utilizaram a amplificação dos locos de microssatélites para ampliar o conhecimento sobre a estrutura genética de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e também obter informações para a conservação de populações selvagens provenientes dos rios da Bacia do Alto Paraguai.

Populações do gênero *Rhamdia* foram estudadas por Garcia (2010) em abordagem citogenético e molecular, com o sequenciamento dos genes mitocondriais citocromo b, NAD2, D-loop e ATPase 6 e 8.

Martin & Bermingham (2000) realizaram estudos em *Pimelodella chagresi* da América Central, utilizando para isto dados morfológicos e análises de RFLP (polimorfismos de comprimento dos fragmentos de restrição) dos genes da ATPase 6 e 8 do mtDNA. Os resultados obtidos pelos autores indicam que as espécies descritas como *P. chagresi* abrigam uma grande variação de haplótipos, a qual associada aos dados morfológicos sugere a existência de um complexo de espécies e levou à conclusão de que este grupo é polifilético. Os autores observaram também que cada rio possui um grupo próprio desses peixes, sendo rara a mistura de mais de uma linhagem de mtDNA em uma mesma região, indicando que possíveis eventos de exclusão competitiva e introgressão podem estar atuando nessas populações.

Moeser & Bermingham (2005), deram continuidade aos estudos moleculares em *P. chagresi* construindo uma biblioteca e caracterizando marcadores microssatélites em uma tentativa de investigar a estrutura populacional dessa espécie em uma escala mais fina. Foram descritos oito pares de primers, sendo que apenas em um a heterozigosidade observada não foi a mesma da esperada. Entretanto, ainda não foram publicados os dados populacionais obtidos com esses marcadores.

Em 2003, Almeida, Sodré & Contel realizaram um estudo comparativo com análises de RAPD de seis espécies da família Pimelodidae (Osteichthyes, Siluriformes) do rio Tibagi, no Estado do Paraná (*Pimelodus*

maculatus, *P. cf. absconditus*, *Iheringichthys labrosus*, *Pinirampus pirinampu*, *Pimelodella aff. avanhandavae* e *Pimelodella aff. meeki*). O padrão obtido através da técnica padrões de RAPD mostrou que os indivíduos estudados de cada uma das espécies agrupam entre si, ou seja, há uma separação definida entre as seis espécies. Mesmo não sendo a técnica ideal para estudos moleculares, pois existem atualmente técnicas mais específicas e informativas, o agrupamento obtido neste trabalho foi similar à classificação proposta por de Pinna (1998).

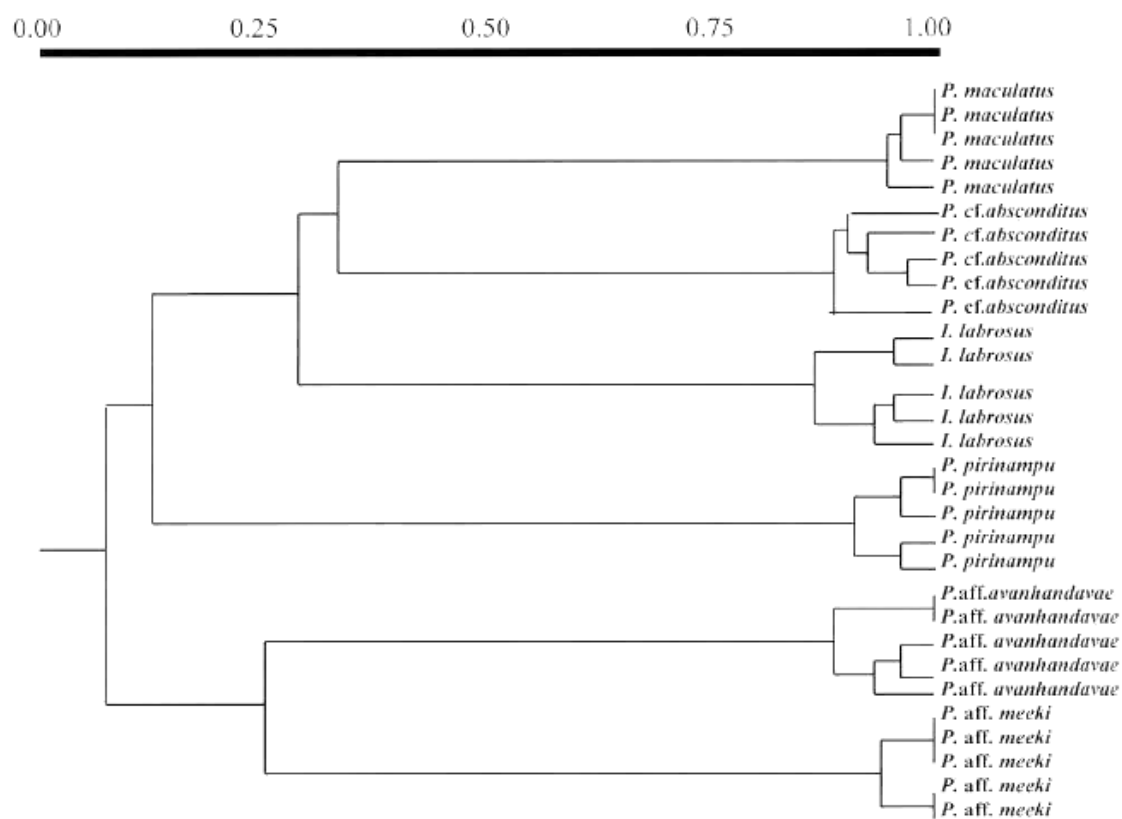


Figura 1.2: Dendrograma de seis espécies de Pimelodidae obtido pelo índice de Jaccard e pelo método de UPGMA (ALMEIDA & SODRÉ, 2002).

O DNA mitocondrial e nuclear:

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela fosforilação oxidativa, uma das vias bioquímicas mais importantes da produção de ATP, assim como uma variedade de outras funções bioquímicas. Admite-se que as mitocôndrias tiveram sua origem em uma possível relação simbiótica com

células eucariontes primitivas. A comparação dos genomas mitocondriais podem resultar em significativo conhecimento sobre a evolução tanto dos organismos como dos genomas. (BOORE, 1999).

A mitocôndria possui um genoma próprio, denominado DNA mitocondrial (mtDNA). O mtDNA animal é uma molécula circular pequena, fechada covalentemente, cujo tamanho varia de 15 a 20 Kb. Apresenta um conteúdo gênico altamente conservado, contudo com divergência rápida. Cerca de 90% do genoma consiste de regiões codificantes, apresentando dois genes para subunidades ribossômicas (12S e 16S), vinte e dois para os RNA transportadores (tRNA), três para as subunidades da enzima citocromo oxidase (COI, II e III), um para o citocromo b, dois para as subunidades da ATPase (6 e 8) e sete para as subunidades da NADH desidrogenase (BILLINGTON & HERBERT, 1991).

A molécula de mtDNA possui uma região de cerca de 1 Kb, rica em sequências AT, denominada região controle ou D-loop. Apesar de não codificante, essa região contém os promotores de transcrição de cadeia leve (L) e pesada (H), assim como a origem de replicação da cadeia pesada (CLAYTON, 1982).

O mtDNA começou a ser utilizado como marcador molecular no final da década de 70 (AVISE et al, 1979; BROWN et al, 1979) e essa descoberta produziu um grande impacto nos estudos moleculares da genética de populações e evolução. O mtDNA animal reúne várias características que o tornam um marcador adequado para estudos evolutivos como alta taxa de evolução, a qual acredita ser 10 vezes superior à de um gene de cópia única nuclear sendo explicado pela baixa capacidade de reparo da enzima DNA polimerase e a alta exposição da molécula de DNA aos agentes oxidativos gerados durante o processo de respiração celular (BROWN et al., 1979).

Segundo Saccone (1994) alguns genes acumulam mais rapidamente essas substituições de bases, dentre os quais podemos citar os genes codificadores das subunidades da NADH desidrogenase, citocromo *c* oxidase e dos RNAs transportadores, ou seja, a taxa de evolução não é homogênea entre os diferentes genes. Os genes codificadores para as subunidades

ribossômicas e para o citocromo b estão entre os mais conservados entre os organismos. Dos genes mitocondriais, a região controle (D-loop) é a que mais acumula mutações podendo apresentar taxas de evolução de duas a cinco vezes superiores a dos genes que codificam proteínas (MEYER, 1993).

A taxa de evolução é um dado importante na escolha do gene para resolver questões filogenéticas, taxonômicas e de genética de populações. Quando se pretende comparar duas espécies de peixes muito próximas, por exemplo, é apropriado o uso de genes com taxas de substituições mais altas. (SACCONE, 1994; MEYER, 1993).

Resultados de estudos acerca da divergência do mtDNA em várias espécies de animais superiores, incluindo peixes de água doce (Bermingham & Avise, 1986), introduziram uma dimensão filogenética nas discussões sobre estrutura de populações: populações geograficamente separadas ocupam, aparentemente, ramos distintos de árvores evolutivas intra-específicas (AVISE et al., 1987).

Análises com mtDNA tem fornecido valiosas contribuições para a sistemática filogenética dos Siluriformes (MOYER et al., 2004; SHIMABUKURO-DIAS et al., 2004; HARDMAN, 2005; HARDMAN & LUNDBERG, 2006; KOBLMULLER et al., 2006; Sullivan et al., 2006), bem como na resolução ou na identificação de conflitos taxonômicos (MARTIN & BERMINGHAM, 2000; PERDICES et al., 2002; VERGARA et al., 2008).

Recentemente, tem sido proposto que a sequência do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) possa servir como um sistema de identificação de animais, como um sistema de código de barras de DNA para a vida animal, conhecido como DNA *barcode* (HEBERT et al., 2003). O gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI) foi escolhido por possuir seqüências nucleotídicas conservadas interspecificamente e variáveis quando se compara as mesmas espécies, possibilitando o estudo comparativo dessas seqüências. Por ser um gene conservado em termos de seqüência, o COI permite desenvolver iniciadores (*primers*) universais com bastante sucesso (PALUMBI, 1996).

Atualmente, o número de trabalhos que associam marcadores mitocondriais e nucleares está em expansão, tanto em estudos de estrutura populacional e fluxo gênico (FITZSIMMONS et al., 1997; ORBACZ & GAFFNEY, 2000) quanto em estudos filogenéticos (PEREIRA et al., 2002; CALCAGNOTTO et al., 2005).

A abordagem molecular acrescenta informações importantes para a elucidação das relações filogenéticas, estudos populacionais, entre outros. Essa abordagem também pode ser incorporada quando o enfoque do trabalho for biogeográfico. Na Biogeografia o enfoque principal é a distribuição geográfica dos seres vivos procurando entender os padrões de organização espacial. Os dados moleculares podem resolver algumas dúvidas relativas à distribuição das espécies auxiliando no entendimento de arranjos geográficos populacionais que poderiam estar relacionados com determinados eventos como, por exemplo, eventos geológicos.

Um dos focos da Biogeografia está relacionado com eventos geológicos, pois estes interferiram diretamente no relevo e na distribuição dos organismos vivos. Por exemplo, o evento de captura de drenagens, ocorre quando um canal erode mais agressivamente que o outro adjacente, capturando sua descarga por interceptação (CHRISTOFOLETTI, 1980; SUMMERFIELD, 1991; BISHOP, 1995). Com esse evento, algumas espécies que antes eram apenas encontradas em determinado rio, podem dispersar para outras drenagens.

A Bacia do Alto Paraná:

Segundo Matesso-Neto et al. (2004) a bacia do Paraná constitui uma imensa região sedimentar da América do Sul, abrigando dentro de seus limites uma sucessão sedimentar-magmática com idades entre o Neo-Ordoviciano e o Neocretácio. Geograficamente, a bacia inclui porções territoriais do Brasil meridional, Paraguai oriental, nordeste da Argentina e norte do Uruguai, numa área total que ultrapassa 1.500.000 Km². A Bacia exibe forma ovalada com eixo maior em posição sub-meridiana e é plena representante do conceito de bacia intracratônica: encontra-se inteiramente

contida na placa sul-americana e não apresenta relacionamento direto com as margens desta placa.

O sistema do Alto Paraná inclui os rios da Prata-Uruguai-Paraná-Paraguai, e representa o segundo maior sistema de drenagem na América do Sul, com 3,2 milhões de km² (LOWE-McCONNELL, 1999). A drenagem do Alto Rio Paraná possui aproximadamente 900.000 km², incluindo o Estado do Paraná, Mato Grosso do Sul, Estado de São Paulo (a oeste da Serra do Mar), Minas Gerais, Goiás e uma área pequena do Paraguai oriental adjacente ao Mato Grosso do Sul (CASTRO et al., 2003).

Sob o ponto de vista ictiofaunístico o Alto Paraná compreende uma área com complexa história própria, em parte compartilhada com drenagens vizinhas, ou seja, com um histórico de troca de drenagens (LANGEANI et al., 2007).

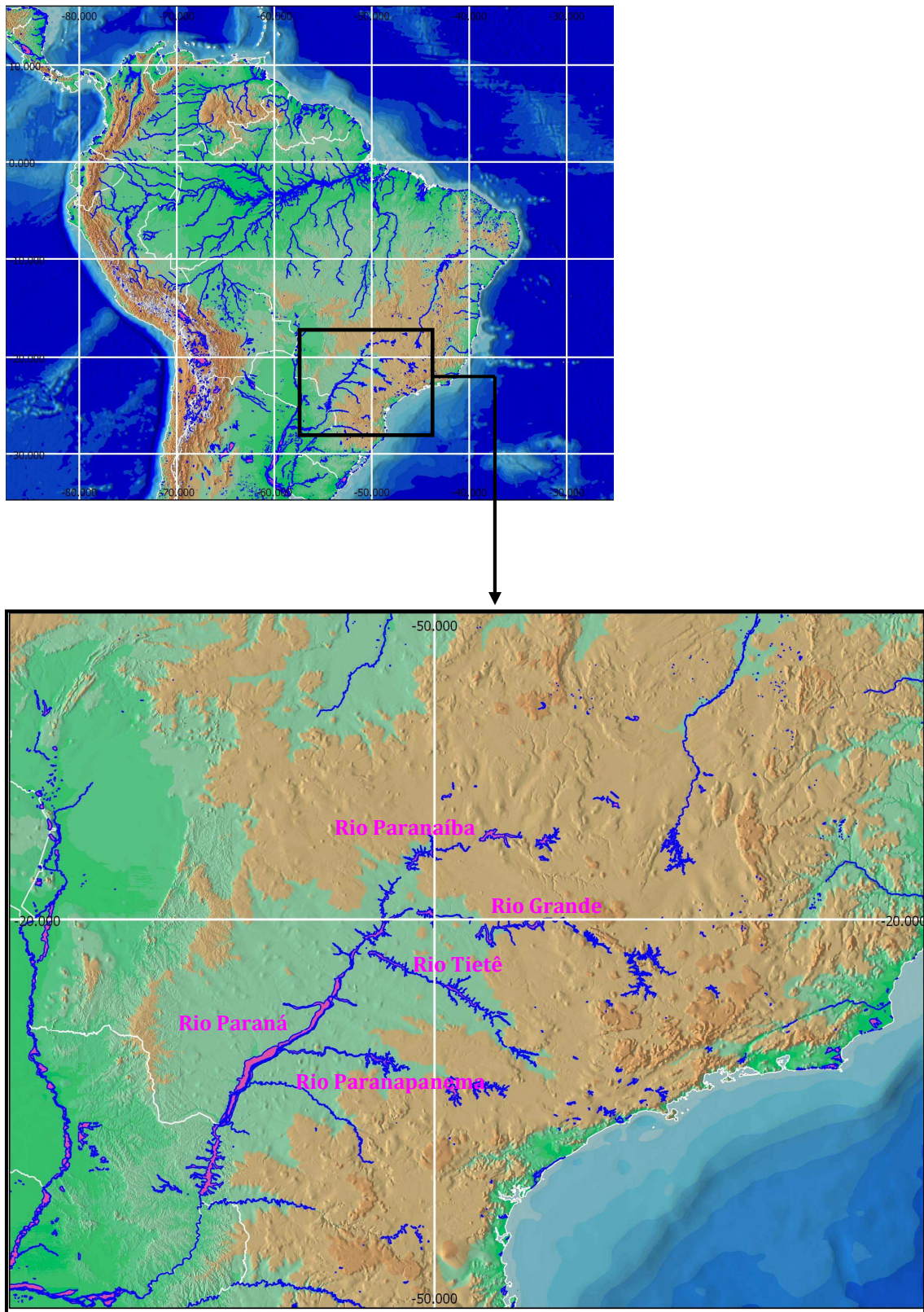


Figura 1.3: Mapa do Brasil. Em destaque a Bacia do Paraná. Fonte: Quantum GIS 1.6.0-Capiapo.

Cada curso d'água, em sua respectiva bacia hidrográfica, está sob a ação diversos fenômenos que acontecem continuamente. Em consequência de um processo de expansão de uma bacia hidrográfica mediante a erosão ou incisão fluvial na parte alta de seus rios ou barrancos, as cabeceiras de um rio podem invadir a área da bacia hidrográfica vizinha e absorver-lhe parte das águas. A esse fenômeno dá-se o nome de captura de drenagem. Isto se dá graças à presença de diversos falhamentos ao longo do seu percurso. As capturas são identificadas por cotovelos (ponto de captura, sempre em ângulo reto indicando a direção da mudança do canal), vales secos ou vales abandonados, entre outras feições (SILVA et al., 2006).

Um exemplo de captura foi proposto por Hermann von Ihering quando escreveu um artigo na Revista do Museu Paulista em 1894 sobre as conexões antigas e separação posterior de drenagens do Paraíba e Tietê. O autor cita que “o rio Paraíba, desde as suas nascentes até Guararema, foi afluente do rio Tietê, e isto provavelmente na mesma época em que a grande lagoa terciária de Tremembé ocupou o vale do Paraíba desde Jacareí até Cachoeira, sendo que esta lagoa esteve em conexão franca com o oceano, o que é corroborado pela presença dos bagres”. Segundo o autor, “devido a modificações geológicas que foram interrompendo posteriormente, a antiga conexão entre os dois rios e que o Paraíba, invertido completamente no seu curso original, ganhou a bacia da lagoa de Tremembé e com ele desaguou ao norte” (AB’SABER, 1957 e 1998)

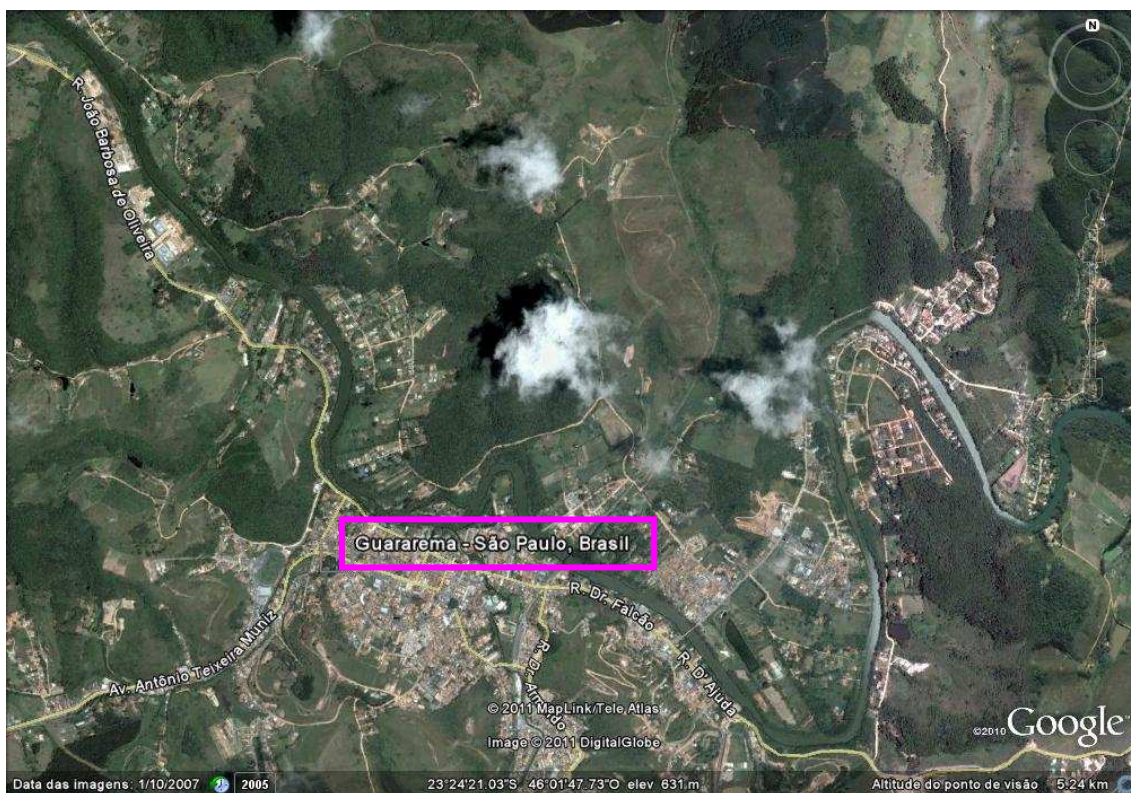


Figura 1.4: Mapa com a região da cidade de Guararema em destaque, onde é possível notar a trajetória do rio Paraíba. Fonte: Google Earth.

Existem modalidades de captura, como as que ocorrem por desdobramento e por evolução de meandros. Um dos exemplos mais significativos no estado de São Paulo é o rio Paraibuna que seria o antigo curso superior do rio Tietê, capturado pelo primitivo rio Paraíba do Sul, o que explicaria o brusco desvio de seu curso na região de Guararema (“cotovelo”). Malabarba (1998) sugere que houve uma ligação no passado entre o rio Tietê e drenagens costeiras e que conexões de outras porções do Alto Paraná também podem ter ocorrido.

A erosão atua como fator modelador da paisagem, à medida que define novas formas do relevo, seja por retirada ou acúmulo de material. Fenômenos como desvios do fluxo do rio e capturas de drenagens podem ser resultado da concorrência entre duas bacias hidrográficas modificando o equilíbrio dinâmico de um sistema fluvial.

Eventos envolvendo tectônica e processo erosivo são, de certa forma, ativos até hoje e exemplificam a ocorrência de vários grupos de peixes em

determinadas regiões e sua distribuição nos dias atuais. Esses acontecimentos influenciaram nos padrões de estruturação genética e são de grande importância para os estudos populacionais e poderão resultar em informações importantes para a conservação das espécies.

A hipótese de uma mega captura fluvial ocorre na região do Arquipélago das Anavilhanas, próximo ao Rio Amazonas. A configuração da rede hidrográfica atual é sugestiva da existência de um controle neotectônico sobre a paisagem, como reflexo da instabilidade sísmica da região (ALMEIDA-FILHO et al., 2005).

Um exemplo de distribuição da ictiofauna devido a alterações tectônicas é apresentado por Menezes et al. (2008) com o estudo da biogeografia de Glandulocaudinae. O padrão de distribuição pode ser explicado a aspectos da evolução tectônica da porção sul da Plataforma Cisandina da América do Sul.

Ribeiro (2006) explica em seu trabalho que a atividade tectônica do Arco de Ponta Grossa, como falhas de controle de relevo e os padrões de drenagem (MELO, 2002), movimentos verticais entre blocos falhados e evolução erosiva dos rios ao longo de fraturas podem ter promovido a mistura entre drenagens adjacentes, e, provavelmente, explicariam as trocas de fauna que ocorreram entre Ribeira de Iguape, e terras altas da Bacia do Paraná e Rios Iguaçu e Paranapanema.

Objetivos:

Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados no estudo das relações filogenéticas e na identificação de populações de peixes. O presente trabalho teve como objetivo principal a utilização de diferentes marcadores em espécies do gênero *Pimelodella* provenientes da Bacia do Alto Paraná.

Foram objetivos específicos do trabalho:

- Busca de caracteres de morfologia externa que possibilitassem a identificação das espécies de *Pimelodella*.
- Verificar com auxílio do código de barras do DNA a possível ocorrência de complexos de espécies entre as espécies do gênero *Pimelodella* da Bacia do Alto Paraná e bacias costeiras do sudeste.
- Realizar análise filogenética nas espécies do gênero *Pimelodella* utilizando sequências do genoma mitocondrial.
- Analisar o padrão de distribuição das espécies na Bacia do Alto Paraná, comparando a localização geográfica com a das sub-bacias e testar a hipótese de captura de drenagens entre a Bacia do Alto Paraná e as bacias adjacentes.

Capítulo 2

Identificação das espécies de Pimelodella através do código de barras do DNA e caracteres morfológicos



Resumo

Heptapteridae é uma família de bagres endêmica da região neotropical e uma das mais abundantes da ordem Siluriformes. Encontrados em pequenos corpos de água desde o México até o sul da Argentina, os heptapterídeos recebem diversos nomes vulgares, como por exemplo, bagre, resbalosa, mandi, entre outros, dependendo da região geográfica. *Pimelodella* (Eigenmann & Eigenmann, 1888) é um gênero com cerca de 70 espécies distribuídas desde o sul da América do Sul até o Panamá e América Central. As limitações inerentes à identificação de determinadas espécies baseada apenas na morfologia e a necessidade de uma nova abordagem para o reconhecimento de táxons fizeram com que pesquisadores propussem a criação de um sistema diagnóstico universal denominado *DNA barcode* ou código de barras do DNA. A necessidade de ferramentas confiáveis de identificação de espécies combinadas com sucesso pelo *DNA barcode* com promoveu a criação do FISH-BOL (“The Fish Barcode of Life Initiative”) com o objetivo de reunir registros de DNA para todas espécies de peixes do mundo. O principal objetivo do presente estudo é testar a adequação do uso de código de barras de DNA na identificação das espécies de *Pimelodella*, usando para tanto os métodos tradicionais de distância e de análise, baseada em caracteres de 135 indivíduos inicialmente identificados como pertencentes a nove espécies de *Pimelodella* provenientes de diferentes bacias hidrográficas do Brasil. Os resultados obtidos demonstraram a eficiência da metodologia do *barcode*, quando combinada com os dados morfológicos, para a identificação das espécies.

Introdução

Heptapteridae é uma família de bagres endêmica da região neotropical e uma das mais abundantes da ordem Siluriformes.

Encontrados em pequenos corpos de água desde o México até o sul da Argentina (BOCKMANN & GUAZZELLI, 2003), os heptapterídeos recebem diversos nomes vulgares, como por exemplo, bagre, resbalosa, mandi, entre outros, dependendo da região geográfica. Alguns gêneros não são exclusivos de fundo, como o caso de *Pimelodella*, que fazem incursões frequentes na coluna de água. Sua maior atividade ocorre durante o crepúsculo e à noite, enquanto durante o dia geralmente procuram refúgio em espaços entre pedras, na folhagem e na vegetação marginal, ou mesmo escondendo-se sob a areia (BOCKMANN, 1998).

Pimelodella (Eigenmann & Eigenmann, 1888) é um gênero com cerca de 70 espécies distribuídas desde o sul da América do Sul até o Panamá e América Central. Esse peixe de pequeno porte (tamanho médio 12 cm) é popularmente conhecido como “mandi-chorão” devido aos sons que emite durante sua captura. De hábito noturno e onívoro, o “mandi-chorão” apresenta o primeiro raio das nadadeiras peitorais e dorsais modificado na forma de acúleo pungente, o qual pode gerar ferimentos dolorosos.

Entre os membros da família Heptapteridae existem várias espécies que são troglóbias, isto é, animal que vive no interior das cavernas ou das águas subterrâneas, completamente afastado da luz e que, por isso, é despigmentado e desprovido de órgãos de visão ou os tem os muito atrofiados e possui órgãos tácteis muito desenvolvidos (PROUDLOVE, 2001; TRAJANO 1997). No gênero *Pimelodella* existem atualmente duas espécies troglóbias descritas: *P. kronei* (RIBEIRO 1907) encontrada em afluentes do rio Ribeira, em Iporanga sudeste do Brasil e *P. spelaea* (TRAJANO *et al.*, 2004), encontrada em um afluente do Rio São Bernardo dentro da caverna São Bernardo na bacia do Tocantins superior. *P. vittata* é encontrada em córrego da bacia do Rio das Velhas, Bacia do São Francisco, no interior da Gruta Morena e acredita-se ser uma espécie troglófila, ou seja, capaz de estabelecer populações auto-sustentadas, tanto em habitats epígeos como

subterrâneos (TRAJANO *et al.* 2009). O potencial para colonizar ambiente subterrâneo em Heptapteridae é associado à sua dieta carnívora generalizada e hábito noturno (TRAJANO, 2001). Existem várias características (troglomorfismos) relacionados com a vida restrita ao habitat subterrâneo perpetuamente escuro, como a redução ou ausência total de olhos e / ou pigmentação (TRAJANO, 2004).

Alguns pesquisadores buscam abordagens alternativas para solucionar o problema das limitações inerentes à identificação de algumas espécies com base somente na morfologia. Bartlett & Davidson (1991) foram os primeiros a usar o sequenciamento de DNA mitocondrial para identificação de peixes, mostrando que as sequências do citocromo b poderia discriminar quatro espécies de atum (*Thunnus* spp.). Mais recentemente, pesquisadores da Universidade de Guelph (Ontário, Canadá) propusessem a criação de um sistema diagnóstico universal através da análise de um pequeno segmento de 650 pb do genoma mitocondrial, e que representa uma abordagem extremamente promissora para o diagnóstico da diversidade biológica. Esse marcador foi denominado *DNA barcode* ou código de barras de DNA (HERBERT *et al.*, 2003).

A criação de um banco de sequências do *DNA barcode* para todas as espécies existentes, utilizando amostras depositadas em museus ou outras instituições e previamente identificadas por taxonomistas (RATNASINGHAM & HERBERT, 2007) faz parte desta iniciativa. Esse banco de dados, denominado BOLD (*The DNA Barcode of Life Data System*) permite associar alguns dados às amostras como: fotos do espécime testemunho, informações de campo, como pontos de coleta, coletor e data da coleta; número do espécime e instituição na qual esse material foi depositado; dados taxonômicos e informações moleculares, como amplificação e no sequenciamento (RATNASINGHAM & HERBERT, 2007).

O uso do *DNA barcode* tem apresentado alta taxa de sucesso na identificação rápida de espécies de diversos grupos de artrópodes, aves, peixes e anfíbios (HERBERT *et al.*, 2003, 2004; KERR *et al.*, 2007; WARD *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2008a). Isso porque a taxa de evolução molecular do

gene COI permite distinguir espécies próximas e também grupos filogeográficos dentro de uma mesma espécie (HERBERT et al., 2003, 2004b; KERR et al., 2007; WARD et al., 2005). Segundo Hebert et al. (2003), os benefícios esperados com a utilização do *DNA barcode* são a identificação de espécies crípticas, o descobrimento de novas espécies, possibilidade de identificação de formas juvenis e adultas de uma mesma espécie e a identificação de espécies a partir de fragmentos de material biológico.

A necessidade de ferramentas abrangentes e confiáveis de identificação de espécies combinadas com sucesso do DNA *barcode* em peixes (SAVOLAINEN et al, 2005; WARD et al., 2005) promoveu a criação do FISH-BOL (“The Fish Barcode of Life Initiative”, <http://www.fishbol.org>). Os dados de código de barras estão atualmente sendo incorporados em diversos subprojetos do projeto “Árvore da Vida” (MADDISON & SCHULZ, 2006).

Um exemplo recente da utilização do DNA *barcode* em inventários de biodiversidade foi a identificação de peixes teleósteos e cartilagenosos provenientes dos mares australianos. Nesse estudo conclui-se que o DNA *barcode* pode ser usado com confiança nesses peixes (WARD et al., 2005). O DNA *barcode* permitiu a identificação correta de 388 espécies de peixes de diferentes ordens (WARD & HOLMES, 2007), e pode também contribuir na biologia da conservação, que visa à preservação e ao gerenciamento da biodiversidade global (ARMSTRONG & BALL, 2005; RUBINOFF, 2006).

O principal objetivo deste estudo é testar a adequação do uso de código de barras na identificação das espécies no gênero *Pimelodella*, usando os métodos tradicionais de distância e de análise baseada em caracteres.

Materiais e métodos:

Foram utilizadas amostras de tecido pertencentes a 135 espécimes do gênero *Pimelodella* provenientes de rios pertencentes às principais bacias hidrográficas do Estado de São Paulo. Como grupos externos foram incluídos: *Imparfinis minutus* (Heptapteridae), *Microglanis cottoides*

(Pseudopimelodidae), *Acentronichthys leptos* (Heptapteridae) e *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). As amostras em sua maioria foram coletadas pelo grupo do Laboratório de Ictiogenética da USP (LIUSP), entretanto, algumas amostras foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Claudio Oliveira. Os exemplares utilizados no trabalho estão depositados na coleção do Laboratório de Ictiologia de Ribeirão Preto (LIRP), Departamento de Biologia da FFCLRP-USP. Na tabela 2.1 estão relacionadas as espécies identificadas tentativamente com base em caracteres morfológicos e os locais de coleta.

Tabela 2.1: Espécies identificadas e informações sobre os pontos de coleta e n° de tombo.

Espécie	Localidade	Bacia Hidrográfica	GPS	N° de indivíduos	N° Tombo
<i>Pimelodella gracilis</i>	Araras - SP	Paraná	22°22,994" 47°25,825"	08	LIRP 8141
<i>Pimelodella gracilis</i>	Pilar do Sul - SP	Paraná	23°48,800" 47°42,500"	04	LIRP 8149
<i>Pimelodella gracilis</i>	São Miguel Arcanjo – SP (dois lotes)	Paraná	23°54'690" 47°57,649"	08	LIRP 8151 e 8152
<i>Pimelodella gracilis</i>	Botucatu - SP	Paraná	22°52,081" 48°22,270"	04	LIRP 8146
<i>Pimelodella lateristriga</i>	Serra D'água - RJ	Atlântico- leste	22°53,491" 44°16,772"	04	LIRP 8142
<i>Pimelodella spelaea</i>	São Domingos – GO Gruta	Tocantins	13°49, 46°21,	07	LIRP 8160
<i>Pimelodella laurenti</i>	Cordirburgo – MG	São Francisco	19°07,296" 44°21,124"	07	LIRP 8153
<i>Pimelodella gracilis</i>	Mariápolis - SP	Paraná	20°30,607" 51°18,481"	05	LIRP 8150
<i>Pimelodella gracilis</i>	Cardoso - SP	Paraná	20°04,905" 49°55,373"	04	LIRP 8144
<i>Pimelodella garcilis</i>	Colina-SP	Paraná	20°44,635" 48°34,334"	04	LIRP 8143
<i>Pimelodella gracilis</i>	Guapiara-SP	Paraná	24°01,337" 48°34,262"	05	LIRP 8145
<i>Pimelodella gracilis</i>	Pirassununga- SP	Paraná	21°55,558" 47°22,195"	08	LIRP 8147 e 8148
<i>Pimelodella gracilis</i>	Salesópolis-SP	Paraná	23°31,465" 45°47,510"	05	Lote 1059
<i>Pimelodella australis</i>	Pelotas-RS	Atlântico- Sudeste	31°28,463" 52°12,469"	05	Lote 3365
<i>Pimelodella mucosa</i>	Cuiabá-MT	Paraná	15°21,20" 56°06,54"	03	Lote 3963
<i>Pimelodella gracilis</i>	Marapoama- SP	Paraná	21°11,35" 49°07,22"	03	Lote 4704
<i>Pimelodella sp</i>	São Gabriel	Amazônica	00°04,665"	05	Lote 6942

	da Cachoeira-AM		66°49,546"		
<i>Pimelodella lateristriga</i>	Campos dos Goytacazes-RJ	Atlântico-leste	21°20,463" 41°20,100"	05	Lote 3463
<i>Pimelodella avanhandavae</i>	Bela Vista de Goiás-GO	Paraná	17°05,580" 48°45,415"	05	Lote 7265
<i>Pimelodella lateristriga</i>	Macaé-RJ	Atlântico-leste	22°14,070" 41°51,446"	05	Lote 3475
<i>Pimelodella lateristriga</i>	Morretes-PR	Atlântico-sudeste	25°31,149" 48°47,527"	05	Lote 3660
<i>Pimelodella mucosa</i>	Aquidauana-MS	Paraná	19°34,337" 56°14,495"	05	Lote 3774
<i>Pimelodella kronei</i>	PETAR - Sistema Bombas	Paraná	24°36,250" 48°41,221"	05	Animais devolvidos ao rio
<i>Pimelodella transitoria</i>	PETAR – Rio Betari	Paraná	24°33,026" 48°40,875"	03	Animais devolvidos ao rio

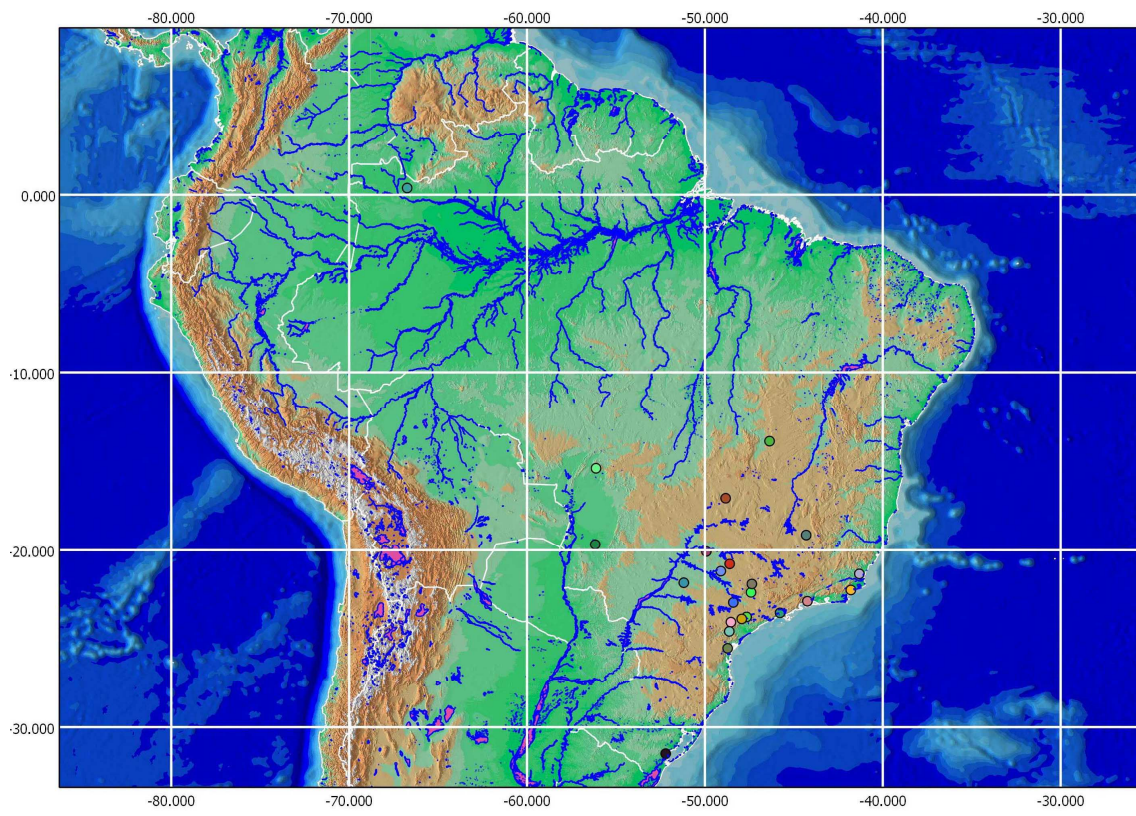


Figura 2.1: Pontos de coleta marcados no mapa do Brasil. Fonte: Quantum GIS 1.6.0-Capiapo.

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

O DNA total dos espécimes foi extraído a partir de porções de tecido do fígado, músculo, coração e/ou nadadeiras fixados em álcool 96% de acordo com o protocolo descrito por Aljanabi & Martinez (1997). Devido à quantidade e qualidade do DNA obtido das nadadeiras, estas utilizadas preferencialmente.

Foram sequenciadas pelo menos três amostras de cada ponto de coleta. Após as extrações os DNAs foram quantificados em espectrofotômetro (U-2000 Spectrophotometer HITACHI) e diluídos numa concentração final de 50 ng/μL. Essas diluições foram utilizadas nas reações de amplificação do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI). Os primers utilizados para a amplificação gene COI do genoma mitocondrial foi COXI-F2 5'-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3' e COXI-R2 5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3' (WARD et al., 2005).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Matercyler Gradient Eppendorf, em volume total de 25 μL, contendo: 50 ng de DNA; 1X tampão da Polimerase contendo KCl e (NH₄)₂SO₄, 1,5 mM de MgCl₂; 2,5 pmol de cada primer; 2,5 mM de dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 0,1 U Taq DNA Polymerase (Fermentas). As condições utilizadas foram 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 92°C por 1 minuto; 56°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Depois do término do programa, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% para confirmar a amplificação e determinar se os tamanhos dos fragmentos obtidos correspondiam ao tamanho esperado. Os produtos PCR foram purificados com o auxílio do “ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit” (Invitrogen), seguindo-se as instruções do fabricante. Depois de purificado, o DNA foi submetido a uma segunda corrida eletroforética para quantificação

Em seguida, foi realizada a reação de sequenciamento utilizando-se o kit “BigDye Sequence Terminator v.3.1” (Applied Biosystems). As reações continham: 15 ng de DNA (produto purificado); 1X Sequencing Buffer; 0,5

pmol de cada primer; 1 µL BigDye® Terminator v3.1. As condições foram as seguintes: 25 ciclos a 96°C por 30 segundos; 15 segundos a 50°C; 4 minutos a 60°C. A seguir os produtos foram precipitados utilizando-se acetato de sódio seguindo protocolo sugerido pelo fabricante (Applied Biosystems).

As sequências foram visualizadas em sequenciador (modelo ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer da Applied Biosystems/fabricado pela HITACHI) do Instituto de Química-USP. As sequências obtidas foram verificadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando-se o programa 'Blastn', para confirmação da similaridade com as sequências mitocondriais de outros organismos. A montagem dos contigs e a inspeção visual das sequências foram feitas com auxílio do programa Sequencher 4.7 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA). As sequências foram alinhadas usando o programa Clustal (Larkin et al. 2007).

Diversidade genética e análise filogenética:

Neste estudo o código de barras de DNA foi utilizado no processo de identificação das espécies. Para este fim, foram usadas duas abordagens: a mais tradicional baseada em dados de distância genética e uma análise baseada em caracteres.

As análises baseadas em distância, Neighbor Joining (NJ) usando Kimura Dois Parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980), foram realizadas usando PAUP*4.0 (SWOFFORD, 2000). Para a análise baseada em caracteres, foi empregado o algoritmo CAOS com o aplicativo P-Gnome, desenvolvido por Rach et al. (2008), que nos permitiu identificar uma combinação única de caracteres diagnósticos puros para grupo definido a priori com base em caracteres de morfologia externa e dados de sua distribuição. Para essa análise, a árvore resultante da análise de NJ e arquivo NEXUS correspondente foram salvos como um único arquivo no programa MacClade4 v. 4.06 (MADDISON & MADDISON, 1992). Os nós correspondentes a agrupamentos específicos hipotéticos foram colapsados utilizando a ferramenta "collapse clade". A seguir o aplicativo P-Gnome foi

utilizado para buscar atributos característicos (CA) de cada clado, isso é, caráter diagnóstico encontrados em um clado, mas não nos outros descendentes do mesmo nó. Os nós (agrupamentos) relevantes para este estudo foram selecionados visualmente; a seguir foi produzido um arquivo contendo todos os CAs puros e privados para cada grupo dentro do gênero. *Pimelodella* e entre os três outros gêneros de Heptapteridae examinados *Rhamdia*, *Imparfinis* e *Acentronichthys*.

Resultados e discussão:

Sequências parciais da extremidade 5' do gene *Cox1* foram obtidas de 135 espécimes putativamente pertencentes a nove espécies de *Pimelodella*. O uso dos *primers* universais (FishF2 - FishR2) foi apropriado não tendo sido detectadas diferenças na amplificação nem a ocorrência de bandas múltiplas. A maioria das mutações resultou em substituições sinônimas, entretanto sete resultaram em mudanças de aminoácido: AA 5: Triptofano para arginina; AA 8: metionina para lisina; AA 9: isoleucina para valina; AA13: leucina para prolina; AA 27: leucina para fenilalanina; AA 63: valina para isoleucina, AA 168: isoleucina para treonina.

Estrutura da árvore e distâncias genéticas intraespecíficas

A Figura 2.2 mostra a árvore de Neighbor Joining evidenciando o agrupamento de espécies de *Pimelodella* e, em alguns casos, a organização geográfica.

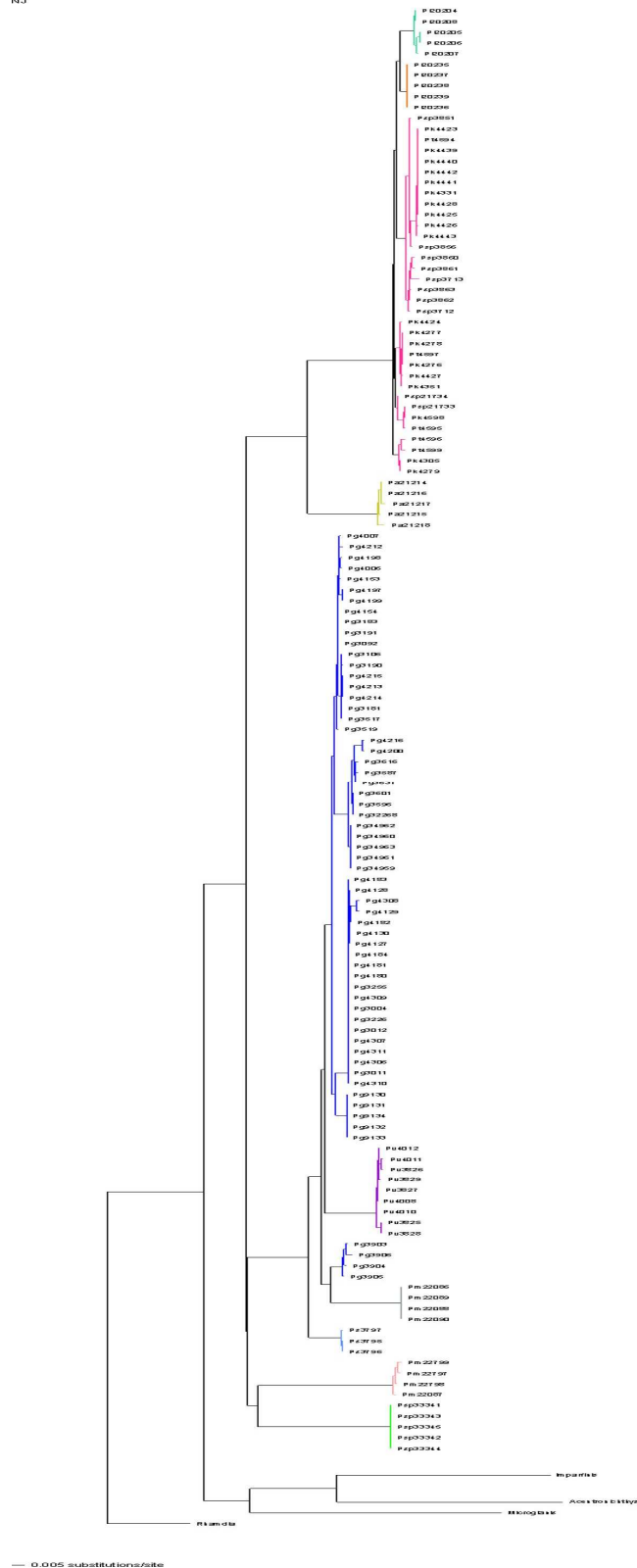
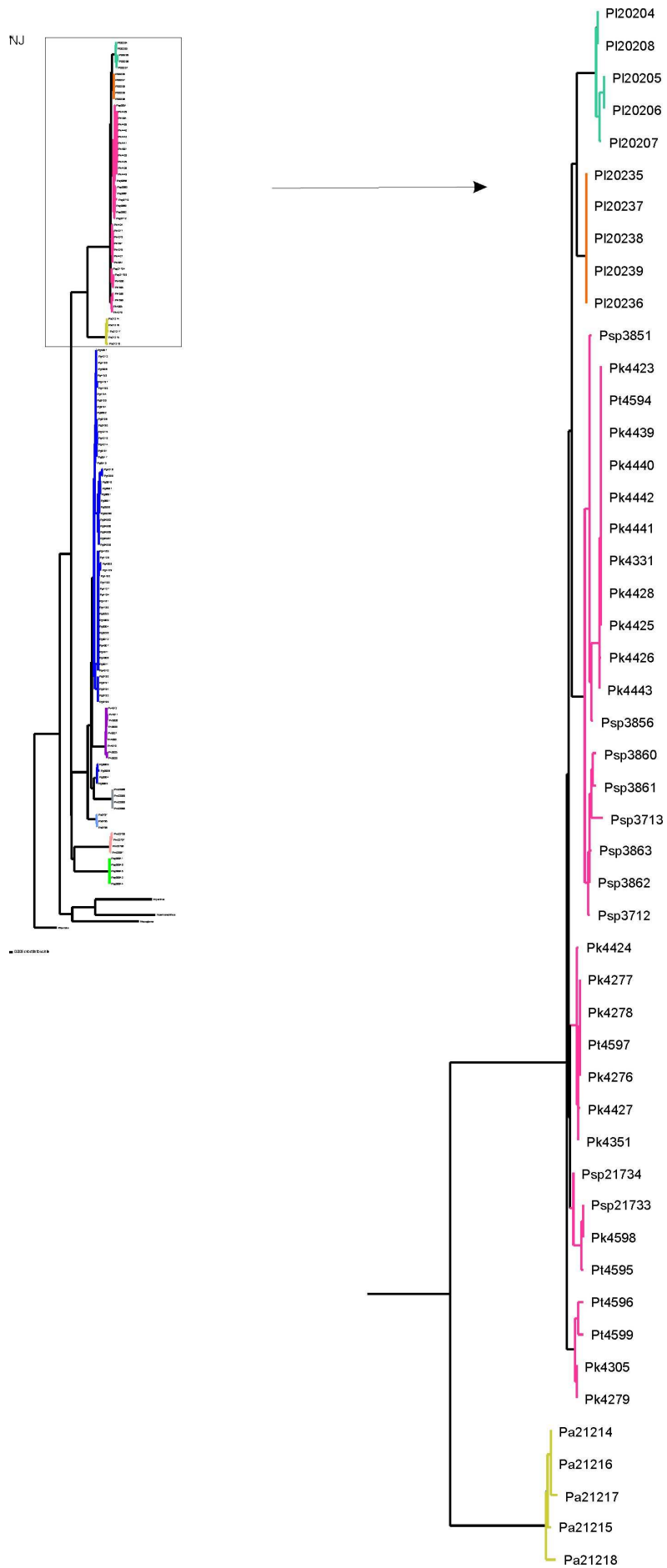
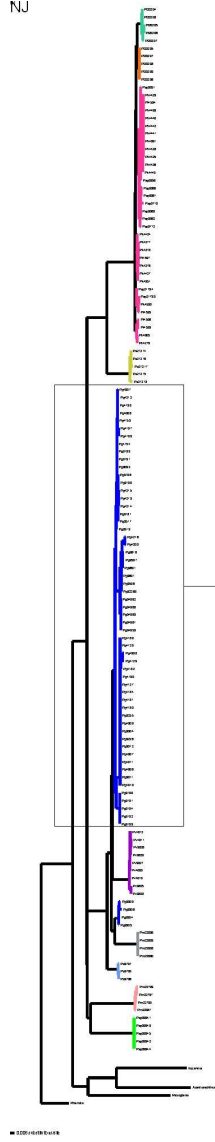


Figura 2.2: Árvore Filogenética construída a partir do sequenciamento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I. Em verde e laranja, as amostras da Bacia dos Rios Costeiros; em rosa, azul, azul escuro, cinza, azul claro e salmão as amostras da Bacia do Paraná; em ocre as amostras da Bacia do Atlântico Sudeste; em roxo as amostras da Bacia do São Francisco e em verde claro as amostras da Bacia do Amazonas.



NJ

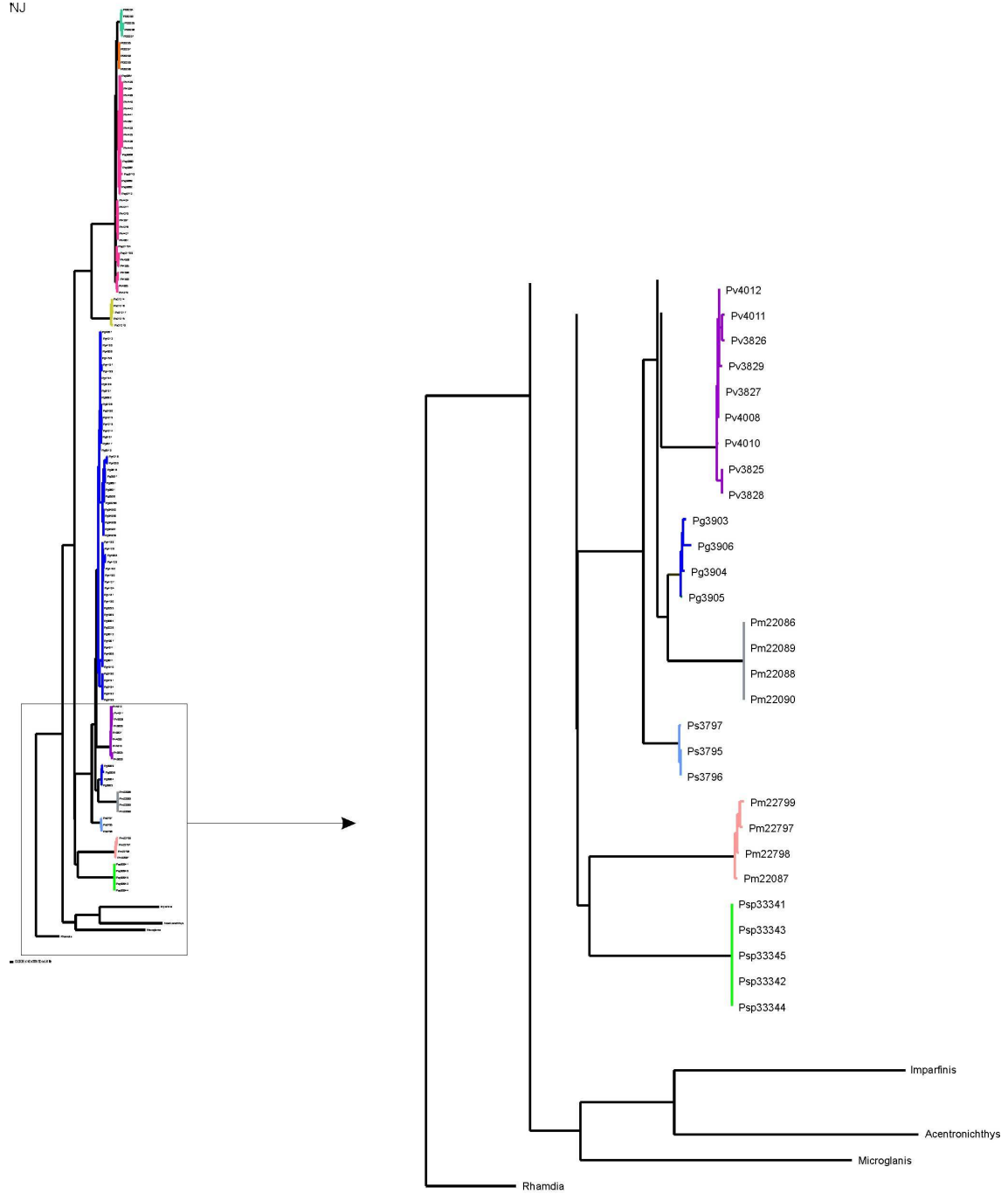
NJ



- Pg4007
- Pg4212
- Pg4198
- Pg4006
- Pg4153
- Pg4197
- Pg4199
- Pg4154
- Pg3183
- Pg3191
- Pg3092
- Pg3106
- Pg3190
- Pg4215
- Pg4213
- Pg4214
- Pg3181
- Pg3517
- Pg3519
- Pg4216
- Pg4200
- Pg3616
- Pg3587
- Pg3631
- Pg3601
- Pg3596
- Pg32268
- Pg34962
- Pg34960
- Pg34963
- Pg34961
- Pg34959
- Pg4183
- Pg4128
- Pg4308
- Pg4129
- Pg4182
- Pg4130
- Pg4127
- Pg4184
- Pg4181
- Pg4180
- Pg3255
- Pg4309
- Pg3004
- Pg3226
- Pg3012
- Pg4307
- Pg4311
- Pg4306
- Pg3011
- Pg4310
- Pg9130
- Pg9131
- Pg9134
- Pg9132
- Pg9133

0.005 substitutions/site

NJ



Dos 135 espécimes morfolologicamente identificados neste estudo, 74 pertencem a cinco espécies de *Pimelodella*: *P. australis*, *P. cf gracilis*, *P. vitatta*, *P. speleae* e *P. sp* foram corretamente designados com auxílio do código de barras.

Os 10 espécimes identificados morfolologicamente como *P. lateristriga* foram divididos em dois grupos (tabela 2.3), incluindo um de Macaé e outro de Campos de Goytacazes de rios costeiros do Rio de Janeiro. A divergência K2P média dentro de cada grupo variou de 0% em Campos de Goytacazes para 0,16% em Macaé, a divergência entre esses dois grupos é de 0,9%. *P. kronei*, *P. transitoria* e *P. lateristriga* (Morretes e Serra D'Água) foram agrupados e são indistinguíveis, por meio da divergência genética (0,49%).

Apesar de os 57 indivíduos atualmente atribuídos a *Pimelodella gracilis* provenientes de vários rios da bacia do Alto Paraná terem formado um grupo coeso, quatro subgrupos foram evidentes. Dezenove amostras de Cardoso, Colina, Araras, Pirassununga formaram um subgrupo. As 13 amostras coletadas em Botucatu, Marapoama, Pirassununga e Bela Vista de Goiás formam o segundo subgrupo e, o terceiro, é composto por 20 indivíduos de Guapiara, São Miguel Arcanjo e Pilar do Sul. Cinco espécimes de Salesópolis compõem o quarto subgrupo. A divergência K2P média dentro deste grupo de *Pimelodella sp* foi de 0,69%.

Quatro outros espécimes também identificadas como *Pimelodella gracilis* provenientes de Mariápolis demonstraram ser geneticamente mais próximos a *P. vitatta* do que a outras *Pimelodella gracilis*. A divergência K2P média entre os dois clados de *Pimelodella gracilis*, o primeiro composto pelos quatro subgrupos e aquele proveniente de Mariapolis, foi de 2,01%.

Os oito exemplares identificados, com base na morfologia, como *P. mucosa* provenientes de rios de Aquidauana e Cuiabá, formaram dois subgrupos, com 10,77%, uma média de distância entre eles.

A divergência de sequência média encontrada entre espécies de *Pimelodella* (8,98%) é cerca de 20 vezes maior do que entre indivíduos da mesma espécie (0,46%). Por exemplo, a distância intra-específica variou de 0,0% em *P. speleae*, *P. mucosa* e *P. gracilis* a 0,86% em *P. australis*. Quando

comparadas, as distâncias genéticas médias, entre os quatro gêneros de Heptapteridae, variaram de 17,06% entre *Imparfinis* e *Acentronichthys* a 20,19% entre *Rhamdia* e *Acentronichthys*. Entre *Pimelodella* e os outros três gêneros de Heptapteridae, a distância media foi de 19,66%. O gráfico apresentado na figura 2.3 mostra que não há sobreposição dos valores de distância intra- e interespecíficos indicando que o código de barras de DNA é um marcador informativo na identificação de espécies.

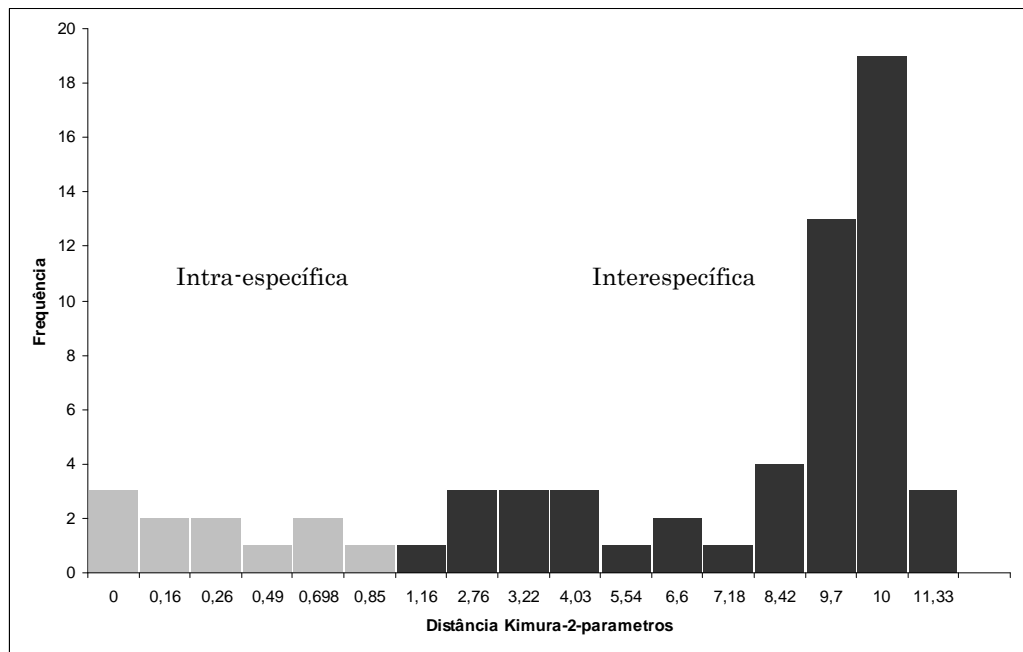


Figura 2.3: Distribuição dos valores de distância intra e interespecífica das espécies estudadas de *Pimelodella*.

	A	B	C	D	E	G	H	I	J	L	M	N	O
A	0,021	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	0,08	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	0,061	0,044	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	1,317	0,909	0,85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	0,539	0,439	0,421	0,363	0,0144	-	-	-	-	-	-	-	-
G	0,565	0,461	0,427	0,455	0,0478	-	-	-	-	-	-	-	-
H	0,5095	0,451	0,859	0,444	0,046	0,059	-	-	-	-	-	-	-
I	0,926	0,727	0,691	0,608	0,167	0,188	0,222	-	-	-	-	-	-
J	0,53	0,682	0,463	0,495	0,078	0,104	0,139	0,236	0,015	-	-	-	-
L	1,272	0,591	0,521	0,3695	0,116	0,169	0,164	0,273	0,187	-	-	-	-
M	0,767	0,72	0,727	0,655	0,225	0,294	0,254	0,489	0,162	0,316	-	-	-
N	0,792	0,69	0,755	1,022	0,401	0,354	0,491	0,564	0,492	0,538	0,705	0,021	-
O	0,64	0,544	0,485	0,535	0,272	0,349	0,354	0,337	0,405	0,334	0,578	0,39	-

Tabela 2.2: Distâncias genéticas Kimura 2 Parâmetros entre espécies do gênero *Pimelodella*. A: *P. lateristriga* (Campos dos Goytacazes-RJ e Macaé-RJ); B: *P. lateristriga* (Serra D'água-RJ); C: *P. kronei* e *P. transitória*; D: *P. australis*; E: *P. gracilis* (Botucatu-SP, Pirassununga-SP e Marapoama-SP); G: *P. gracilis* (Guapiara-SP, São Miguel Arcanjo-SP e Pilar do Sul-SP); H: *P. gracilis* (Salesópolis-SP); I: *P. vitatta*; J: *P. gracilis* (Mariápolis-SP); L: *P. spelaeei*; M: *P. mucosa* (Aquidauana-MS); N: *P. mucosa* (Cuiabá-MT); O: *P. sp nova* (São Gabriel da Cachoeira-AM)

Para as 135 sequências, a composição média das bases nitrogenadas adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G) do DNA *barcode* foi de 25,4%, 28,7%, 27,7% e 18,1% respectivamente. Esses valores estão de acordo com os valores encontrados para genes mitocondriais para o DNA *barcode* de outros animais (TAVARES et al. 2006; WARD et al., 2007).

Análise baseada em caracteres:

A Tabela 2.3 mostra os estados de caracteres de 64 posições de nucleotídeos do gene Cox1 para nove espécies de *Pimelodella*.

Tabela 2.3: Estados de caracteres de 64 posições de nucleotídeos do gene Cox1 para nove espécies de *Pimelodella*.

Posição																		
Espécies	39	45	48	63	69	75	78	84	87	120	180	207	237	246	255	258	267	273
<i>P. lateristriga</i>	T	G	A	G	A	G	T	C	A	T	T	A	C	T	T	C	C	C
<i>P. lateristriga</i> (2)	T	G	A	A	A	G	T	C	A	T	T	A	C	T	T	C	C	C
<i>P. gracilis</i>	T	G	A	A	A	G	T	C	A	T	T	A	C	T	T	C	C	C
<i>P. transitoria</i>	T	G	A	A	A	G	T	C	A	T	T	A	C	T	T	C	C	C
<i>P. kronei</i>	T	G	A	A	A	G	T	C	A	T	T	A	C	T	T	C	C	C
<i>P. australis</i>	A	G	T	A	A	A	T	C	A	G	C	A	C	C	C	C	C	C
<i>P. gracilis</i> (2)	A	A	A	A	A	A	T	G	A	T	C	A	C	C	C	C	C	C
<i>P. gracilis</i> (3)	A	A	A	A	A	A	T	G	A	T	C	A	C	C	C	T	C	C
<i>P. gracilis</i> (4)	A	A	A	A	G	A	T	G	A	T	C	A	C	C	C	C	C	C
<i>P. vitatta</i>	A	A	A	A	A	A	T	G	C	T	C	A	T	C	C	C	C	C
<i>P. spelaea</i>	A	A	A	A	A	A	T	A	A	T	C	A	C	C	C	C	C	C
<i>P. mucosa</i>	A	A	A	T	G	A	T	T	A	C	C	C	C	C	T	C	T	C
<i>P. gracilis</i> (5)	A	A	A	A	A	A	T	T	A	T	C	A	C	C	C	C	C	C
<i>P. mucosa</i> (2)	A	C	A	T	A	G	C	G	T	T	C	A	C	C	C	C	C	A
<i>P. sp</i>	A	G	A	T	A	G	T	G	T	T	C	A	C	T	C	C	C	T
<i>Rhamdia</i>	A	A	A	A/G	A	A	T	G	C	T	C	C/T	C/T	C	T	C	C	C/T
<i>Imparfinis</i>	A/C	T/G	A	C	A	C	C	A	G	T	C/T	C/T	T	C	G/C	T/C	C	T

Espécies	285	288	300	315	339	345	346	348	354	357	360	363	388	405	414	418
<i>P. lateristriga</i>	C	T	G	C	C	C	C	A	T	C	G	T	C	G	C	A
<i>P. lateristriga</i> (2)	C	T	G	C	C	C	C	G	T	C	G	T	C	G	C	C
<i>P. gracilis</i>	C	T	G	C	C	C	C	A	T	C	G	T	C	G	C	G
<i>P. transitoria</i>	C	T	G	C	C	C	C	A	T	C	G	T	C	G	C	G
<i>P. kronei</i>	C	T	G	C	C	C	C	A	T	C	G	T	C	G	C	G
<i>P. australis</i>	C	C	A	A	T	T	T	A	T	C	A	T	C	G	T	G
<i>P. gracilis</i> (2)	C	T	A	C	T	C	C	A	C	A	A	T	C	G	C	G
<i>P. gracilis</i> (3)	C	T	A	C	T	C	C	A	C	A	A	T	C	A	C	G
<i>P. gracilis</i> (4)	C	T	A	C	T	C	C	A	C	A	A	T	C	G	C	G
<i>P. vitatta</i>	T	T	A	C	T	C	C	A	T	A	A	T	C	A	T	G
<i>P. spelaea</i>	C	C	A	T	T	C	C	A	T	A	A	T	C	G	C	G
<i>P. mucosa</i>	C	T	A	C	C	C	C	A	C	A	A	C	C	G	C	A
<i>P. gracilis</i> (5)	C	T	A	C	C	C	C	A	C	A	A	C	C	A	C	A
<i>P. mucosa</i> (2)	C	T	A	C	T	C	C	G	C	T	G	T	T	A	C	G
<i>P. sp</i>	C	C	A	C	T	C	C	A	C	A	G	T	C	G	C	G
<i>Rhamdia</i>	A	T	A	C	C/T	C	C	A	T	T	C	C	C	A/G	T	A
<i>Imparfinis</i>	G/C	A/T	T	T/A/G	T	T/C	T/C	A/C	T/C	A/C	G/C	T/C	C	A/T	C/T	G/T

Espécies	423	441	447	450	462	465	468	480	486	489	495	498	503	505	507	519	537
<i>P. lateristriga</i>	A	C	C	T	A	C	T	A	C	G	G	G	T	C	G	A	G/A
<i>P. lateristriga (2)</i>	A	C	T	T	A	T	T	A	C	G	G	G	T	C	G	A	G
<i>P. gracilis</i>	A	C	C	T	A	T	T	A	C	G	G	G	T	C	G	A	G
<i>P. transitoria</i>	A	C	C	T	A	T	T	A	C	G	G	G	T	C	G	A	G
<i>P. kronei</i>	A	C	C	T	A	T	T	A	C	G	G	G	T	C	A	A	G
<i>P. australis</i>	A	C	T	C	G	T	T	G	G	A	A	A	C	C	A	A	G
<i>P. gracilis (2)</i>	C	C	T	C	A	T	T	A	A	A	G	A	T	C	A	A	G
<i>P. gracilis (3)</i>	C	C	T	T	A	T	T	A	A	A	G	A	T	C	A	A	G
<i>P. gracilis (4)</i>	C	C	T	T	A	T	T	A	A	A	G	A	T	C	A	A	A
<i>P. vitatta</i>	C	T	T	C	A	T	T	A	A	A	G	A	T	C	A	A	G
<i>P. spelaea</i>	T	C	T	C	A	T	T	A	A	A	A	A	C	C	A	A	G
<i>P. mucosa</i>	C	C	T	C	A	T	C	A	A	A	A	A	C	C	A	A	G
<i>P. gracilis (5)</i>	C	C	T	C	A	T	T	A	A	A	G	A	T	C	A	A	G
<i>P. mucosa (2)</i>	A	T	T	C	A	C	T	A	A	A	A	G	T	T	A	G	G
<i>P. sp</i>	A	T	T	C	A	T	T	A	A	A	A	A	T	C	A	A	G
<i>Rhamdia</i>	T/A	C	T	C	C	C/T	T	A	T	A	A	A	TC	T	A	A	T/C
<i>Imparfinis</i>	C/A	T/C	T/C	C	A	T/C	C/T	A	T/C	A	G	G	C	C	T	T	A

Espécies	540	549	555	558	564	568	576	583	591	603	606	610	612
<i>P. lateristriga</i>	A	C	A	T	G	C	T	C	T	C	C	A	T
<i>P. lateristriga (2)</i>	A	C	A	T	G	C	T	C	T	C	C	A	T
<i>P. gracilis</i>	A	C	A	T	G	C	T	C	T	C	C	A	T
<i>P. transitoria</i>	A	C	A	T	G	C	T	C	T	C	C	A	T
<i>P. kronei</i>	A	C	A	T	G	C	T	C	T	C	C	A	T
<i>P. australis</i>	A	T	T/C	C	A	C	C	C	T	C	T	G	T
<i>P. gracilis (2)</i>	A	C	A	T	A	C	C	C	C	C	C	A	T
<i>P. gracilis (3)</i>	A	C	A	T	A	C	C	C	C	C	C	A	T
<i>P. gracilis (4)</i>	A	C	A	T	A	C	C	C	C	C	C	A	T
<i>P. vitatta</i>	C	C	A	T	A	T	C	T	T	C	C	A	T
<i>P. spelaea</i>	A	C	A	T	A	C	C	C	C	C	C	A	T
<i>P. mucosa</i>	A	C	G	T	A	C	C	C	C	C	C	A	T
<i>P. gracilis (5)</i>	A	C	A	T	A	C	C	C	T	C	C	A	T
<i>P. mucosa (2)</i>	A	C	A	T	A	C	C	C	C	C	C	A	A
<i>P. sp</i>	A	C	A	T	A	T	T	T	T	T	C	G	C
<i>Rhamdia</i>	A	T	C/T	T	A	T/C	C	C	C	C	A	A	T
<i>Imparfinis</i>	T/A	T	G/T/A	C/T	C	T/C	C	T/C	T/C	C	G/A	A	A

Cinco, das nove espécies tentativamente identificadas, *P. australis*, *P. gracilis*, *P. speleae*, *P. vitatta* e *P. gracilis 2*, revelaram uma combinação única de caracteres nas 61 posições com pelo menos quatro CAs cada. Outra

espécie de *Pimelodella* ainda não identificada, aqui denominada *Pimelodella* sp, de São Gabriel da Cachoeira na bacia do Amazonas, foi diagnosticada por sete nucleotídeos. As oito amostras previamente identificadas morfológicamente como *P. mucosa* foram subdivididas em dois grupos: *P. mucosa1* foi diagnosticado por seis CAs e *P. mucosa2* por 11. O primeiro grupo é composto por amostras do rio Aquidauana, enquanto o segundo por três amostras do rio Cuiabá e uma do Rio Aquidauana. Neste caso específico de *P. mucosa* tanto os dados de distância como na análise baseada em caracteres sugerem que nos rios Cuiabá e Aquidauana existam duas espécies de *Pimelodella*. Esses resultados, entretanto deverão ser investigados com outros caracteres morfológicos por um taxonomista.

Dos 135 espécimes de *Pimelodella* analisados neste estudo, 61 foram identificados morfológicamente como *Pimelodella gracilis* e, como foram coletadas em 12 diferentes localidades na bacia do Alto Paraná, permitiram testar a utilidade do uso do código de barras de DNA baseado em caracteres para identificação de populações da mesma espécie. Esses exemplares de *Pimelodella* foram agrupados em dois grandes grupos distintos. O grupo maior, composto por 57 indivíduos coletados, foi dividido em quatro subgrupos Pg1, Pg2, Pg3 e Pg4 (Tabela 2.3), o grupo menor (Pg5) é composto por quatro indivíduos do Rio do Peixe, Mariápolis, SP. Foi possível detectar caracteres diagnósticos para os quatro subgrupos (Tabela 2.3). Pg2 foi diagnosticada por três nucleotídeos (posições 123, 291 e 342); Pg3 diferiu em relação aos outros subgrupos também por três nucleotídeos (posições 258, 282 e 405). Pg4 pode ser distinguido de outras populações por meio de dois CAs nas posições 69 e 537 e Pg5 apresentou seis CAs em posições de nucleotídeos 84, 339, 363, 418. Pg1 e Pg2 foram diagnosticados através de um nucleotídeo (450).

Entre *P. lateristriga*, *P. kronei* e *P. transitoria* apenas um caráter diagnóstico foi encontrado (Tabela 2.3, a posição 418: A, C, G, respectivamente). Quando consideramos apenas *P. kronei* e *P. transitoria* este não é um resultado surpreendente, uma vez que se acredita que *P. transitoria* seja o ancestral epígeo de *P. kronei* (TRAJANO 1987, 2007), mas

a inclusão de *P. lateristriga* neste grupo ainda precisa ser melhor investigada utilizando novos caracteres morfológicos. Entretanto, quando consideramos as três espécies como um grupo, foram encontrados 16 caracteres diagnósticos, o que reforça a ideia de que *P. lateristriga*, *kronei* e *transitoria* possam ser um complexo de espécies.

P. kronei e *P. transitoria* foram descritas por Ribeiro, em 1907 e, inicialmente, alocadas em dois gêneros diferentes, *Typhlobagrus kronei* e *Pimelodella transitoria*. A principal diferença entre eles é a redução ou ausência de pigmentação e de olhos em *kronei*. Eigenmann (1917) em sua revisão do gênero *Pimelodella* reconheceu a estreita relação entre os dois gêneros e Pavan (1946) foi o primeiro a usar o nome *Pimelodella kronei*.

Trajano e Britski (1992) em um estudo mais detalhado observaram um espinho na nadadeira dorsal menor em *P. kronei*. No entanto, a redução desse espinho, que geralmente é utilizado como um mecanismo de defesa contra predadores, pode ser análoga à redução da pigmentação e dos olhos, pois não existem, em cavernas, predadores para este peixe em cavernas. O fato de que: 1. há uma variação contínua do tamanho, pigmentação e tamanho dos olhos, 2. não haver diferenças morfológicas significativas quando essas duas espécies são comparadas e, 3. ocorrência de suposta hibridação natural, uma vez que as duas espécies são simpátricas levou Trajano (1987 e 2007) a considerar a possibilidade de elas serem populações da mesma espécie. Um estudo citogenético indicando número e fórmulas cromossômicas idênticas, padrão e localização de bandas C similares corrobora os dados morfológicos a respeito da estreita relação e até mesmo co-especificidade entre os bagres epígeos e de caverna (ALMEIDA-TOLEDO et al., 1992).

Análise morfológica:

É nítida a necessidade de uma revisão taxonômica no grupo. Diversas descrições se sobrepõem, e há incongruência nas informações, como por

exemplo, se o filamento presente em algumas espécies poder ser uma característica ligada ao sexo ou não.

Para a análise morfológica, todo o material obtido foi comparado com dados existentes na literatura. Há poucas informações que elucidem as questões existentes na sistemática de *Pimelodella*.

Dados numéricos foram transcritos na forma de tabelas para facilitar a análise, enquanto as ilustrações foram comparadas com as já existentes na literatura para a análise das estruturas.

Identificação das espécies de *Pimelodella*

Para a melhor delimitação das espécies, foram feitas medições de morfometria, as quais foram comparadas com os dados obtidos na literatura sobre o gênero. Para a comparação entre espécies semelhantes, as medições de cada espécie foram comparadas com a sua semelhante, através de uma análise de regressão linear dos valores obtidos dois a dois (comprimento padrão ou comprimento da cabeça *versus* algum parâmetro muito utilizado na literatura descritiva das espécies). As comparações foram feitas com base nas seguintes medidas:

- Distância interorbital x Comprimento da cabeça
- Diâmetro orbital x Comprimento da cabeça
- Comprimento da nadadeira adiposa x Comprimento padrão
- Comprimento pré-anal x Comprimento padrão
- Comprimento pré-pélvico x Comprimento padrão

As figuras correspondentes aos gráficos, bem como as tabelas de morfometria com as medidas mínima, máxima e média encontradas por espécie, além do desvio padrão e o número de indivíduos observados se encontram anexo.

Material examinado:

Foram examinados exemplares das seguintes espécies:

▪ 56 exemplares de *P. lateristriga* examinados, sendo 5 exemplares medidos. *P. lateristriga*: LBP 3660, (Rio Passa Sete, Morretes, Estado do Paraná, Brasil), 2 ex.; LBP 3475, (Afluente Rio Aduelas, Macaé, Estado do Rio de Janeiro, Brasil), 7 ex.; LBP 3463, (Afluente Córrego Juvêncio, Campo dos Goyatacazes, Estado do Rio de Janeiro, Brasil), 5 ex.; LIRP 7243, (Trecho encachoeirado do Rio Itabapoana localizado no final do reservatório da UHE Rosal, Bom Jesus do Itabapoana, Estado do Rio de Janeiro, Brasil), 16 ex.; LIRP 7248, (Rio Itabapoana localizado a 500 m no final do reservatório da UHE Rosal, conhecido como "Poço Morto", Bom Jesus do Itabapoana, Estado do Rio de Janeiro, Brasil), 3 ex.; LIRP 6839, (Rio Itabapoana, Mimoso do Sul, Estado do Espírito Santo, Brasil), 3 ex.; LIRP 7039, (Rio Itabapoana, trecho de vazão reduzida e encachoeirado, na jusante do eixo da barragem da UHE Rosal, Guaçuí, Estado do Espírito Santo, Brasil), 1 ex.; LIRP 273, (Rio Santo Antonio: Rio Santo Antonio, afluente do Rio Doce. B. Paraná, Joanésia, Estado de Minas Gerais, Brasil), 1 ex.; LIRP 959, (Curso inferior do Rio Inderé. B. Cost. Atlântico, Ubatuba, Estado de São Paulo, Brasil), 3 ex.; LIRP 8142, (Rio que corta a estrada RJ155 na altura do município de Frade, Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro, Brasil), 15 ex.

Espécie encontrada apenas em áreas de drenagem costeira. Apresenta um espinho peitoral portador de diversos dentículos grandes, ocupando aproximadamente $\frac{3}{4}$ do espinho (vide EIGENMANN, 1917, plate XXXV; GUZZELLI, 1997, p 102). A adiposa em geral é mais curta (média de 29% CP), entretanto, se compararmos com os dados obtidos em *P. gracilis*, não foram encontradas diferenças significativas tanto nesta como em nenhuma das outras medidas tradicionalmente usadas na identificação do gênero. Desta forma, apenas o espinho peitoral e a localidade apresentam caracteres informativos para a diagnose da espécie. Dados de morfometria podem ser encontrados na Tabela 2.4.

▪ 45 exemplares de *P. australis* examinados, sendo 5 exemplares medidos.

P. australis: LBP 3365, (Arroio dos Corrientes, Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil), 28 ex; LIRP 424, (Arroio das Pedras. B. Paraná, Osório, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil), 17 ex.

De fácil identificação, a espécie é encontrada na bacia do rio Uruguai e em drenagens costeiras de Tubarão, em Santa Catarina, até os lagos do Rio Grande do Sul (BOCKMANN & GUAZZELLI, 2003). Apresenta uma pigmentação característica, sendo que da região posterior à placa pré-dorsal partem duas faixas escuras, estreitas, que contornam a base da nadadeira dorsal, além de uma mancha de coloração escura, em forma de sela, entre as nadadeiras dorsal e adiposa, esta apresentando duas faixas escuras contornando-a, semelhante ao ocorrido na nadadeira dorsal (GUAZZELLI, 1997). Outros dados de morfometria podem ser encontrados na Tabela 2.5.

▪ 8 exemplares de *P. transitoria* examinados, sendo 8 exemplares medidos.

P. transitoria: LIRP 1033, (PETAR, Iporanga, Estado de São Paulo, Brasil), 2 ex.; LIRP 1047, (Rio Betari - PETAR, Estado de São Paulo, Brasil), 1 ex.; LIRP 1036, (Rio Betari - PETAR, Estado de São Paulo, Brasil), 5 ex.

Espécie descrita do Vale do Ribeira, em São Paulo. Apresenta grande semelhança com *P. lateristriga* (EIGENMANN, 1917), sendo separada desta quase que apenas devido à localidade. Dados de morfometria em anexo (Figura 2.4 e Tabela 2.6) corroboram a hipótese de que talvez *P. transitoria* e *P. lateristriga* são dificilmente diferenciáveis morfologicamente. Um dos gráficos apresentados na figura 2.4 mostra a única medida que apresentou diferença significativa para as duas espécies (diâmetro orbital x comprimento da cabeça). O espinho peitoral pode apresentar ligeira diferença entre as espécies, sendo que em *P. transitoria* os dentes presentes no espinho ocupam pouco mais de metade deste, sendo também, geralmente, menores, em comparação com o tamanho total do espinho. O espinho peitoral de *P. lateristriga* geralmente apresenta sua extremidade distal mais retilínea, com o ápice ligeiramente voltado anteriormente (GUAZZELLI, 1997, p 102), enquanto o espinho peitoral de *P. transitoria* não apresenta tal

conformação, tendo seu ápice não voltado anteriormente (GUAZZELLI, 1997, p 87).

▪ Não tínhamos exemplares de *P. kronei* para examinar e medir.

Também descrita do Vale do Ribeira, facilmente identificável pela redução parcial ou total dos olhos (TRAJANO, 1996), além de apresentar no geral uma coloração mais clara. Entretanto, demais características são bastante similares às encontradas em *P. transitoria*, com a qual existe em simpatria. Guazzelli (1997) afirma que a distância dorsal-adiposa pode diferenciar *P. kronei* de *P. transitoria* e *P. lateristriga*, entretanto, encontramos certa sobreposição nas medições quando observamos o gráfico de Distância dorsal-adiposa x Comprimento padrão da Figura 3, o qual abrange as três espécies acima mencionadas. Demais gráficos pertinentes (comprimento da nadadeira adiposa, pré-anal e pré-pélvico, *versus* comprimento padrão) são apresentados também na Figura 2.5, demonstrando a pequena diferença morfométrica apresentada entre *P. kronei* e *P. transitoria*. Outros dados de morfometria podem ser encontrados na Tabela 2.7.

▪ 8 exemplares de *P. avanhandavae* examinados, sendo 8 exemplares medidos.

P. avanhandavae: LBP 7265, (Rio Arapuça, Bela Vista de Goiás, Estado de Goiás, Brasil), 8 ex.; LIRP 7162, (Rio Paranaíba, ao lado da ponte da BR 365 MG/GO. Jusante da UHE São Simão. Água bastante agitada, São Simão, Estado de Goiás, Brasil), 1 ex.; LIRP 7167, (Rio Meia Ponte, afluente do Rio Paranaíba, UHE São Simão. Água com correnteza moderada, Cachoeira Dourada, Estado de Goiás, Brasil), 1 ex.; LIRP 7348, (Rio Araguari, imediatamente a jusante da barragem da UHE Miranda, Uberlândia, Estado de Minas Gerais, Brasil), 1 ex.; LIRP 6682, (Rio Araguari,

imediatamente a jusante da barragem da UHE Miranda, Uberlândia, Estado de Minas Gerais, Brasil), 1 ex.; LIRP 6538, (Rio Paranaíba. UHE Emborcação, imediatamente a jusante do barramento, na saída do vertedouro e 1ª curva, Araquari, Estado de Minas Gerais, Brasil), 1 ex.; LIRP 6955, (Rio Paranaíba, ao lado da ponte da BR 365 MG/GO. Jusante da UHE São Simão. Água bastante agitada, São Simão, Estado de Goiás, Brasil), 1 ex.; LIRP 6835, (Rio Paranaíba, ao lado da ponte da BR 365 MG/GO. Jusante da UHE São Simão. Água bastante agitada, São Simão, Estado de Goiás, Brasil), 1 ex.; MZUSP 22829, (Rio Paraná, em frente a Jupiá, Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil).

Compreende parte dos lotes examinados pertencentes ao Alto Paraná e Paranaíba. Todos os espécimes observados apresentam faixa dorsal característica (vide plate XXIX em Eigenmann, 1917), que se estende por praticamente toda a extensão dorsal do corpo, do final da cabeça até o final da adiposa, de ambos os lados das nadadeiras dorsal e adiposa. Dentre os dados de morfometria, aquele que se apresentou de maior validade na delimitação da espécie e sua separação de *P. avanhanvavae* e *P. gracilis* foi o tamanho da nadadeira adiposa, maior em *P. avanhandavae*. Entretanto, o tamanho da adiposa se mostrou de maior influência na separação de *P. avanhandavae* de todas as outras espécies de *Pimelodella* observadas (em média, 40% do CP), exceto *P. mucosa* (entre 40% e 49% do CP) e *P. sp.n.* amazônica (único exemplar, 39,6%), ambas de localidades muito distantes de *P. avanhandavae*, e que também apresentam outras características distintivas. Outros dados de morfometria podem ser encontrados na Tabela 2.8.

▪ 11 exemplares de *P. laurenti* examinados, sendo 5 exemplares medidos. *P. laurenti*: LIRP 4258, (Rio Paraopeba, Faz. Tamanduá, Felixlândia, Estado de Minas Gerais, Brasil), 2 ex.; LIRP 4859, (Córrego Corrente, na Fazenda do Corrente, ca. de 70km NO de Jequitaiá, Estação 9, Jequitaiá, Estado de Minas Gerais, Brasil), 3 ex.; LIRP 4876, (Rio Embaiassaia, afluente da margem esquerda do Rio Jequitaiá, Estação 5, Francisco

Dumond, Estado de Minas Gerais, Brasil), 1 ex.; LIRP 8153, (Rios epígeos da região de Cordisburgo, Cordisburgo, Estado de Minas Gerais, Brasil), 5 ex.

Apesar de não termos examinado exemplares de *P. vittata*, segundo os trabalhos que apresentam descrição das duas espécies, ambas são facilmente separadas (EIGENMANN, 1917; BRISTKI et al, 1984). Tanto a morfometria quanto outras características observadas corroboram a identificação dos exemplares que observamos como *P. laurenti* (inclusive o exemplar MZUSP 63459, que estava identificada como *P. vittata*)

Apesar de termos medido apenas cinco exemplares de *P. laurenti*, estes apresentam barbilhão maxilar no geral mais longo que o encontrado em *P. lateristriga*, a outra espécie com registro na Bacia do São Francisco além de *P. vittata* (66% a 82% do CP em *P. laurenti* X 33% a 69% em *P. lateristriga*). *P. laurenti* também apresenta em média o corpo mais alto (média de 19% do CP X média de 16% do CP para *P. lateristriga*). Entretanto, as outras características observadas em *P. laurenti* não apresentam diferença significativa de *P. lateristriga*. Outros dados de morfometria são apresentados na Tabela 2.9.

▪ 279 exemplares de *P. gracilis* examinados, sendo 117 exemplares medidos. *P. gracilis*: LBP 1059, (Rio Paraitinga, Salesópolis, Estado de São Paulo, Brasil), 18 ex.; LBP 4704, (Ribeirão Cubatão, Marapoama, Estado de São Paulo, Brasil), 1 ex.; LIRP 1625, (Córrego São Carlos, P. E. Morro do Diabo. Trecho Jusante. Bacia do Paraná, Teodoro Sampaio, Estado de São Paulo, Brasil), 1 ex.; LIRP 1697, (Córrego Sta Clara, Faz. Rancho Zinco e Cristo Rei, sub-bacia P. Paranapanema, Paranavaí, Estado do Paraná, Brasil), 1 ex.; LIRP 156, (Córrego Barro Branco, próximo à desembocadura no Rio Pardo, Fz. Santa Carlota, Bacia do Paraná, Cajuru, Estado de São Paulo, Brasil), 3 ex.; LIRP 2926, (Córrego das Laranjeiras, Faz. Três Corações, sub-bacia do Turvo-Grande, Olímpia, Estado de São Paulo, Brasil), 9 ex.; LIRP 101, (Fazenda Santa Carlota, Ribeirão sem nome ou Barra Branca: Rio Pardo, B. Paraná, Cajuru, Estado de São Paulo, Brasil), 4 ex.; LIRP 3893, (Rio das Mortes, sob primeira ponte na estrada Campo Verde à Chapada dos

Guimarães, Campo Verde, Estado do Mato Grosso, Brasil),4 ex.; LIRP 3883, (Rio das Mortes, sob primeira ponte na estrada Campo Verde à Chapada dos Guimarães, Campo Verde, Estado do Mato Grosso, Brasil),11 ex.; LIRP 668, (Rio Pardo, Bacia do Paraná, Brasil),4 ex.; LIRP 3803, (Rio Pardo, Bacia do Paraná, Ribeirão Preto, Estado de São Paulo , Brasil),2 ex.; LIRP 3175, (Fazenda Alex, Buri, Estado de São Paulo , Brasil),1 ex.; LIRP 2925, (Córrego Poço das Antas, sub-bacia do Alto rio Paranapanema, Angatuba, Estado de São Paulo , Brasil),1 ex.; LIRP 2924, (Córrego Virado, Faz. Santa Cecília, sub-bacia do Alto rio Paranapanema, Cerqueira César, Estado de São Paulo , Brasil),16 ex.; LIRP 3820, (Lagoa do Diogo, lagoa marginal do rio Mogi-Guaçu, Reserva Ecol. de Jataí, Luiz Antônio, Estado de São Paulo, Brasil),1 ex.; LIRP 5677, (Córrego do Sapezal, afluente da margem direita do ribeirão do Meio, afluente da margem esquerda do rio Mogi-Guaçu, Leme, Estado de São Paulo , Brasil),8 ex.; LIRP 3519, (Córrego São José ou Bocaina, sub-bacia do Sapucaí-Grande, Guará, Estado de São Paulo, Brasil),4 ex.; LIRP 4541, (Córrego da Guairuvira, sub-bacia do rio do Peixe, Pompéia, Estado de São Paulo , Brasil),6 ex.; LIRP 4030, (Afluente direito do Córrego Água Boa, sub-bacia do rio Aguapeí, Araçatuba, Estado de São Paulo , Brasil),16 ex.; LIRP 3175, (Rio Sapucaí, ponte na rodovia Cândido Portinari, Batatais e Franca, Estado de São Paulo , Brasil),11 ex.; LIRP 3939, (Confluência do Rib. do Cervo e do Córrego do Gato, B. Rio Turvo, Canarana, Estado do Mato Grosso, Brasil),1 ex.; LIRP 6223, (Ribeirão Guavira-Rio do Peixe, Pompéia, Estado de São Paulo , Brasil),7 ex.; LIRP 206, (Rio Pardo. B. Paraná, Santa Rosa de Viterbo, Estado de São Paulo, Brasil),32 ex.; LIRP 304, (Rio Pardo. B. Paraná, Ribeirão Preto, Estado de São Paulo , Brasil),9 ex.; LIRP 8146, (Rio Capivara, Botucatu, Estado de São Paulo , Brasil),26 ex.; LIRP 8145, (Rio São José, Bairro Avencal, a 28km de Guapiara, Guapiara, Estado de São Paulo , Brasil),5 ex.; LIRP 8150, (Rio do Peixe, na Fazenda Oswaldinho (porto de areia), Mariápolis, Estado de São Paulo , Brasil),10 ex.; LIRP 8151, (Estrada vicinal Antenor Moreira Silverio, sentido Ferreirada, São Miguel Arcanjo, Estado de São Paulo , Brasil),1 ex.; LIRP 8143, (Córrego que passa pelo canavial na Fazenda do Estado, Colina,

Estado de São Paulo, Brasil), 2 ex.; LIRP 8144, (Córrego do Tomaizinho no trevo de Cardoso, ao lado da Sabesp, Colina, Estado de São Paulo, Brasil), 3 ex.; LIRP 8147, (Calha principal do rio Mogi-guaçu, logo depois da queda da Cachoeira das Emas, Pirassununga, Estado de São Paulo, Brasil), 11 ex.; LIRP 8141, (Rio que corta uma pista de asfalto, 2km após a saída km167 da Anhanguera, Estado de São Paulo, Brasil), 49 ex.; LIRP 8149, (ponto 03, Pilar do Sul, Estado de São Paulo, Brasil), 6 ex.; MZUSP 36345, (Ladário, CODRASA, Corumbá, Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil); MZUSP 4426, (Rio Cuiabá, Santo Antônio do Leverger, Estado do Mato Grosso, Brasil); MZUSP 82381, (Rio Paraná, Porto Cabral, Estado de São Paulo, Brasil); MZUSP 24382, (Rio Tietê, Penápolis, Estado de São Paulo, Brasil); MZUSP 38033, (Rio Paraguai, Morrinhos, Corumbá, Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil).

Apesar de uma amplitude de valores considerável em quase todas as medidas, poucas diferenças significativas podem ser extraídas do que se identificou como *P. gracilis*. Mesmo a identificação dos espécimes sob este nome deve ser levada com certa cautela.

O que identificamos como *P. gracilis* foi feito com base em literatura de revisão para espécies do gênero (eg. MIRANDA RIBEIRO, 1914, EIGENMANN, 1917; FOWLER, 1941, VAN der STIGCHEL, 1946, 1964; MEES, 1974; GUAZZELLI, 1997, 2003). Infelizmente, não conseguimos a descrição original de Valenciennes (1835), nem o material tipo (MNHN A.9284). Entretanto, Bockmann & Guazzelli (2003) afirmam que a descrição em Valenciennes se deu com base em uma figura (1835: pl.2, fig 5) e uma breve descrição em Valenciennes (1847:7).

O que podemos concluir com todo o material analisado é uma grande dificuldade de delimitação para *P. gracilis*. Mesmo outras espécies encontradas nas sub-bacias do Paraná e que podem ser de alguma forma delimitada, mostram grande sobreposição de valores morfométricos (Figura 2.6) e características gerais com *P. gracilis* (eg. *P. avanhandavae* e *P. boschmai*). Isso nos leva a hipotetizar que pode haver grande intercruzamento entre as populações da bacia do Paraná, corroborado pelo

modo de vida mais vágil, diferente do encontrado na maioria dos heptapterídeos (BOCKMANN, 1998, 2003), e que tal intercruzamento pode se estender para populações de outras bacias, levando à ocorrência de *P. gracilis* em outras bacias. Espécimens semelhantes a *P. gracilis* foram encontrados nas bacias do Paraguai e Uruguai (eg. MZUSP 4426 e 36345) e na bacia do Araguaia-Tocantins (LIRP 3939, 3893 e 3883). Todas essas bacias apresentam outras espécies além de *P. gracilis*.

Mees (1974) faz uma análise detalhada comparativa de *P. gracilis* e *P. cristata*. Tais espécies são conhecidas no gênero por provavelmente abrigar um grande número de lotes identificados equivocadamente, o que resulta em registros para ambas que se estendem por quase toda a América do Sul (de bacias do Orinoco até La Plata). Tais identificações equivocadas provavelmente se devem a três fatores: os caracteres diagnósticos apresentam distribuição muito ampla pelas espécies do gênero, sendo extremamente homoplásticos; tais caracteres mudam consideravelmente durante a ontogenia do indivíduo; e caracteres de coloração são perdidos com o tempo, podendo dificultar a conferência posterior. É possível observar tal fato se compararmos a diagnose para ambas as espécies apresentada por Eigenmann (1917), na chave de identificação para o gênero:

“Lobo inferior caudal muito maior que o superior, lobo superior não muito desenvolvido, lobo inferior frequentemente mais longo; banda lateral, quando presente, estreita e linear; 13-14 dentes na face posterior da peitoral em espécimes com 83 mm de comprimento, aproximadamente 20-30 dentes mais frágeis em espécimes grandes, os espinhos mais distais às vezes com uma base larga e longa borda externa livre; barbilhões maxilares alcançando a origem, ou além do fim da adiposa

2. *cristata* (Müller & Troschel)”

“Lobo caudal superior normalmente grandemente prolongado, mas subigual nos jovens, não muito mais estreito que o lobo inferior; barbilhão maxilar sempre se estendendo ao menos após a base da anal; banda lateral, se presente, larga; espinho peitoral um pouco maior ou um pouco menor que o

espinho dorsal, com um número variável de dentes robustos em mais que metade da sua margem posterior

4. *gracilis* (Cuvier & Valenciennes)”

Mees (1974) argumentou que, com base nos exemplares observados, a variação do tamanho do barbilhão maxilar em *P. cristata* é considerável, podendo até mesmo ultrapassar a nadadeira caudal. Nas nossas observações encontramos uma amplitude grande de tamanho do barbilhão maxilar, alcançando desde a metade da nadadeira pélvica até o final da nadadeira anal.

Quanto ao espinho da peitoral, Eigenmann (1917) apresenta uma figura com a ilustração do espinho peitoral de todas as espécies até então conhecidas, e podemos observar certa semelhança daqueles designados a *P. cristata* e *P. gracilis* (em especial figs. 37 e 40, plate XXXV). Encontramos também grande semelhança no espinho peitoral de espécimes assinalados a *P. boschmai*, *P. meeki*, *P. avanhandavae* e *P. gracilis*. Em alguns lotes atribuídos a *P. gracilis* foi encontrada também variedade na morfologia do espinho peitoral, mas esse evento não pode ser quantificado pela existência de uma amplitude das características observadas para tal estrutura.

Para a morfologia da nadadeira caudal, encontramos poucos espécimes que apresentassem o lobo superior grandemente prolongado, sendo que na maioria dos exemplares esse lobo se apresentava apenas um pouco mais estreito que o inferior ou mesmo lobos iguais.

As semelhanças morfológicas entre *P. cristata* e *P. gracilis* pode ter resultado em diversas identificações equivocadas. Portanto, Eigenmann (1917) delimita que localidades para *P. gracilis* as quais não se encontrem nas bacias do Paraguai-Paraná-Uruguaí seriam duvidosas (indicadas por um sinal gráfico de interrogação). Mees (1974) concorda com tal suposição, citando que a localidade-tipo de *P. gracilis* provavelmente é do Rio Paraná, em Corrientes (Argentina) e restringe a identificação de *P. cristata* para espécimes provenientes apenas das Guianas enquanto aquelas provenientes de bacias amazônicas seriam *P. steindachneri*.

Quanto aos indivíduos provenientes de sub-bacias do Alto Paraná, podemos observar considerável amplitude de variação de características, de maneira que, apesar das diferenças, não foi possível separar morfologicamente as populações de *P. gracilis* provenientes de diferentes localidades (Figura 12 e Figura 13). Também foi possível concluir que as proporções morfométricas comumente usadas na diagnose de espécies de *Pimelodella* apresentam muitas vezes uma variação que uniria espécies nitidamente distintas, como *P. laurenti* e *P. gracilis* (Figura 14), que podem ser reconhecidas como espécies distintas apesar das similaridades morfométricas e de conexões entre o Alto Paraná o São Francisco (BUCKUP, 2011). Outras medições de morfometria podem ser encontradas na Tabela 2.10.

- 13 exemplares de *P. mucosa* examinados, sendo 01 exemplar medido.

P. mucosa: LBP 3774, (Rio Negro, Aquidauana, Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil), 10 ex.; LIRP 710, (Rio Cuiabá, próximo ao hotel Tuiuiu, Barão de Melgaço, Estado do Mato Grosso, Brasil), 1 ex.; LIRP 731, (Chácara Santa Rita, Lagoa às margens do Rio Cuiabá, Cuiabá, Estado do Mato Grosso, Brasil), 6 ex.; MZUSP 54319, (Rio Negro, Puerto Caballo, ca 2 km acima da boca, Alto Paraguay, Paraguai); MZUSP 54321, (Riacho Miranda, Estancia Puerto Miranda, ca 5 km de Puerto Voluntad, Alto Paraguay, Paraguai); MZUSP 54318, (Rio Miranda, ca 1000m acima da boca, logo acima da Estância Puerto Miranda, Alto Paraguay, Paraguai).

Espécie descrita da Bacia do Paraguai. Apresenta espinho da nadadeira peitoral bem característico, com dentes ocupando 2/3 do espinho. Entretanto, diferentemente de *P. gracilis*, os dentes mais distais são maiores e mais curvados que os proximais. O lobo ventral da nadadeira caudal é um pouco maior que o lobo dorsal, e apresenta barbilhão maxilar longo (56,8% a 87,3% do CP) (Tabela 2.11).

- 13 exemplares de *P. spelaea* examinados, sendo 01 exemplar medido.

P. spelaea: LIRP 8160, (Caverna São Bernardo, afluente subterrâneo do Rio São Bernardo, São Domingos de Goiás, Estado de Goiás, Brasil), 5 ex.

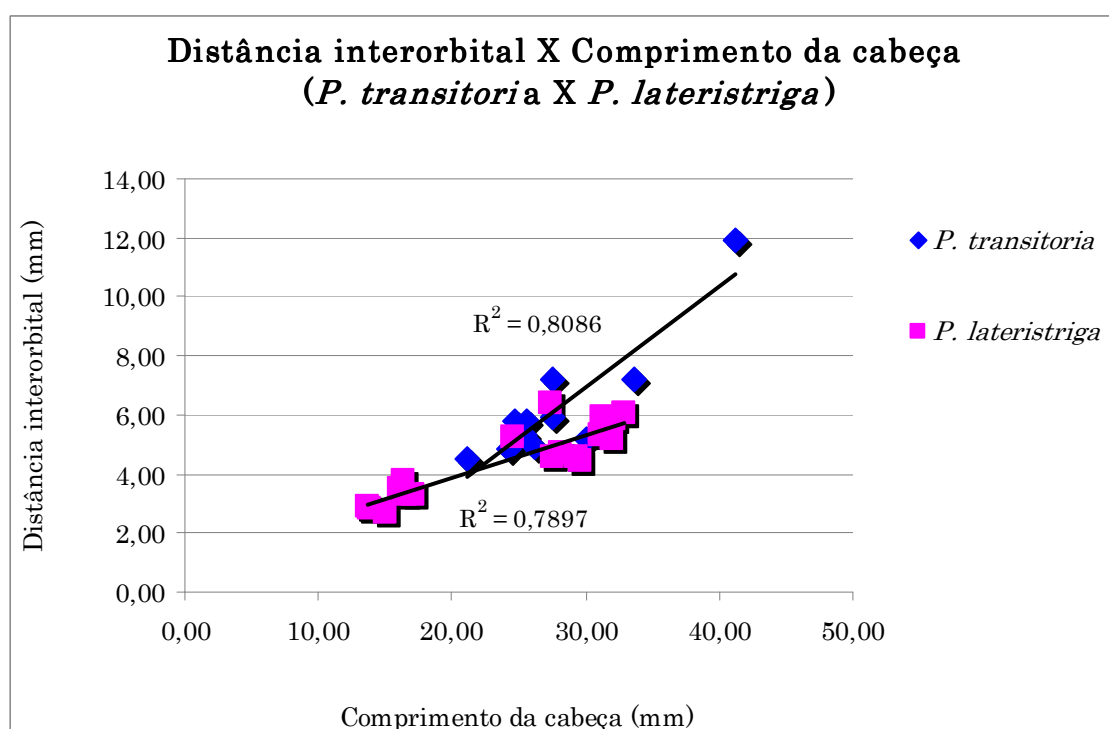
Por ter sido observado apenas um lote da espécie, não apresentamos aqui a descrição. Maiores detalhes sobre a espécie podem ser encontrados em Trajano et al. (2004).

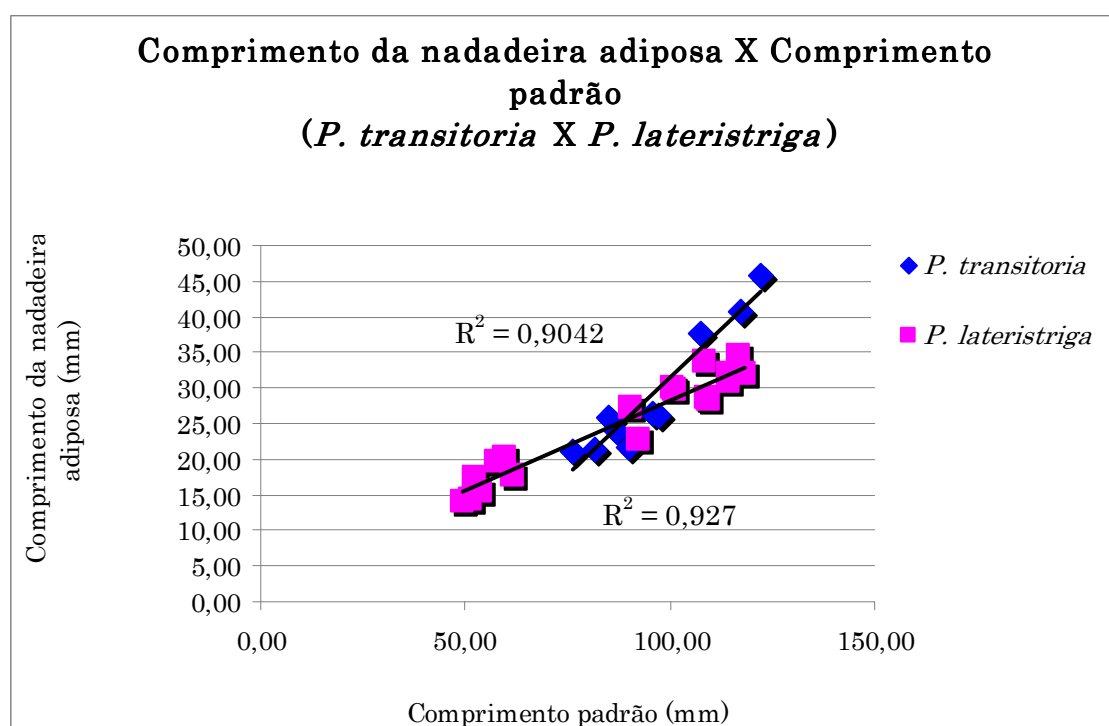
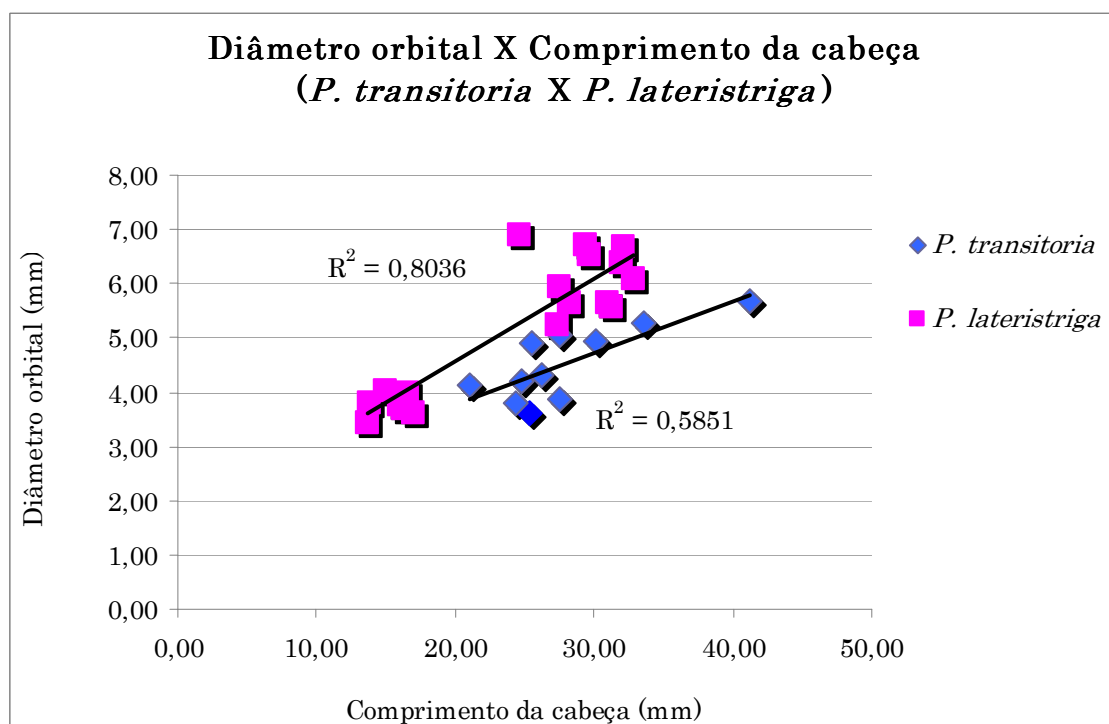
Pimelodella sp. nova da Amazônia

Observamos um lote com apenas um exemplar de São Gabriel da Cachoeira (AM), proveniente do INPA, que apresenta uma mancha de coloração escura na nadadeira dorsal, além de pequenos dentes no espinho da nadadeira peitoral. Bockmann (com. pes.) nos informou que pertenceria provavelmente a uma espécie ainda não descrita, sobre a qual ele está trabalhando a descrição. Portanto, não apresentamos também a descrição desta espécie, mas suas informações de morfometria se encontram na Tabela 2.12.

Gráficos comparativos de localidades e espécies

Figura 2.4: Gráficos para *P. transitoria* em comparação com *P. lateristriga*.





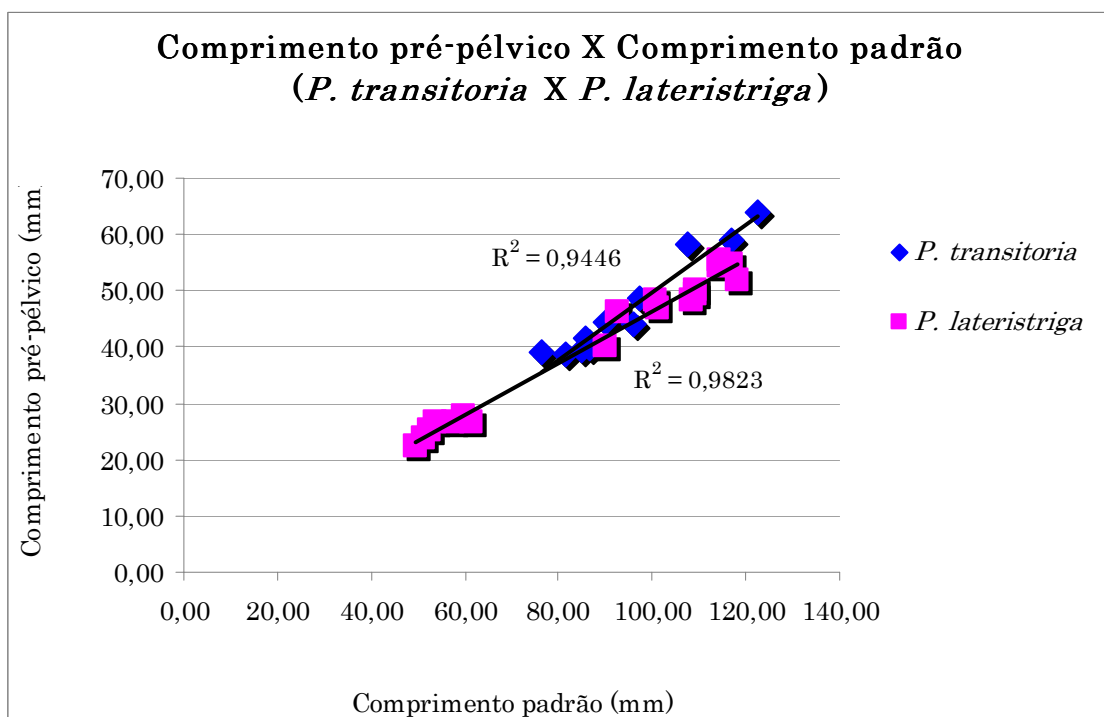
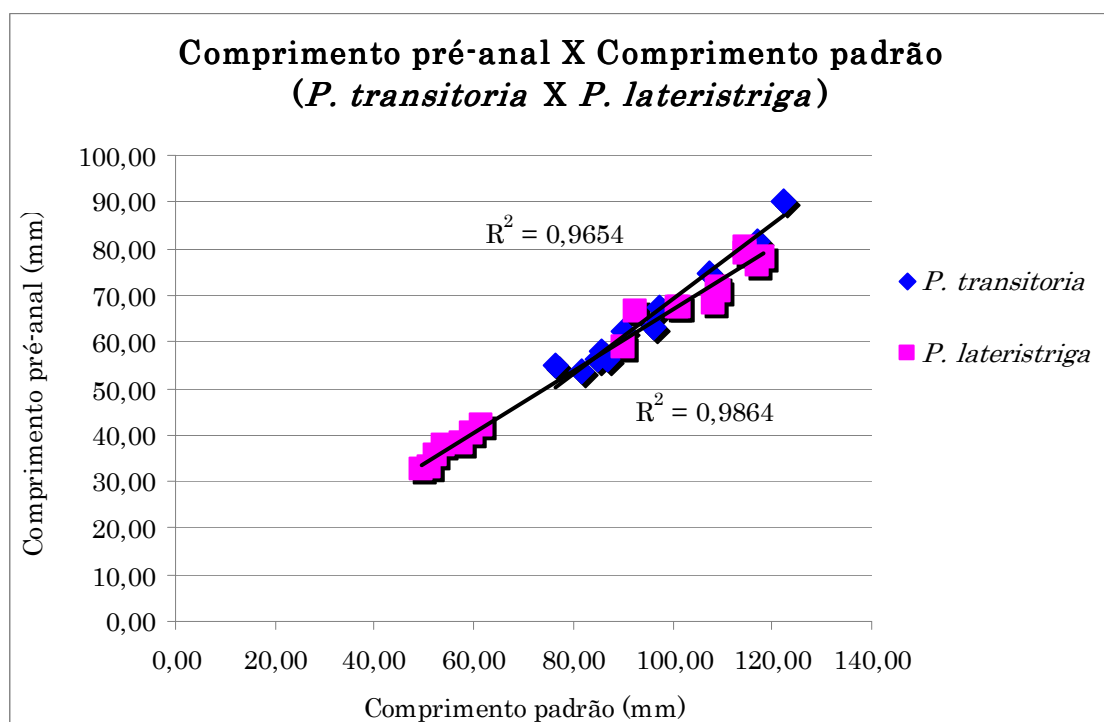
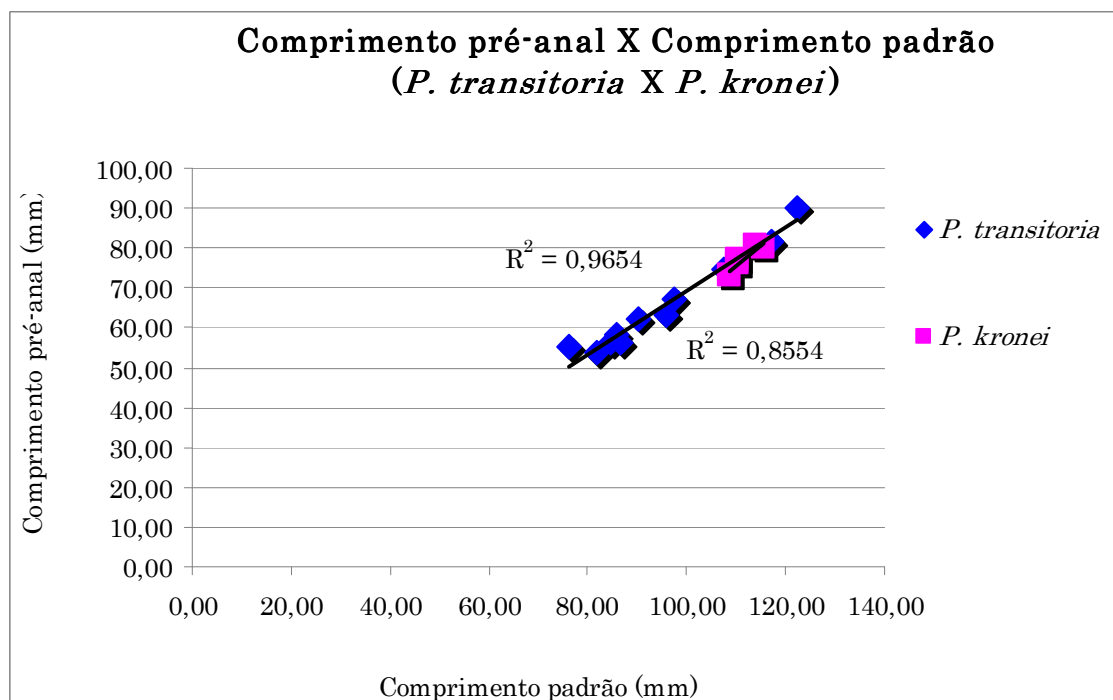
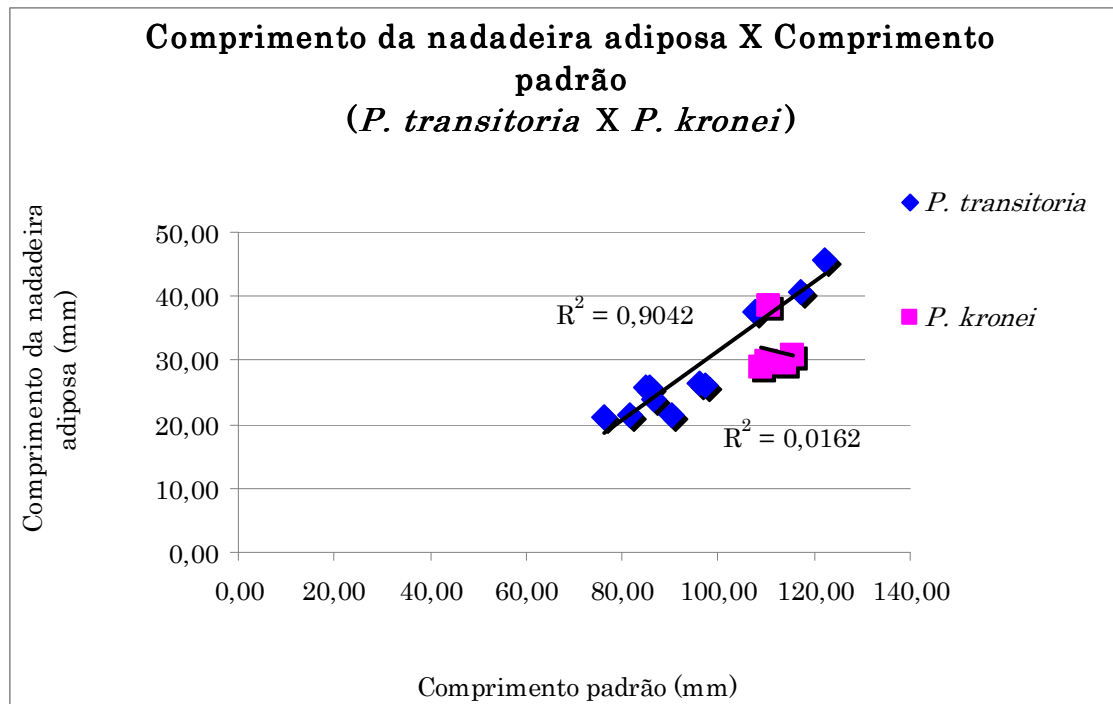


Figura 2.5: Gráficos para *P. transitoria* em comparação com *P. kronei* e *P. lateristriga*.



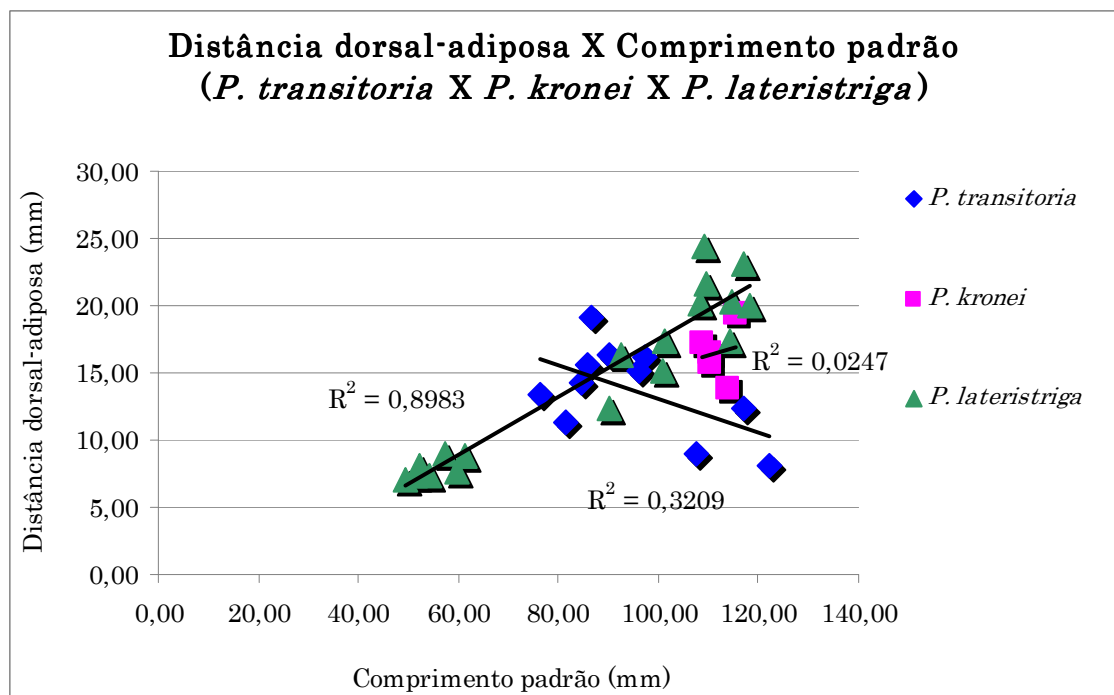
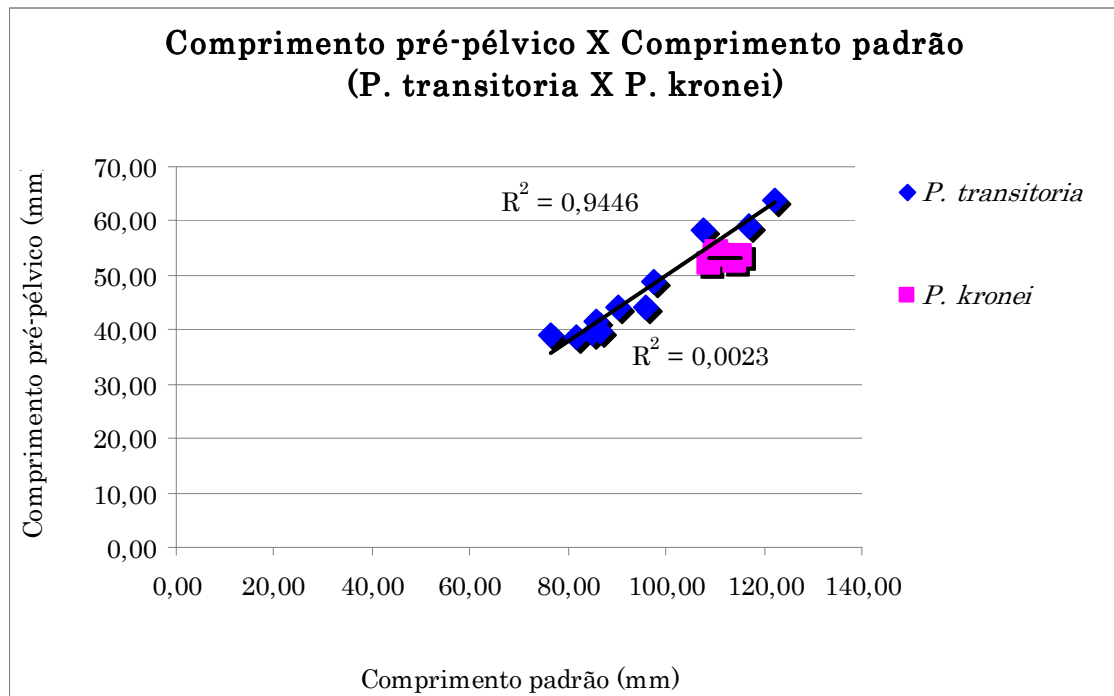
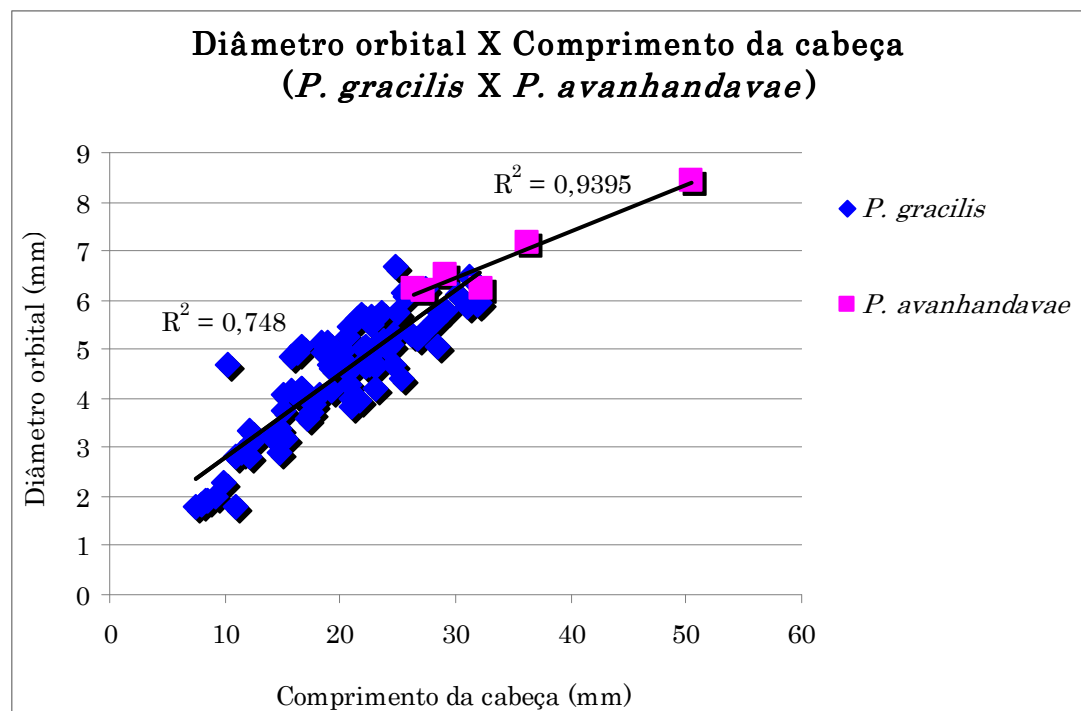
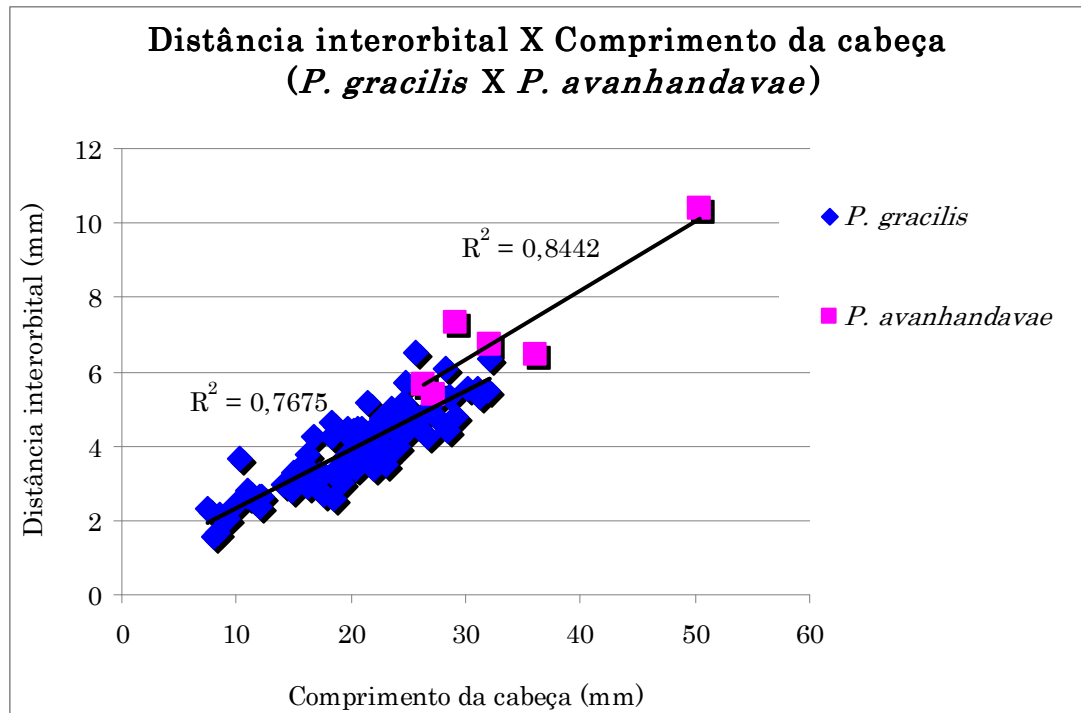


Figura 2.6: Gráficos para *P. gracilis* em comparação com *P. avanhandavae*.



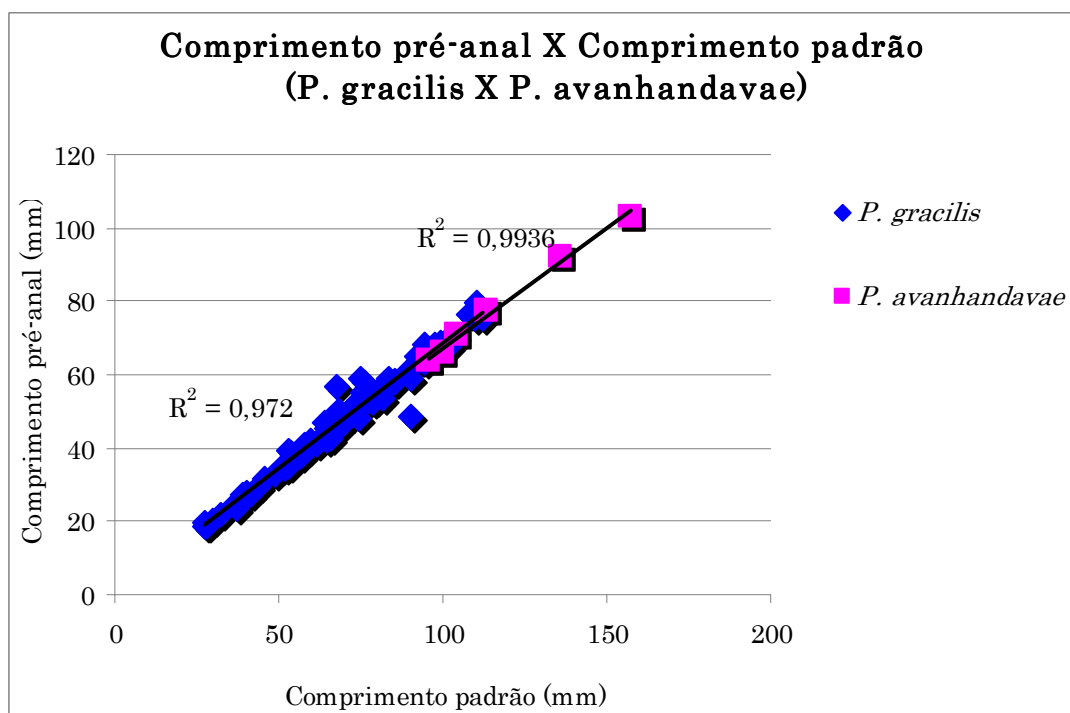
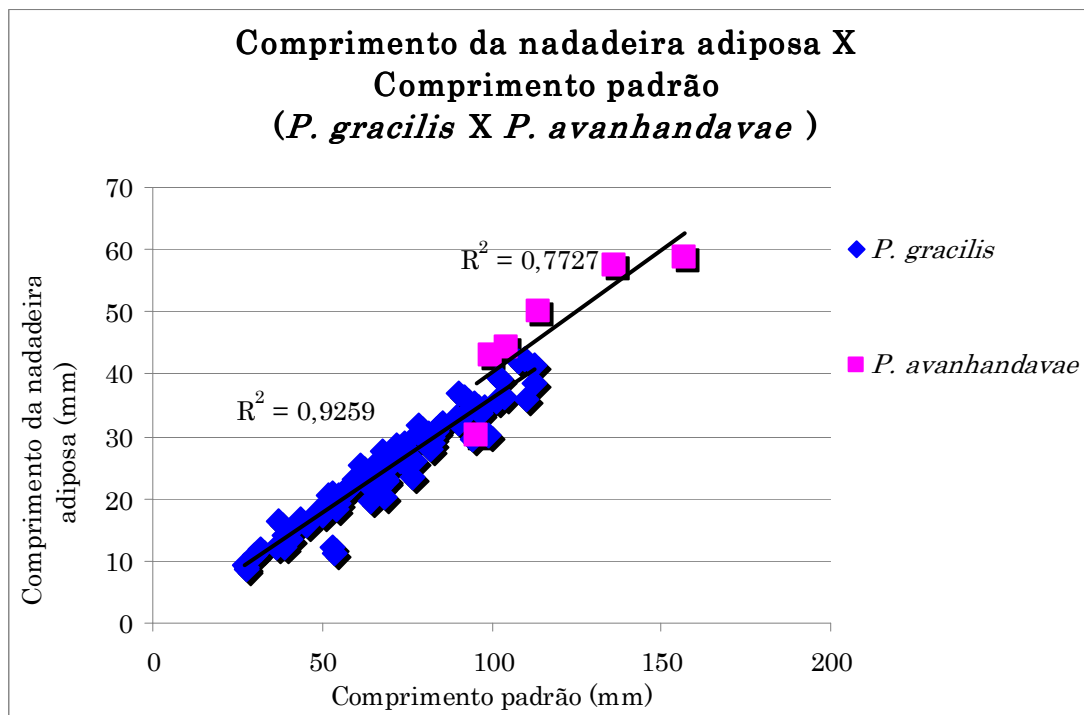
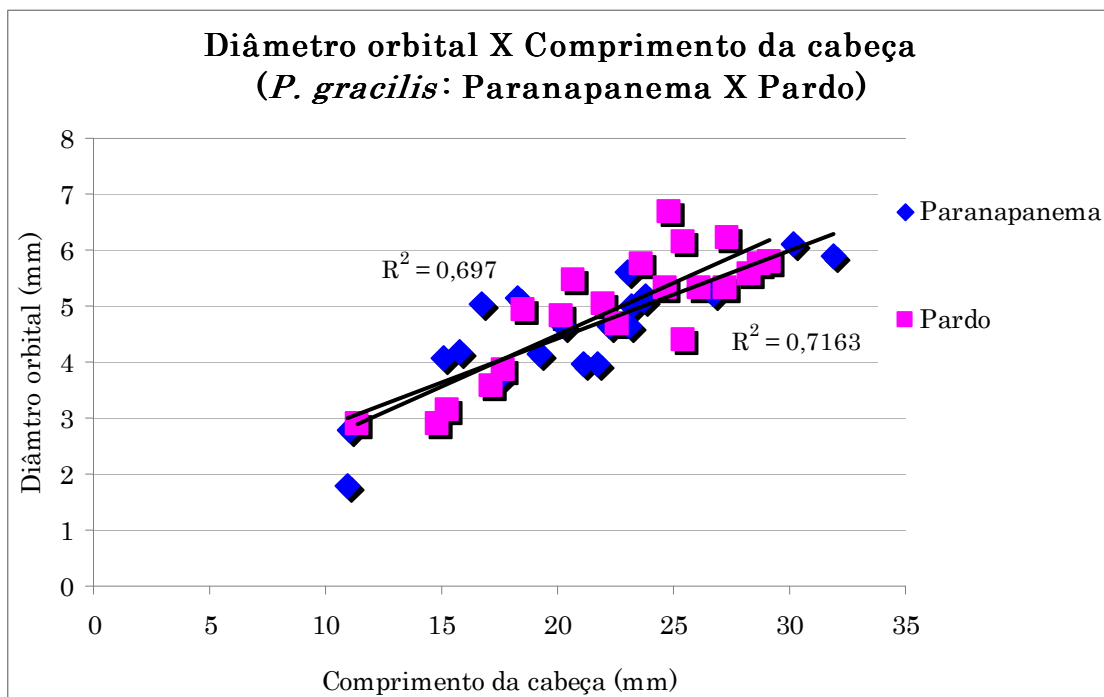
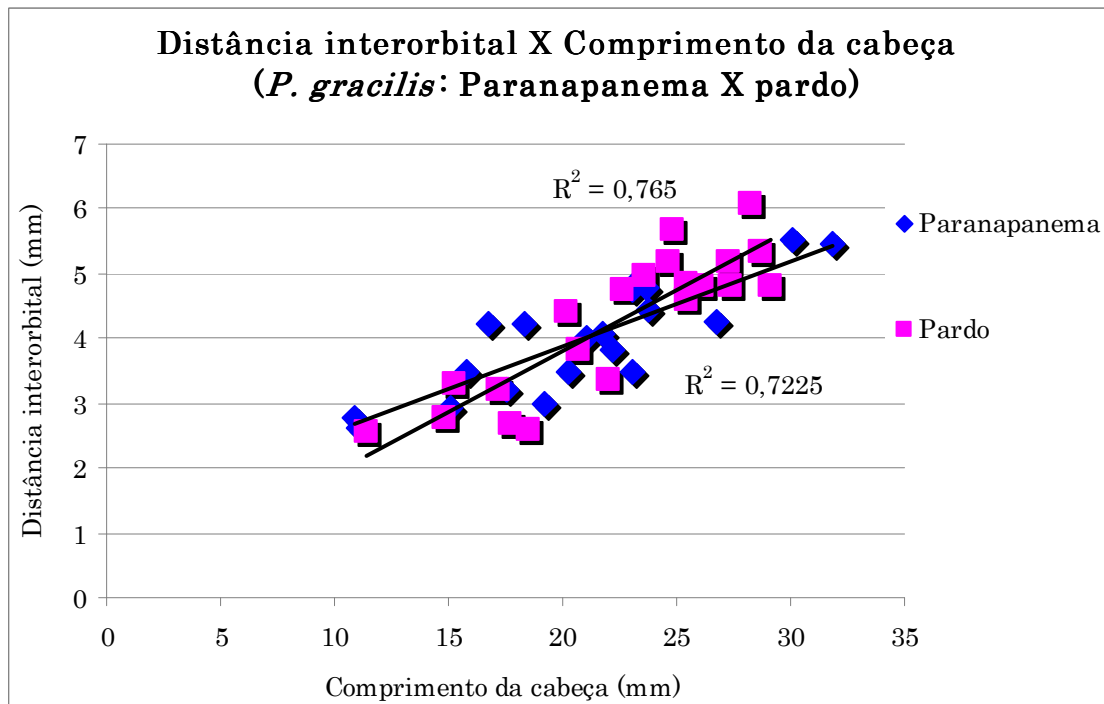


Figura 2.7: Gráficos para *P. gracilis* (Paranapanema e Pardo).



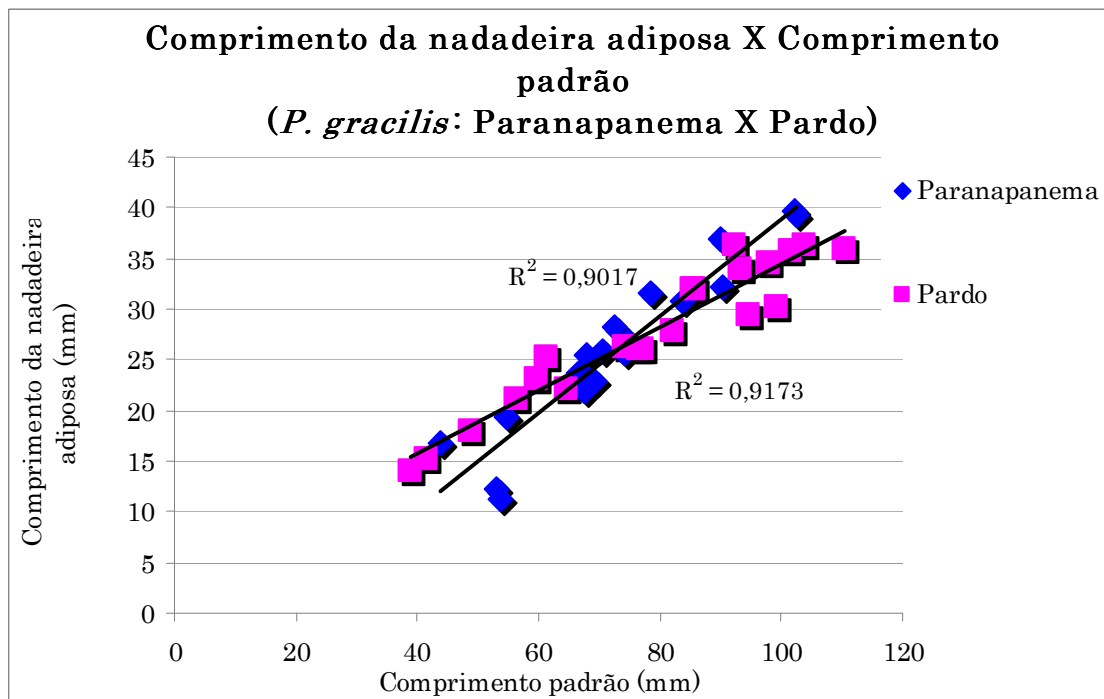
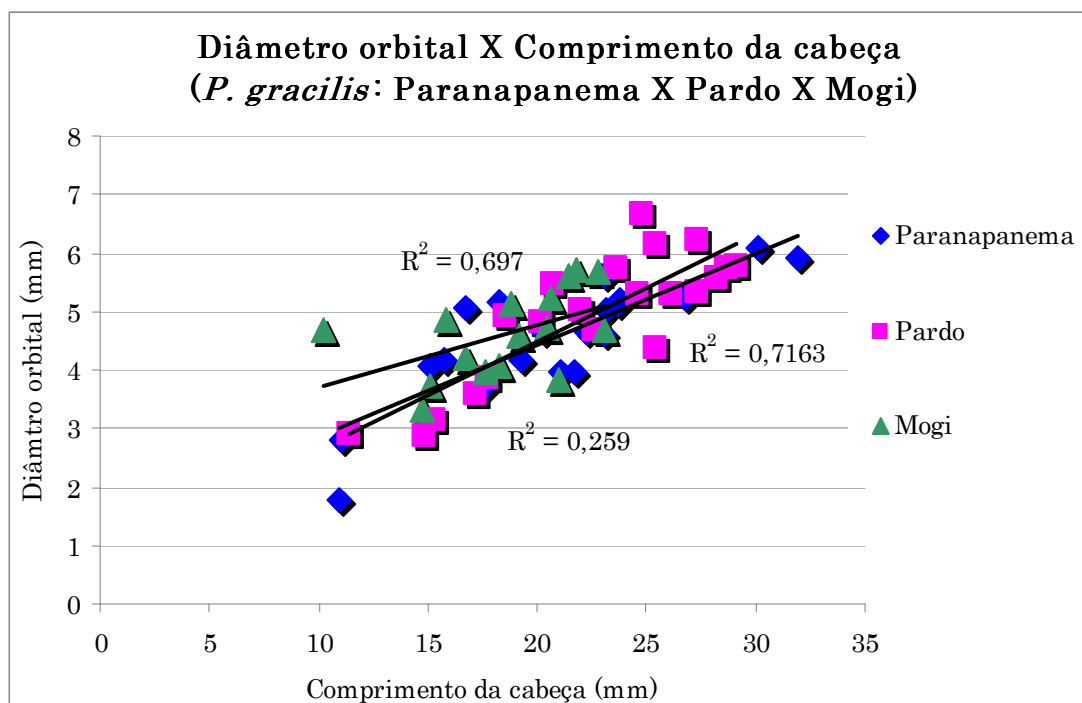
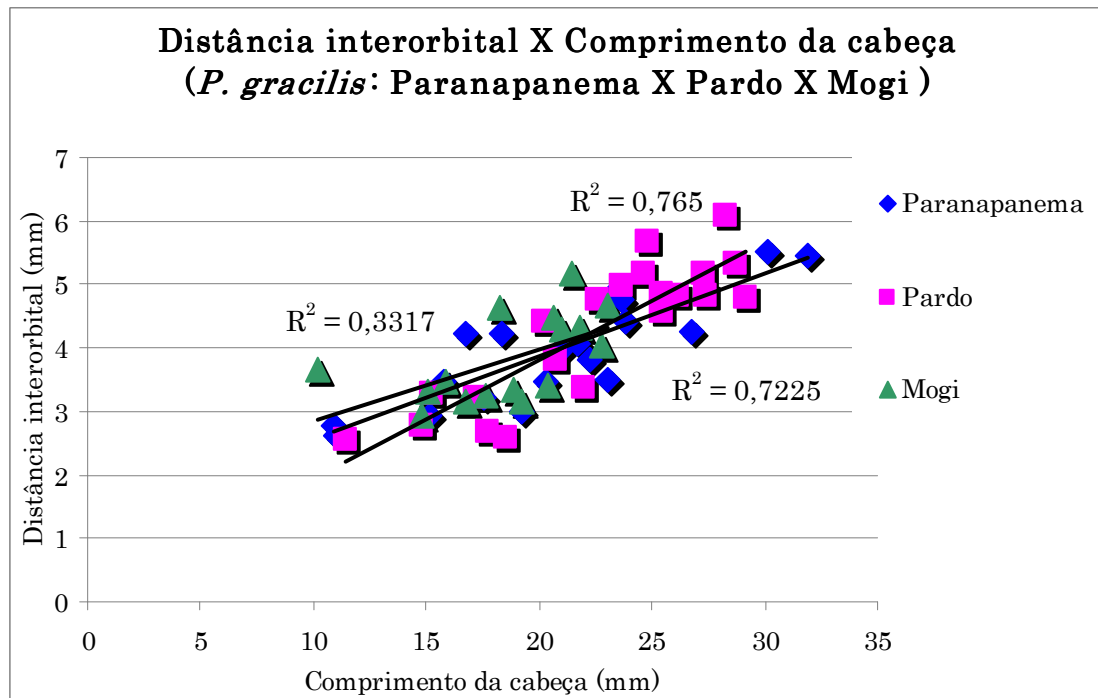
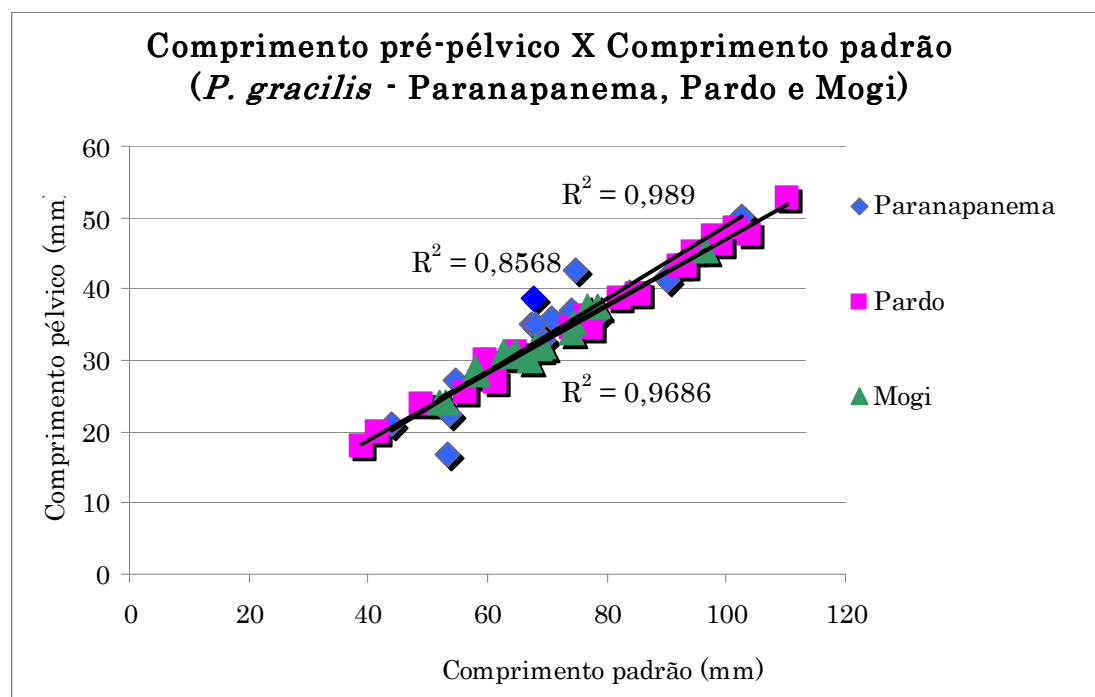
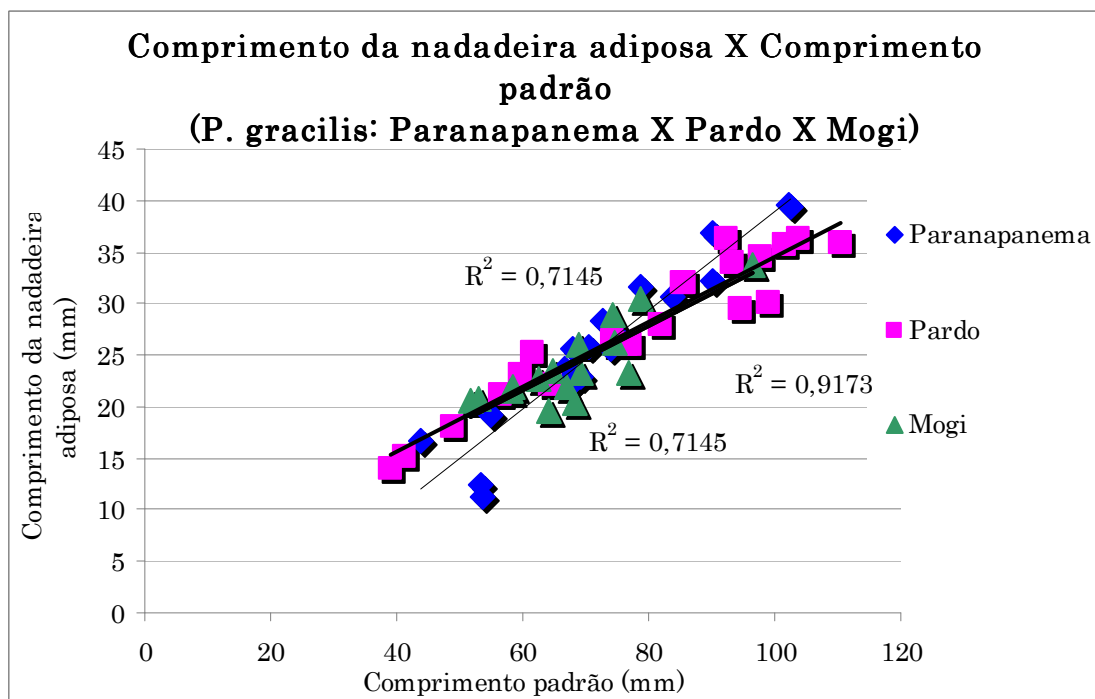


Figura 2.8: Gráficos para *P. gracilis* (Paranapanema, Pardo e Mogi-Guaçu).





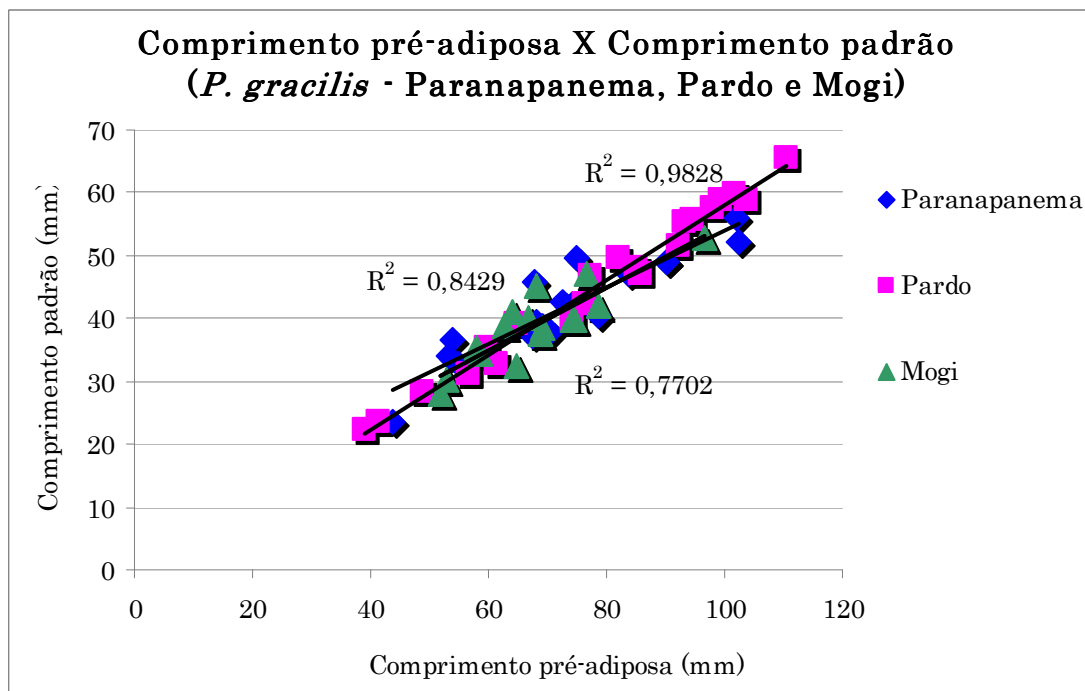
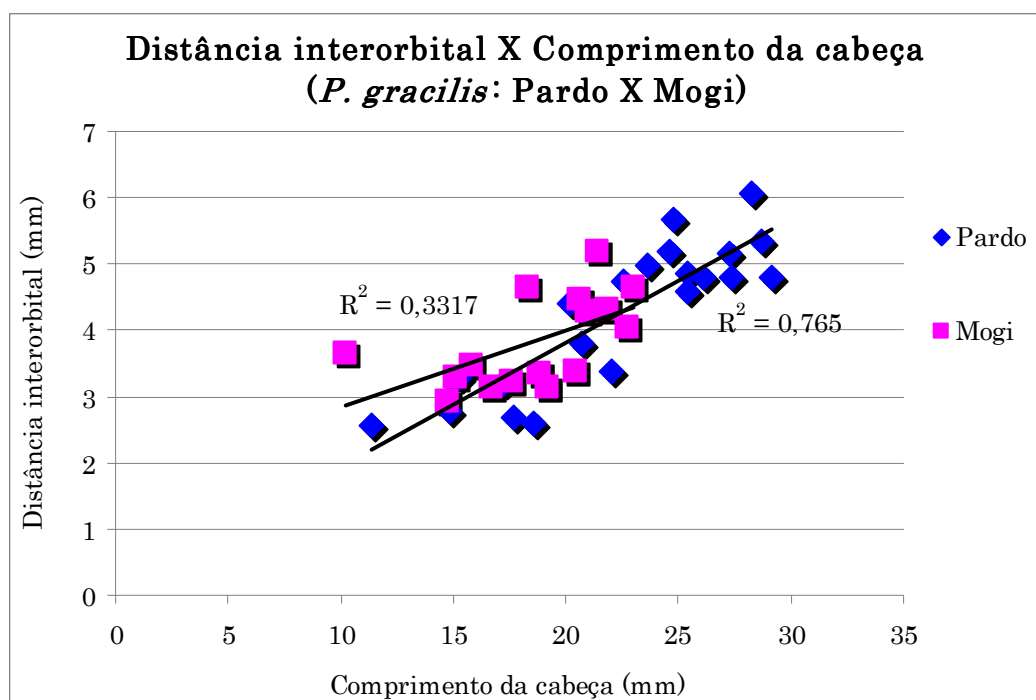
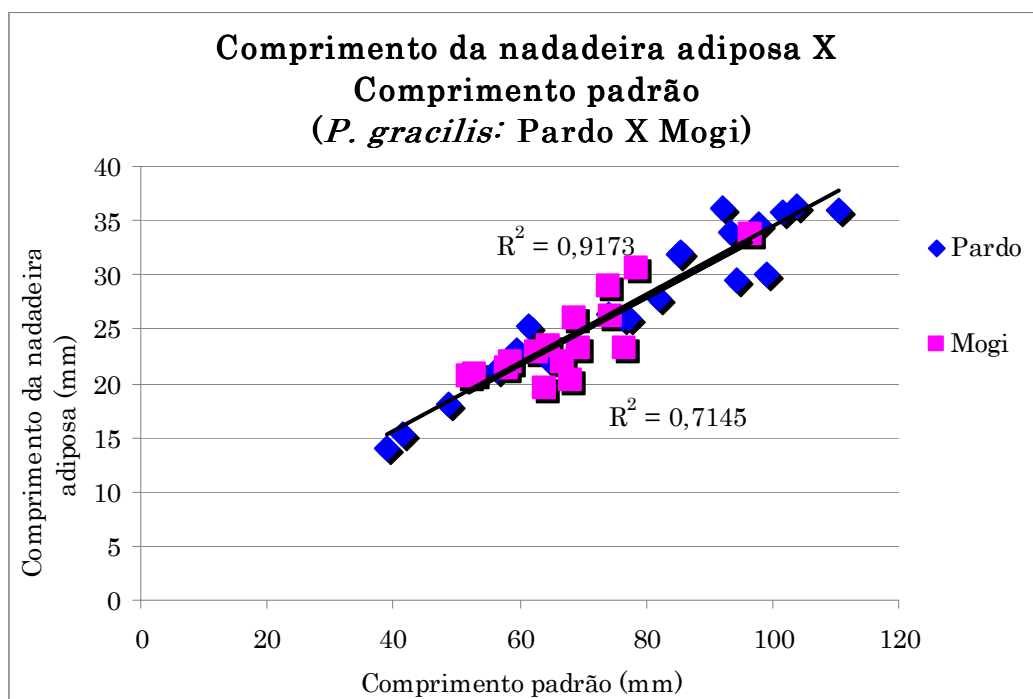
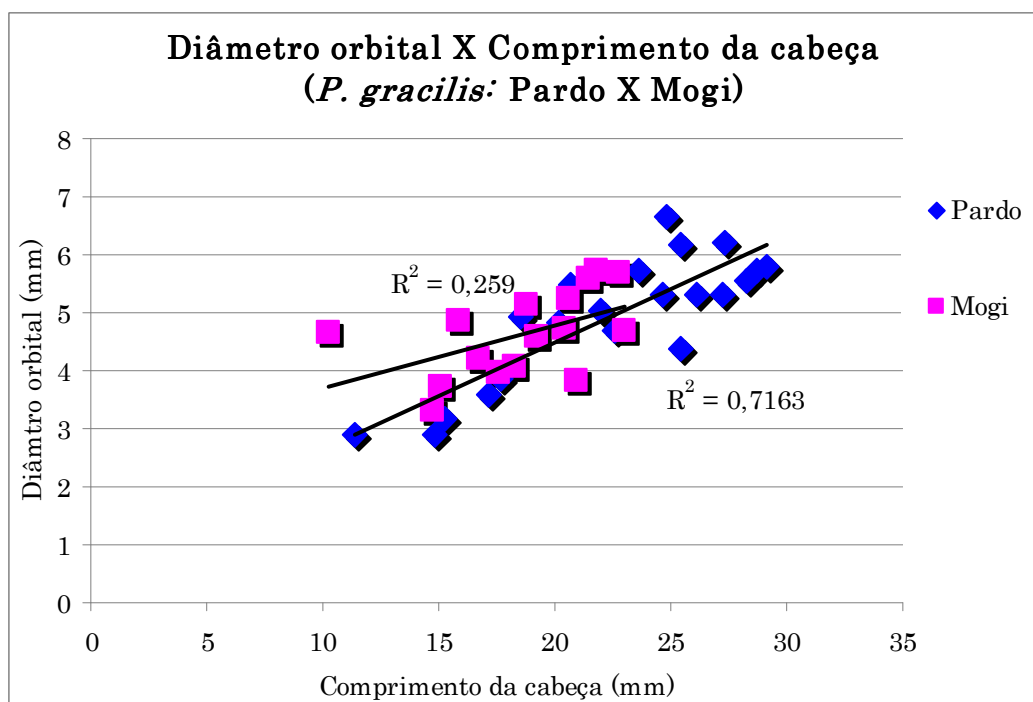


Figura 2.9: Gráficos para *P. gracilis* (Pardo e Mogi-Guaçu).





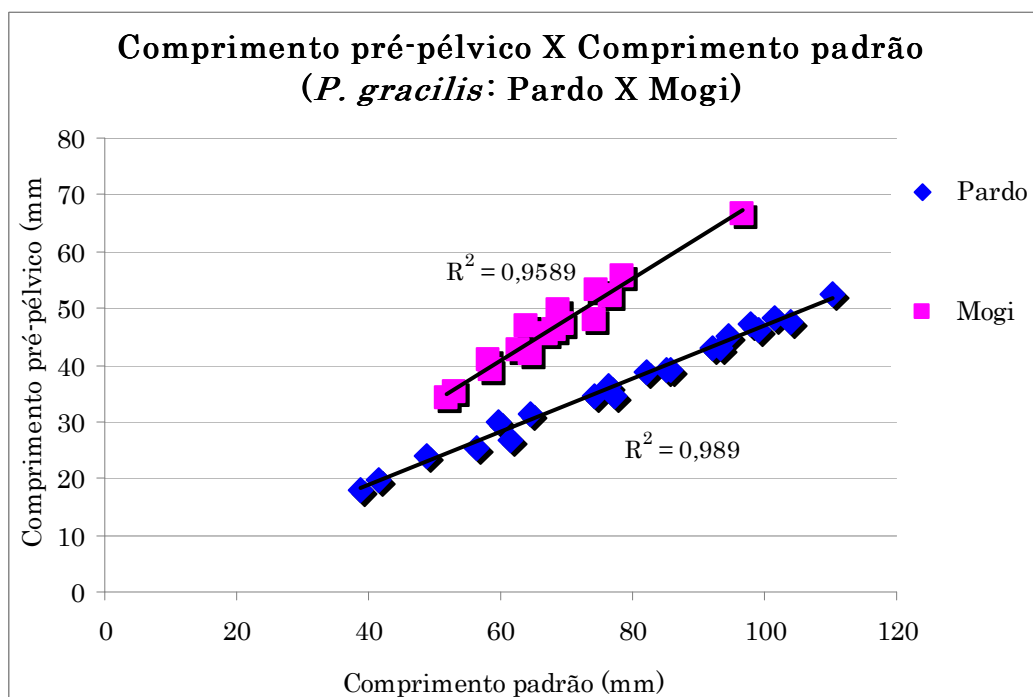
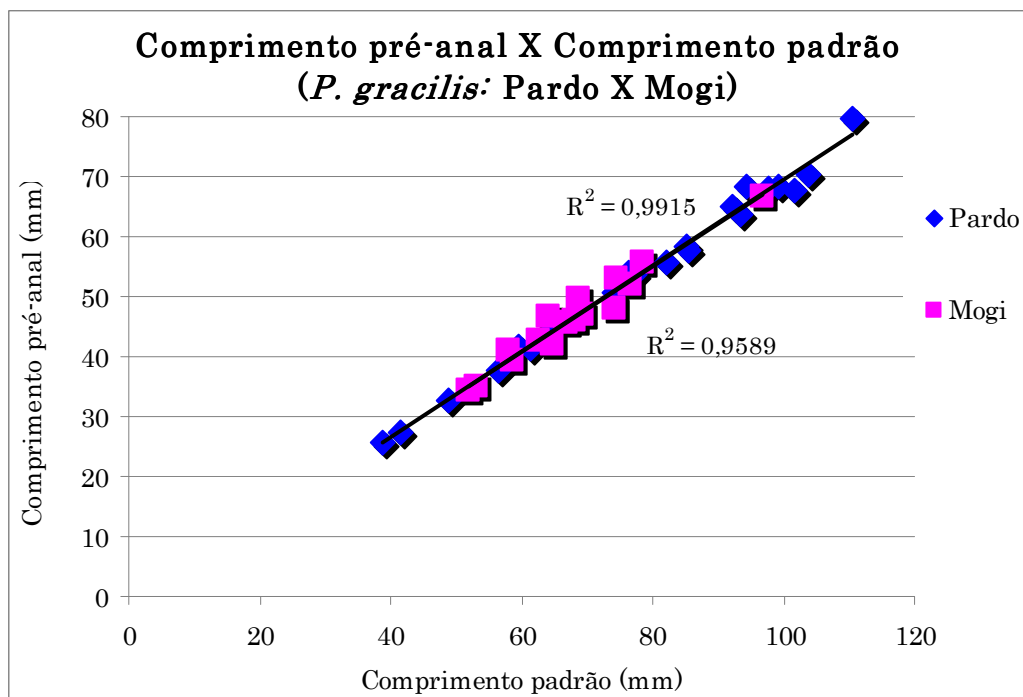
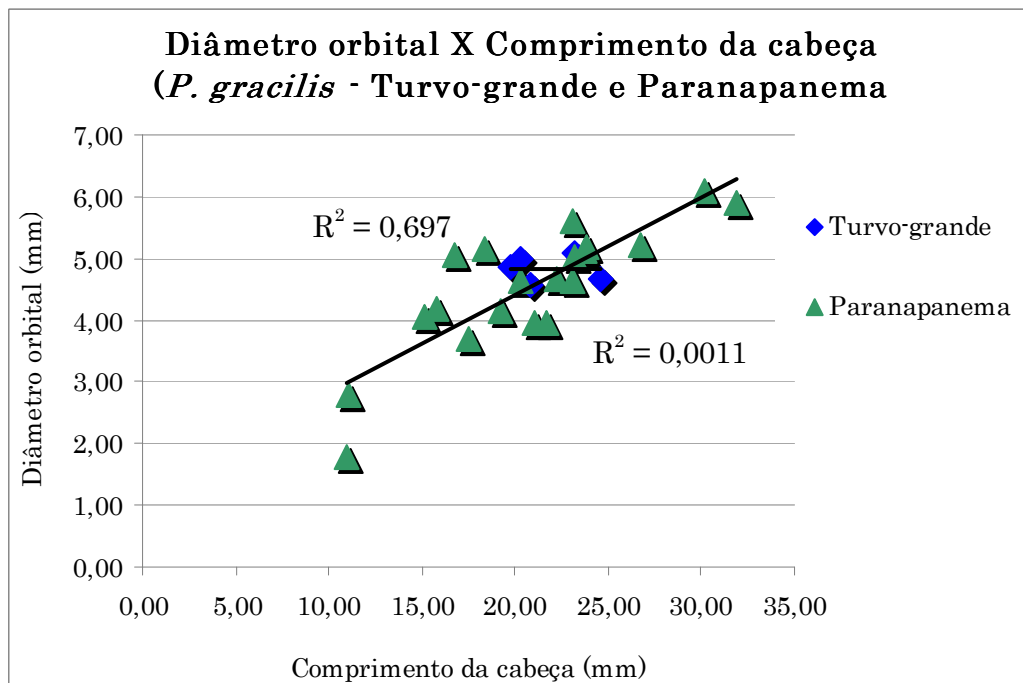
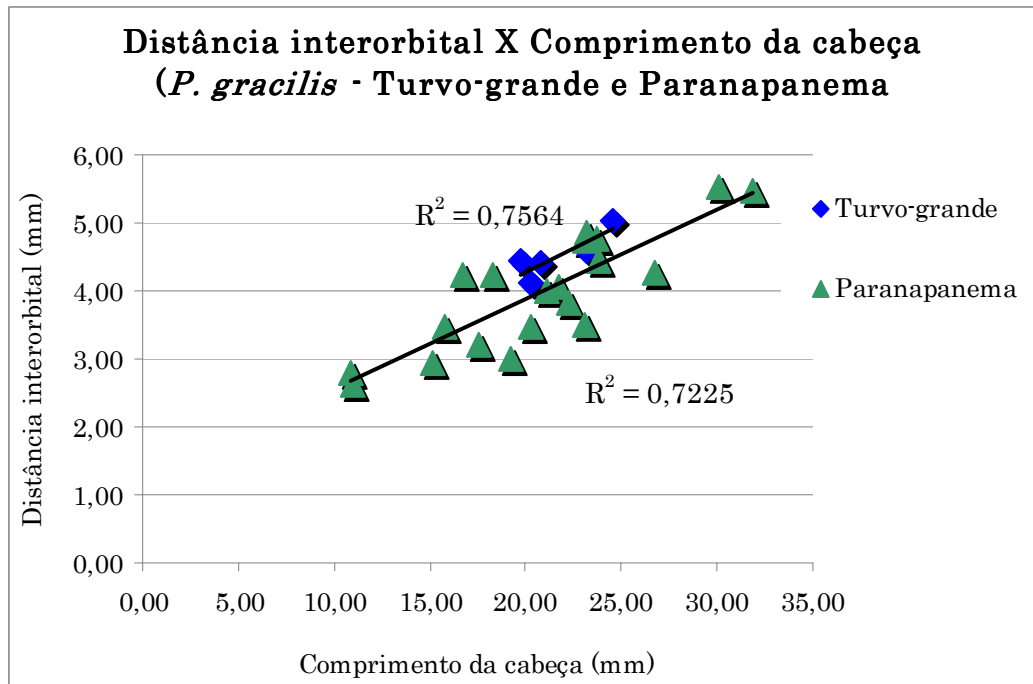
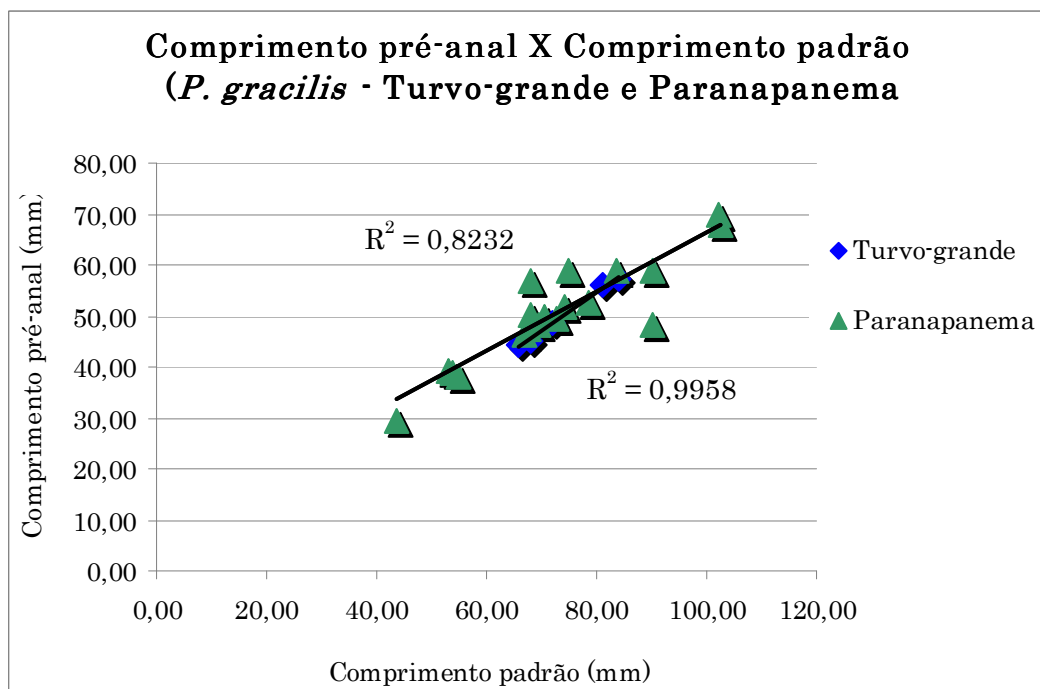
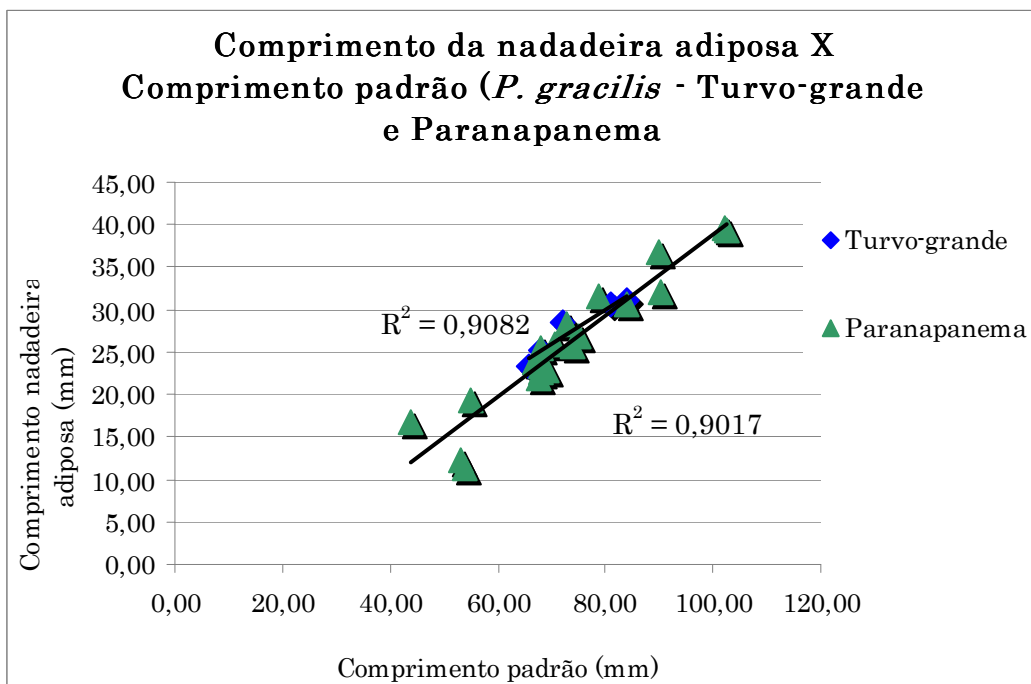


Figura 2.10: Gráficos para *P. gracilis* (Turvo-grande e Paranapanema).





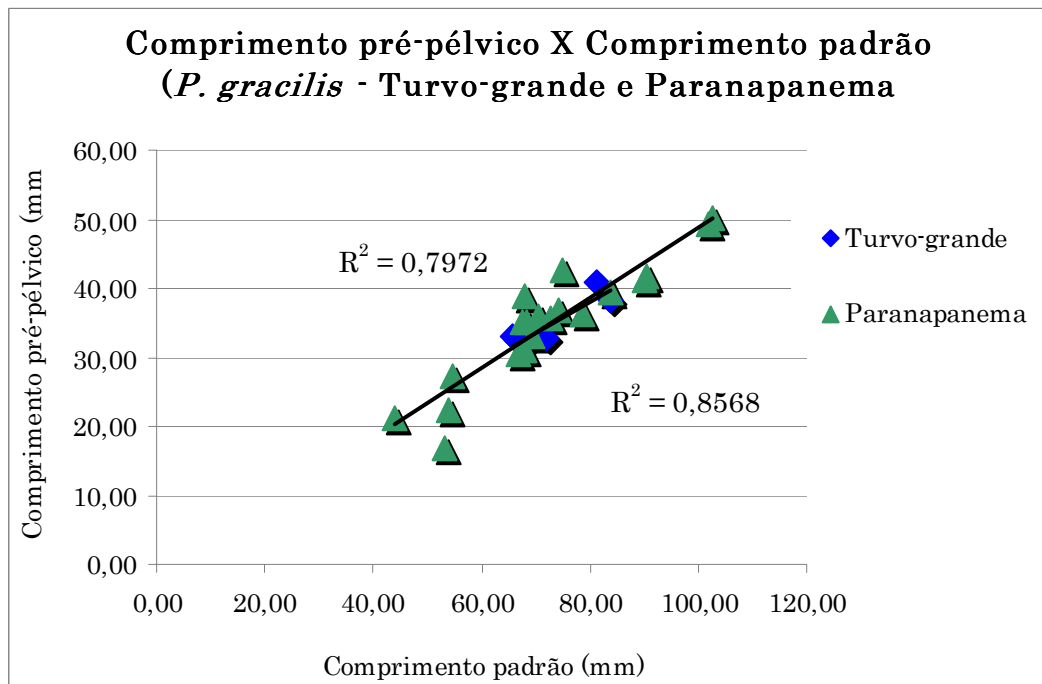
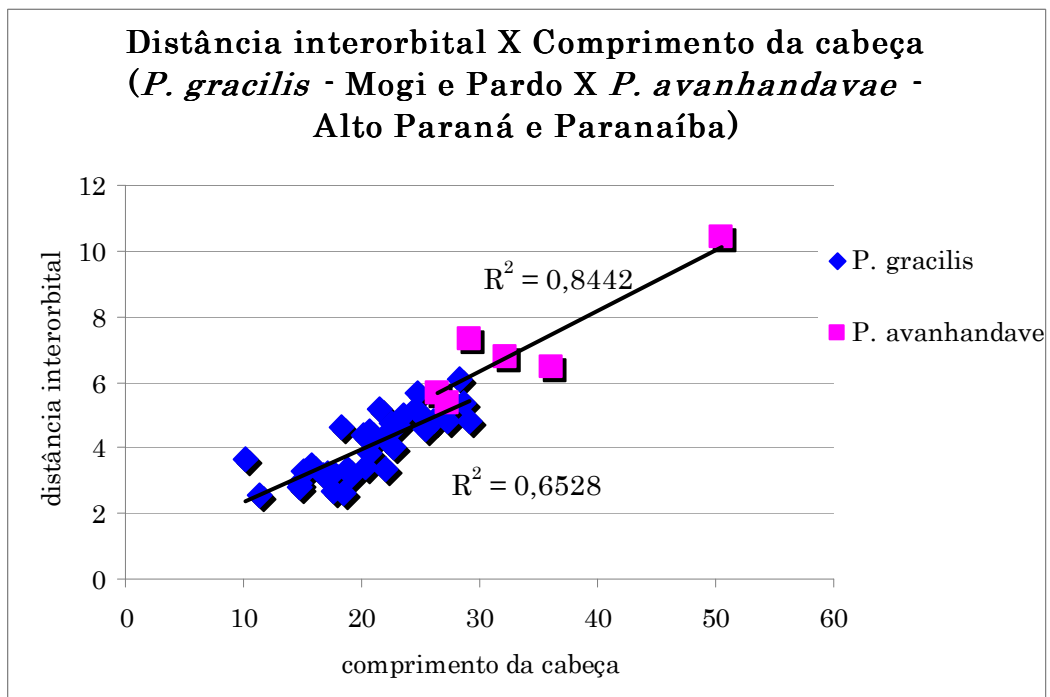
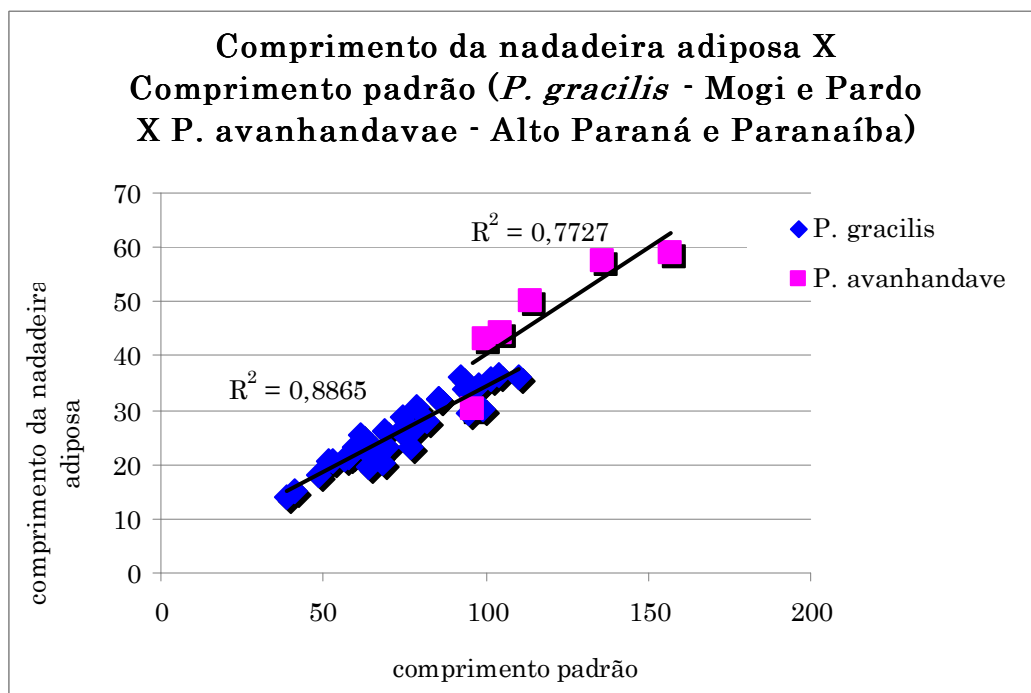
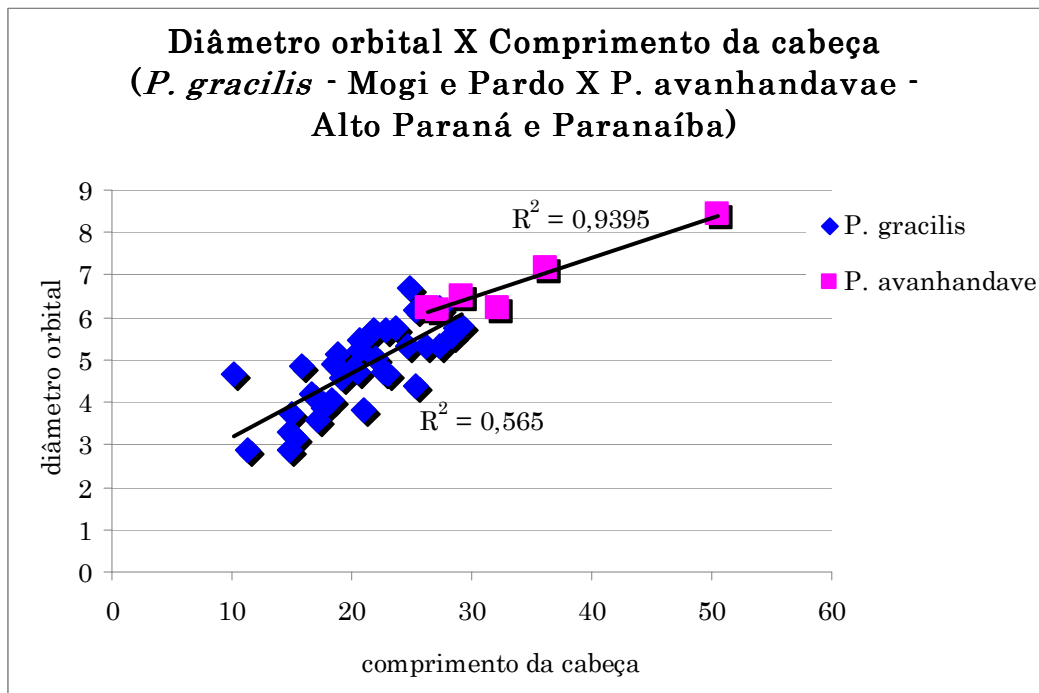


Figura 2.11: Gráficos para *P. gracilis* (Mogi-guaçu e Pardo) em comparação com *P. avanhandavae*.





**Comprimento pré-anal X Comprimento padrão
(*P. gracilis* - Mogi e Pardo X *P. avanhandavae* -
Alto Paraná e Paranaíba)**

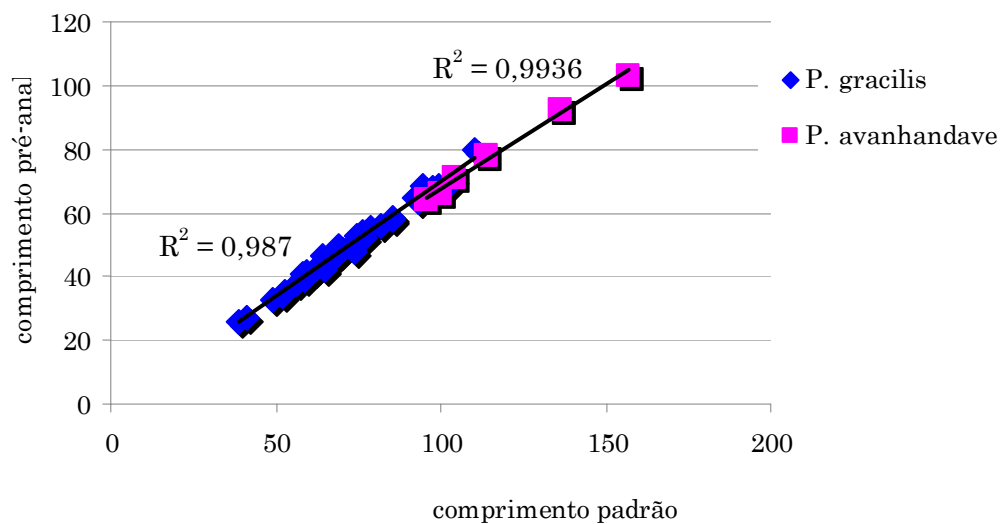


Tabela 2.4: Dados morfométricos de *P. lateristriga*. N= número de exemplares; DP= desvio padrão; valores de comprimento padrão (CP) e comprimento da cabeça (CC) em mm, outros valores em porcentagem desses comprimentos, conforme indicado.

	MÉDIA	MÁXIMO	MÍNIMO	DP	n
Comprimento padrão (CP)	86,8	118,3	49,5		18
Altura do corpo (dorsal)/CP	16,1	20,5	12,8	0,02	18
Largura do corpo (cleitro)/CP	15,7	17,3	14,6	0,01	18
Comprimento da cabeça/CP	27,9	30,6	25,8	0,01	18
Largura da cabeça/CP	15,2	17,9	13,7	0,01	18
Comprimento barbilhão maxila/CP	56,1	69,3	32,8	0,10	18
Comprimento barbilhão mentoniano externo/CP	20,1	25,7	11,3	0,04	18
Comprimento barbilhão mentoniano interno/CP	11,0	13,2	8,4	0,01	18
Comprimento pré-dorsal/CP	33,0	35,1	30,1	0,01	18
Distância dorsal-adiposa/CP	16,3	22,4	12,7	0,03	18
Comprimento do espinho dorsal/CP	15,4	18,3	5,9	0,03	18
Comprimento do espinho peitoral/CP	16,8	19,9	14,1	0,02	17
Comprimento pré-pélvico/CP	46,5	50,1	43,3	0,02	18
Comprimento do espinho pélvico/CP	12,4	14,7	9,6	0,01	18
Comprimento pré-anal/CP	66,9	71,9	63,2	0,02	18
Comprimento da adiposa/CP	29,1	34,2	24,5	0,03	18
Comprimento pré-adiposa/CP	61,3	66,0	56,1	0,03	18
Altura máxima da adiposa/CP	4,5	6,0	2,9	0,01	18
Altura pedúnculo caudal/CP	7,8	10,2	6,4	0,01	18
Comprimento da cabeça (CC)	24,1	32,9	13,8		18
Altura da cabeça/CC	54,8	63,2	45,0	0,06	18
Diâmetro do olho/CC	22,2	28,0	17,9	0,03	18
Distância interorbital/CC	18,9	23,4	14,9	0,03	18
Comprimento pré-orbital /CC	32,6	36,3	27,7	0,02	18
Comprimento focinho/CC	20,8	25,6	16,8	0,02	18

Tabela 2.5: Dados morfométricos de *P. australis*. N= número de exemplares; DP= desvio padrão; valores de comprimento padrão (CP) e comprimento da cabeça (CC) em mm, outros valores em porcentagem desses comprimentos, conforme indicado.

	MÉDIA	MÁXIMO	MÍNIMO	DP	n
Comprimento padrão (CP)	80,1	95,4	69,7		5
Altura do corpo (dorsal)/CP	0,2	0,2	0,2	0,01	5
Largura do corpo (cleitro)/CP	0,2	0,2	0,2	0,01	5
Comprimento da cabeça/CP	0,3	0,3	0,3	0,01	5
Largura da cabeça/CP	0,2	0,2	0,2	0,01	5
Comprimento barbilhão maxila/CP	0,6	0,8	0,5	0,13	5
Comprimento barbilhão mentoniano externo/CP	0,3	0,3	0,2	0,04	5
Comprimento barbilhão mentoniano interno/CP	0,1	0,2	0,1	0,04	5
Comprimento pré-dorsal/CP	0,3	0,4	0,3	0,02	5
Distância dorsal-adiposa/CP	0,2	0,2	0,1	0,03	5
Comprimento do espinho dorsal/CP	0,2	0,2	0,1	0,02	5
Comprimento do espinho peitoral/CP	0,2	0,2	0,2	0,02	5
Comprimento pré-pélvico/CP	0,5	0,5	0,5	0,01	5
Comprimento do espinho pélvico/CP	0,1	0,1	0,1	0,01	5
Comprimento pré-anal/CP	0,7	0,7	0,6	0,02	5
Comprimento da adiposa/CP	0,3	0,4	0,3	0,04	5
Comprimento pré-adiposa/CP	0,6	0,6	0,6	0,02	5
Altura máxima da adiposa/CP	0,0	0,1	0,0	0,01	5
Altura pedúnculo caudal/CP	0,1	0,1	0,1	0,00	5
Comprimento da cabeça (CC)	22,3	25,8	19,2		5
Altura da cabeça/CC	0,7	0,7	0,6	0,04	5
Diâmetro do olho/CC	0,2	0,2	0,2	0,01	5
Distância interorbital/CC	0,2	0,3	0,2	0,01	5
Comprimento pré-orbital /CC	0,3	0,4	0,3	0,02	5
Comprimento focinho/CC	0,2	0,2	0,2	0,02	5

Tabela 2.6: Dados morfométricos de *P. transitoria*. N= número de exemplares; DP= desvio padrão; valores de comprimento padrão (CP) e comprimento da cabeça (CC) em mm, outros valores em porcentagem desses comprimentos, conforme indicado.

	MÉDIA	MÁXIMO	MÍNIMO	DP	n
Comprimento padrão (CP)	116,2	154,8	95,3		11
Altura do corpo (dorsal)/CP	18,5	21,8	13,3	0,03	11
Largura do corpo (cleitro)/CP	17,3	19,6	15,5	0,01	11
Comprimento da cabeça/CP	29,3	33,7	25,7	0,02	11
Largura da cabeça/CP	16,0	17,8	14,5	0,01	11
Comprimento barbilhão maxila/CP	48,9	56,9	42,7	0,05	11
Comprimento barbilhão mentoniano externo/CP	20,0	23,4	12,5	0,03	11
Comprimento barbilhão mentoniano interno/CP	9,7	12,2	5,3	0,02	11
Comprimento pré-dorsal/CP	34,9	37,9	31,9	0,02	11
Distância dorsal-adiposa/CP	15,0	22,1	6,6	0,05	11
Comprimento do espinho dorsal/CP	15,0	19,1	10,8	0,02	11
Comprimento do espinho peitoral/CP	16,2	19,2	13,5	0,02	11
Comprimento pré-pélvico/CP	49,2	54,2	45,7	0,03	11
Comprimento do espinho pélvico/CP	11,8	14,8	9,7	0,02	11
Comprimento pré-anal/CP	68,5	73,7	64,9	0,03	11
Comprimento da adiposa/CP	29,7	37,4	23,9	0,04	11
Comprimento pré-adiposa/CP	61,9	67,6	50,5	0,05	11
Altura máxima da adiposa/CP	4,2	5,1	3,4	0,01	11
Altura pedúnculo caudal/CP	8,3	9,1	6,9	0,01	11
Comprimento da cabeça (CC)	27,9	41,2	21,1		11
Altura da cabeça/CC	56,4	0,7	0,4	0,08	11
Diâmetro do olho/CC	16,4	0,7	0,4	0,02	11
Distância interorbital/CC	22,0	0,7	0,4	0,03	11
Comprimento pré-orbital /CC	34,7	0,7	0,4	0,02	11
Comprimento focinho/CC	21,1	0,7	0,4	0,02	11

Tabela 2.7: Dados morfométricos de *P. kronei*. N= número de exemplares; DP= desvio padrão; valores de comprimento padrão (CP) e comprimento da cabeça (CC) em mm, outros valores em porcentagem desses comprimentos, conforme indicado.

	MÉDIA	MÁXIMO	MÍNIMO	DP	n
Comprimento padrão (CP)	111,8	115,5	108,8		5
Altura do corpo (dorsal)/CP	14,9	15,4	14,0	0,01	5
Largura do corpo (cleitro)/CP	16,0	16,6	14,8	0,01	5
Comprimento da cabeça/CP	29,4	31,3	28,0	0,02	5
Largura da cabeça/CP	15,7	16,3	15,3	0,00	5
Comprimento barbilhão maxila/CP	36,6	40,4	31,8	0,04	5
Comprimento barbilhão mentoniano externo/CP	14,0	18,4	11,6	0,03	4
Comprimento barbilhão mentoniano interno/CP	9,4	11,4	7,6	0,02	4
Comprimento pré-dorsal/CP	35,7	37,2	34,1	0,01	5
Distância dorsal-adiposa/CP	14,8	16,8	12,1	0,02	5
Comprimento do espinho dorsal/CP	11,2	13,6	9,3	0,02	5
Comprimento do espinho peitoral/CP	13,6	14,2	12,6	0,01	5
Comprimento pré-pélvico/CP	47,6	49,3	45,9	0,01	5
Comprimento do espinho pélvico/CP	10,5	13,2	9,4	0,02	5
Comprimento pré-anal/CP	69,2	70,8	67,1	0,01	5
Comprimento da adiposa/CP	28,2	34,8	25,9	0,04	5
Comprimento pré-adiposa/CP	61,8	63,6	59,3	0,02	5
Altura máxima da adiposa/CP	3,4	4,2	2,8	0,01	5
Altura pedúnculo caudal/CP	8,6	9,4	7,6	0,01	5
Comprimento da cabeça (CC)	32,8	34,5	30,8		5
Altura da cabeça/CC	47,3	54,5	40,9	0,05	5
Diâmetro do olho/CC	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Distância interorbital/CC	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Comprimento pré-orbital /CC	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Comprimento focinho/CC	20,0	21,4	19,0	0,01	5

Tabela 2.8: Dados morfométricos de *P. avanhandavae*. N= número de exemplares; DP= desvio padrão; valores de comprimento padrão (CP) e comprimento da cabeça (CC) em mm, outros valores em porcentagem desses comprimentos, conforme indicado.

	MÉDIA	MÁXIMO	MÍNIMO	DP	n
Comprimento padrão (CP)	117,9	157,2	95,7		6
Altura do corpo (dorsal)/CP	0,2	0,2	0,2	0,01	6
Largura do corpo (cleitro)/CP	0,2	0,2	0,2	0,01	6
Comprimento da cabeça/CP	0,3	0,3	0,3	0,02	6
Largura da cabeça/CP	0,2	0,2	0,1	0,01	6
Comprimento barbilhão maxila/CP	0,6	0,7	0,5	0,06	6
Comprimento barbilhão mentoniano externo/CP	0,3	0,3	0,2	0,02	6
Comprimento barbilhão mentoniano interno/CP	0,2	0,2	0,1	0,03	6
Comprimento pré-dorsal/CP	0,3	0,3	0,3	0,01	6
Distância dorsal-adiposa/CP	0,1	0,2	0,1	0,04	6
Comprimento do espinho dorsal/CP	0,1	0,2	0,1	0,02	6
Comprimento do espinho peitoral/CP	0,2	0,2	0,2	0,01	5
Comprimento pré-pélvico/CP	0,5	0,5	0,4	0,02	6
Comprimento do espinho pélvico/CP	0,1	0,1	0,1	0,01	6
Comprimento pré-anal/CP	0,7	0,7	0,7	0,01	6
Comprimento da adiposa/CP	0,4	0,4	0,3	0,05	6
Comprimento pré-adiposa/CP	0,5	0,6	0,5	0,04	6
Altura máxima da adiposa/CP	0,1	0,1	0,0	0,01	6
Altura pedúnculo caudal/CP	0,1	0,1	0,1	0,01	6
Comprimento da cabeça (CC)	33,6	50,5	26,4		6
Altura da cabeça/CC	0,6	0,7	0,6	0,04	6
Diâmetro do olho/CC	0,2	0,2	0,2	0,03	6
Distância interorbital/CC	0,2	0,3	0,2	0,02	6
Comprimento pré-orbital /CC	0,3	0,3	0,3	0,02	6
Comprimento focinho/CC	0,2	0,2	0,2	0,03	6

Tabela 2.9: Dados morfométricos de *P. laurenti*. N= número de exemplares; DP= desvio padrão; valores de comprimento padrão (CP) e comprimento da cabeça (CC) em mm, outros valores em porcentagem desses comprimentos, conforme indicado.

	MÉDIA	MÁXIMO	MÍNIMO	DP	n
Comprimento padrão (CP)	95,8	126,8	80,6		5
Altura do corpo (dorsal)/CP	17,2	19,8	15,2	0,02	5
Largura do corpo (cleitro)/CP	17,0	18,1	15,8	0,01	5
Comprimento da cabeça/CP	27,7	29,6	25,5	0,02	5
Largura da cabeça/CP	15,8	16,3	14,9	0,01	5
Comprimento barbilhão maxila/CP	63,6	82,4	49,5	0,12	5
Comprimento barbilhão mentoniano externo/CP	20,9	28,6	6,8	0,09	5
Comprimento barbilhão mentoniano interno/CP	12,3	17,9	8,6	0,04	5
Comprimento pré-dorsal/CP	32,2	33,7	30,4	0,01	5
Distância dorsal-adiposa/CP	13,7	17,9	10,3	0,03	5
Comprimento do espinho dorsal/CP	15,3	22,2	11,9	0,05	4
Comprimento do espinho peitoral/CP	14,0	16,6	9,2	0,03	5
Comprimento pré-pélvico/CP	47,0	48,2	45,9	0,01	5
Comprimento do espinho pélvico/CP	12,6	13,3	11,9	0,01	5
Comprimento pré-anal/CP	66,8	69,0	63,3	0,02	5
Comprimento da adiposa/CP	32,3	36,1	26,7	0,04	5
Comprimento pré-adiposa/CP	59,5	68,9	55,3	0,05	5
Altura máxima da adiposa/CP	4,2	5,6	2,9	0,01	5
Altura pedúnculo caudal/CP	8,1	9,2	6,7	0,01	5
Comprimento da cabeça (CC)	25,1	28,6	22,7		5
Altura da cabeça/CC	56,2	57,8	54,3	0,01	5
Diâmetro do olho/CC	18,6	23,1	13,8	0,04	5
Distância interorbital/CC	18,9	21,1	16,4	0,02	5
Comprimento pré-orbital /CC	33,2	35,8	31,9	0,02	5
Comprimento focinho/CC	19,3	21,0	17,1	0,02	5

Tabela 2.10: Dados morfométricos de *P. gracilis*. N= número de exemplares; DP= desvio padrão; valores de comprimento padrão (CP) e comprimento da cabeça (CC) em mm, outros valores em porcentagem desses comprimentos, conforme indicado.

	MÉDIA	MÁXIMO	MÍNIMO	DP	n
Comprimento padrão (CP)	71,3	112,5	27,4		96
Altura do corpo (dorsal)/CP	18,1	24,8	12,2	0,03	96
Largura do corpo (cleitro)/CP	17,3	20,0	13,6	0,01	96
Comprimento da cabeça/CP	28,7	35,8	16,3	0,03	96
Largura da cabeça/CP	16,6	22,1	12,9	0,01	96
Comprimento barbilhão maxila/CP	66,9	87,3	27,3	0,10	96
Comprimento barbilhão mentoniano externo/CP	28,1	39,6	6,8	0,05	96
Comprimento barbilhão mentoniano interno/CP	16,6	22,8	8,6	0,03	96
Comprimento pré-dorsal/CP	34,5	45,5	22,1	0,03	96
Distância dorsal-adiposa/CP	11,1	23,9	5,7	0,03	96
Comprimento do espinho dorsal/CP	15,7	25,5	10,6	0,02	90
Comprimento do espinho peitoral/CP	15,8	21,5	9,2	0,02	91
Comprimento pré-pélvico/CP	47,1	57,3	31,7	0,03	96
Comprimento do espinho pélvico/CP	13,8	18,2	10,7	0,02	96
Comprimento pré-anal/CP	68,6	83,6	53,6	0,03	96
Comprimento da adiposa/CP	35,6	44,2	20,9	0,03	96
Comprimento pré-adiposa/CP	58,1	68,9	50,1	0,04	96
Altura máxima da adiposa/CP	5,2	7,3	2,3	0,01	96
Altura pedúnculo caudal/CP	9,1	15,1	7,2	0,01	94
Comprimento da cabeça (CC)	20,3	32,1	7,4		96
Altura da cabeça/CC	59,0	84,3	42,7	0,09	96
Diâmetro do olho/CC	22,7	45,7	13,8	0,04	96
Distância interorbital/CC	19,9	35,7	14,0	0,03	96
Comprimento pré-orbital /CC	33,9	58,3	28,0	0,04	96
Comprimento focinho/CC	21,4	42,8	15,1	0,04	96

Tabela 2.11: Dados morfométricos de *P. mucosa*. N= número de exemplares; DP= desvio padrão; valores de comprimento padrão (CP) e comprimento da cabeça (CC) em mm, outros valores em porcentagem desses comprimentos, conforme indicado.

	MÉDIA	MÁXIMO	MÍNIMO	DP	n
Comprimento padrão (CP)	144,7	160,7	133,0		5
Altura do corpo (dorsal)/CP	17,2	19,4	15,5	0,01	5
Largura do corpo (cleitro)/CP	17,3	18,9	16,0	0,01	5
Comprimento da cabeça/CP	27,0	28,4	25,7	0,01	5
Largura da cabeça/CP	15,4	16,9	14,8	0,01	5
Comprimento barbilhão maxila/CP	77,3	87,3	56,8	0,12	5
Comprimento barbilhão mentoniano externo/CP	36,7	43,4	33,6	0,04	5
Comprimento barbilhão mentoniano interno/CP	23,2	27,1	19,0	0,03	5
Comprimento pré-dorsal/CP	30,9	32,8	29,4	0,01	5
Distância dorsal-adiposa/CP	9,1	10,5	6,7	0,01	5
Comprimento do espinho dorsal/CP	17,6	20,2	13,0	0,03	5
Comprimento do espinho peitoral/CP	17,5	18,9	15,2	0,01	5
Comprimento pré-pélvico/CP	44,4	45,7	43,4	0,01	5
Comprimento do espinho pélvico/CP	12,4	13,1	11,6	0,01	5
Comprimento pré-anal/CP	67,1	69,0	66,1	0,01	5
Comprimento da adiposa/CP	45,6	49,1	42,8	0,02	5
Comprimento pré-adiposa/CP	52,2	54,3	50,3	0,02	5
Altura máxima da adiposa/CP	4,4	5,5	3,6	0,01	5
Altura pedúnculo caudal/CP	8,1	8,4	7,6	0,00	5
Comprimento da cabeça (CC)	39,0	42,4	36,1		5
Altura da cabeça/CC	59,8	61,8	53,9	0,03	5
Diâmetro do olho/CC	16,2	17,1	15,7	0,01	5
Distância interorbital/CC	19,5	20,5	18,4	0,01	5
Comprimento pré-orbital /CC	36,9	37,6	35,0	0,01	5
Comprimento focinho/CC	24,0	31,0	17,6	0,06	5

Tabela 2.12: Dados morfométricos de *Pimelodella* sp. n. Valores de comprimento padrão (CP) e comprimento da cabeça (CC) em mm, outros valores em porcentagem desses comprimentos, conforme indicado. Número de exemplares observados: 1 exemplar

Comprimento padrão (CP)	52,91
Altura do corpo (dorsal)/CP	13,9
Largura do corpo (cleitro)/CP	16,0
Comprimento da cabeça/CP	29,4
Largura da cabeça/CP	15,1
Comprimento barbilhão maxila/CP	90,6
Comprimento barbilhão mentoniano externo/CP	29,5
Comprimento barbilhão mentoniano interno/CP	19,1
Comprimento pré-dorsal/CP	31,6
Distância dorsal-adiposa/CP	6,5
Comprimento do espinho dorsal/CP	14,6
Comprimento do espinho peitoral/CP	16,5
Comprimento pré-pélvico/CP	44,7
Comprimento do espinho pélvico/CP	10,1
Comprimento pré-anal/CP	65,2
Comprimento da adiposa/CP	39,5
Comprimento pré-adiposa/CP	53,4
Altura máxima da adiposa/CP	5,5
Altura pedúnculo caudal/CP	6,7
Comprimento da cabeça (CC)	15,5
Altura da cabeça/CC	50,0
Diâmetro do olho/CC	20,0
Distância interorbital/CC	17,8
Comprimento pré-orbital /CC	29,7
Comprimento focinho/CC	23,1

Considerações finais

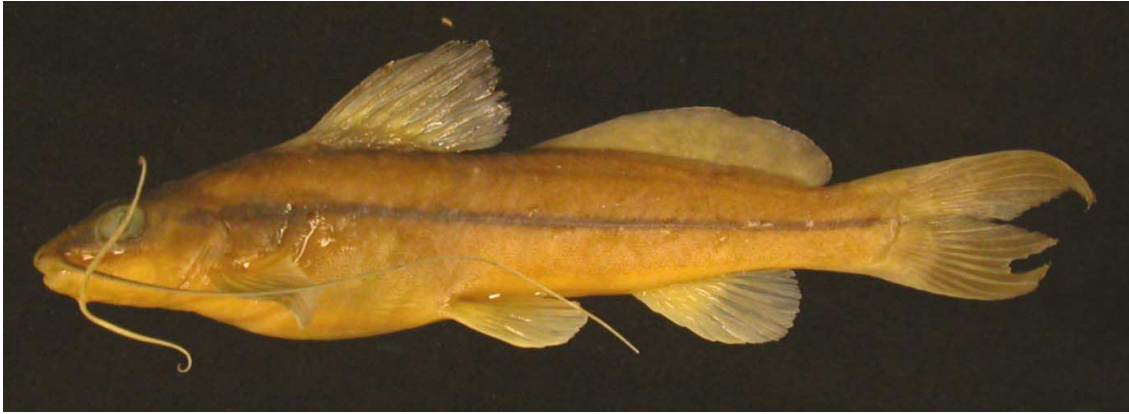
Em suma, podemos concluir que é nítida a necessidade de uma revisão do gênero *Pimelodella*. Diversas descrições para as espécies apresentam sobreposição nos caracteres analisados, e há incongruência em algumas informações encontradas na literatura do gênero (*eg.* Relação entre a existência de filamento na nadadeira dorsal e o sexo e estágio de desenvolvimento do indivíduo).

Unindo as informações acima descritas, resumizamos que é extremamente difícil uma diagnose restrita para *P. gracilis*, assim como deve haver cruzamento entre as diversas populações do Alto Paraná, conferindo características homoplásticas presentes em diversas populações. Uma análise biogeográfica preliminar extrai a informação de que fora da bacia do Paraná é geralmente mais fácil delimitar as espécies (vide as identificações das espécies costeiras, situadas mais ao sul do continente, ou provenientes da bacia do Rio São Francisco observadas neste trabalho). Entretanto, dentro da bacia do Paraná os morfotipos se sobrepõem, havendo uma amplitude de variação das características, com alguns tipos mais nitidamente diferentes (ver discussão sobre as espécies).

Tais conclusões são o reflexo de um estudo que visou à observação de uma grande quantidade de materiais, com uma análise morfométrica que exaustivamente tentou identificar e delimitar as espécies em questão. Entretanto, as descrições são antigas (maior parte anterior à década de 1970), contendo informações subjetivas ou superficiais, sem ilustrações dos caracteres (e muitas vezes, sem ilustrações ao menos do exemplar-tipo) e com base em poucos exemplares, principalmente as espécies com prolongamento filiforme na nadadeira dorsal, as quais geralmente existem em simpatria com outras espécies de distribuição mais ampla (*eg.* 8 exemplares para *P. boschmai* VAN der STIGCHEL, 1964).

Para a proposição de sinonímia entre diversas dessas espécies, entretanto se faz necessário um estudo maior, que analise a morfologia da maior parte dos exemplares depositados em coleções, além da osteologia do gênero, ainda fracamente estudada. Dessa forma, nosso trabalho aqui não

propõe a sinonimização ou divisão de espécies descritas, mas serve como ponto de partida para o estudo de um gênero complexo, amplamente distribuído na América do Sul e que apresenta grandes dificuldades na delimitação de espécies.



A



B

Figura 2.12: A - *Pimelodella australis* LIRP0424; B - *Pimelodella lateristriga* LIRP6839, vista lateral.



A



B

Figura 2.13: A - *Pimelodella transitoria*; B - *Pimelodella kronei*, vista lateral.



A



B

Figura 2.14: A - *Pimelodella gracilis* LIRP2926; B - *Pimelodella avanhandavae* LIRP6955, vista lateral.



A

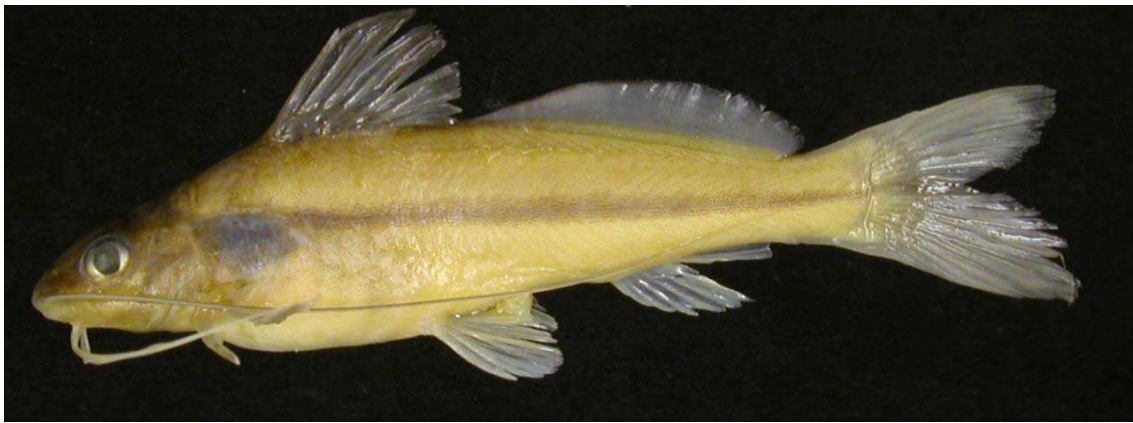


B

Figura 2.15: A - *Pimelodella spelaea* MZUSP817266; B – *Pimelodella laurenti* LIRP4258, vista lateral.



A



B

Figura 2.16: A – *Pimelodella* sp nova (Amazonas); B – *Pimelodella mucosa* LIRP0710; vista lateral.

Capítulo 3

*Análise filogenética do gênero *Pimelodella* por sequenciamento do DNA mitocondrial*



Resumo

O gênero *Pimelodella* é composto por espécies de peixes que apresentam hábitos noturnos e baixa capacidade de dispersão. Esse gênero compreende 71 espécies com ampla distribuição na região Neotropical. A última revisão do gênero foi feita por Eigenmann em 1917 e, desde então novas espécies foram adicionadas ao táxon, tornando-se necessária uma nova revisão. No presente trabalho, analisamos as relações de ancestralidade e as relações filogenéticas entre espécies de *Pimelodella*, coletadas nos rios da bacia hidrográfica do Alto Paraná, usando a Sistemática Filogenética. Foram seqüenciadas regiões específicas do DNA mitocondrial (ATPase 6 e 8, citocromo b, ND2 e COI) das espécies coletadas, incluindo representantes de outros gêneros como grupos externos (*Imparfinis minutus*, *Microglanis cottoides*, *Acentronichthys leptos* e *Rhamdia quelen*). Foram efetuadas análises filogenéticas, utilizando o método da Máxima Parcimônia. Foram obtidas seis árvores mais parcimoniosas e o consenso estrito das mesmas evidenciou a separação entre as espécies provenientes da Bacia do Paraná Paraguai daquelas provenientes da Bacia Amazônica e do Prata. Os valores de suporte foram superiores nos nós mais internos da árvore filogenética.

Palavras chaves: *Pimelodella*, Heptapteridae, Filogenia, DNA mitocondrial.

Introdução

Os peixes da ordem Siluriformes são popularmente conhecidos como bagres, cascudos, mandis, peixe-gato entre outras denominações. Os peixes dessa ordem são amplamente distribuídos dentro da Superordem Ostariophysi, sendo formados por 38 famílias, aproximadamente 485 gêneros e cerca de 2800 espécies (NELSON, 2006).

Os Siluriformes podem ser facilmente identificados pelas suas características morfológicas distintas. Possuem o corpo nu, coberto por pele espessa, a qual pode estar total ou parcialmente coberta por placas ósseas (Britski et al, 1988). As nadadeiras são raiadas e bem separadas, sendo que o primeiro raio das nadadeiras dorsal e peitoral possui um acúleo forte e pungente; a nadadeira adiposa encontra-se presente e é, em geral, bem desenvolvida, e a nadadeira caudal assume formato variável. Apresentam, geralmente, três pares de barbilhões sensitivos (MEES, 1974).

A família Heptapteridae é endêmica da região Neotropical, sendo um dos principais componentes da ordem Siluriformes dos rios da América do Sul e Central, seus membros apresentam registros de distribuição desde o México até o sul da Argentina (BOCKMANN & GUAZZELLI, 2003). Esta família inclui peixes de pequeno a médio porte. Alguns gêneros desta família (*Pimelodella*, *Rhamdia*) parecem estar entre os Siluriformes mais comuns de água doce da América do Sul, apesar de sua biologia, em geral, ser pobremente conhecida (MALABARBA, 1998).

O gênero *Pimelodella* (Eigenmann & Eigenmann, 1888) conta com 71 espécies com ampla distribuição na região Neotropical. Peixes pertencentes a este gênero possuem hábito noturno e baixa capacidade de dispersão. A última revisão do gênero foi a de Eigenmann em 1917, desde então somente novas espécies foram adicionadas ao táxon, tornando-se necessária uma nova revisão que atualize a taxonomia do grupo, com a redescritção das espécies e a descrição de novas (GUAZZELLI, 1997).

Os primeiros estudos citogenéticos no Brasil envolvendo o gênero *Pimelodella* foram desenvolvidos por Toledo & Ferrari (1976) relatando $2n=46$ para as espécies analisadas. Estudos recentes têm demonstrado neste

gênero extensiva variabilidade cariotípica apesar das poucas informações citogenéticas disponíveis (Tabela 1). As análises indicam que o número diplóide dentro deste gênero pode variar de 46 a 58 cromossomos, sendo $2n=46$ o número diplóide encontrado mais frequentemente. A presença de um micro-cromossomo supernumerário já foi descrita também em um espécime de *Pimelodella* da caverna Areias no Parque Turístico Estadual do Alto Ribeira (PETAR), indicando uma provável ocorrência de cromossomos B no gênero (ALMEIDA-TOLEDO et al., 1992).

Dias & Foresti (1993) identificaram a ocorrência de um sistema de cromossomos sexuais simples do tipo XX/XY na população de *Pimelodella* do Rio Mogi-Guaçu em Araras, no estado de São Paulo.

Guazzelli (1997) revisando a taxonomia desse grupo, apresentou uma chave de identificação das espécies e descreveu caracteres que podem auxiliar na elucidação das relações filogenéticas do gênero. O estudo incluiu as espécies de *Pimelodella* da região costeira do sul e sudeste do Brasil: *P. laticeps australis*, *P. pappenheimi*, *P. ignobilis*, *P. transitória*, *P. kronei*, *P. brasiliensis*, *P. hartii*, *P. enochi*, *P. lateristriga* e *P. pectinifera*.

Em 1997, Trajano publicou um trabalho expondo o risco eminente de extinção de populações cavernícolas. A autora descreve *Pimelodella kronei*, um peixe troglóbio que difere *Pimelodella transitoria* pela regressão dos olhos, de uma menor pigmentação, e pela presença de espinhas dorsais ligeiramente mais curtas. A autora propõe que as espécies sejam resultantes de evolução paralela.

Um dos locais amostrado bastante focalizado em nossos estudos foi o Parque Estadual Turístico de Alto Ribeira (PETAR). Esse parque compreende cinco cavernas conhecidas: Sistema Areias (incluindo localidade tipo, Areias de Cima), ressurgência Bombas e caverna do Córrego Seco na margem direita do Rio Betari, afluente do rio Ribeira, o Alambari de cima e caverna Gurutuva na margem esquerda do rio Betari. Estes dois conjuntos de grutas são isolados por causa do rio Betari que flui ao longo de um dique de diabásio não solúvel. Os peixes troglóbios que habitam essas cavernas raramente dispersam em águas de superfície, podendo ocorrer eventos

independentes de colonização seguidos por isolamento e evolução paralela no habitat subterrâneo (TRAJANO, 1991).

Ainda em 2004, uma nova espécie de *Pimelodella* foi descrita: *P. spelaea*, em um riacho subterrâneo do rio São Bernardo dentro da caverna São Bernardo, na área cárstica de São Domingos, alto rio Tocantins, Brasil. A nova espécie pode ser distinguida dos seus congêneres epígeos (de superfície) por características troglomórficas derivadas, tais como olhos e pigmentação reduzidos. Esses caracteres são, entretanto, menos reduzidos quando comparadas a outra espécie troglóbia (exclusivamente subterrânea) conhecida, *Pimelodella kronei*, do sudeste do Brasil. Os estudos relativos a essa espécie foram realizados durante a estação de seca e indicam um regime de severa limitação alimentar, intensificando-se ao longo da estação. Um modelo alopátrico de diferenciação é sugerido, seja pelo isolamento topográfico ou pela extinção local de parente epígeos, ou ainda por ambos os fatores combinados (TRAJANO et al., 2004).

Foi realizado em 2007 um levantamento ictiofaunístico em corpos d'água epígeos (superficiais) da área cárstica de Cordisburgo, Minas Gerais de espécies não-troglomórficas e uma espécie troglomórfica (com olhos e pigmentação reduzidos em comparação aos congêneres epígeos) de bagres. Esse estudo indicou que *Pimelodella* cf. *vittata* é troglófila (espécies com indivíduos capazes de viver e completar o ciclo de vida tanto no ambiente superficial como no subterrâneo) na Gruta Morena; podendo estar no início de processo de diferenciação devido ao isolamento, pelo menos parcial, na caverna, conforme sugerido pela ligeira redução no tamanho dos olhos. A região de Cordisburgo há muito vem sendo sujeita a pressão antrópica significativa, representada principalmente pelo desmatamento para agricultura, pastagem e extração de madeira (TRAJANO et al, 2010).

No presente trabalho, com o intuito de estimar as relações entre algumas espécies de *Pimelodella*, fizemos uso da Sistemática Filogenética e seus métodos de inferência como ferramenta.

A Sistemática Filogenética analisa e interpreta os padrões e processos evolutivos, os resultados dos estudos sistemáticos são representados

graficamente na forma de filogenias ou árvores filogenéticas, indicando a relação histórica entre os organismos, representadas por pontos ou nós, ligados por linhas ou ramos. Metodologias filogenéticas são essencialmente estatísticas e podem ser classificadas em dois grupos principais, de acordo com seus critérios: 1) quantitativos (métodos de distância); 2) qualitativos (métodos de parcimônia e verossimilhança).

Nos métodos de distância, as diferenças entre duas sequências são reduzidas a uma só variável (número de diferenças) e suas relações evolutivas não são consideradas. Nesse método, primeiramente calcula-se a distância, para, a seguir, reconstruir a árvore filogenética, utilizando um algoritmo específico. Existem diferentes modelos que podem ser utilizados para a construção de uma matriz de distância (NEI et al., 2000). A partir dessa matriz será reconstruída a árvore com um dado algoritmo, sendo os mais utilizados o UPGMA e Neighbor-Joining (MIYAKI et al., 2004).

Nos critérios qualitativos, as diferenças entre as moléculas são consideradas como uma série de variáveis descontínuas. Os métodos mais empregados, embora não sejam os únicos, são a Máxima Parcimônia (MP) e a Máxima Verossimilhança (MV). O princípio da MP é que a hipótese mais simples, ou seja, aquela em que a árvore que apresente o menor número de passos (=menor número de mudanças de estado de caráter) será a escolhida para explicar um determinado conjunto de dados. Desse modo, não há um modelo evolutivo explícito embasando essa metodologia. Para a Máxima Parcimônia existem dois tipos de algoritmo de busca da árvore mais parcimoniosa: 1) busca exaustiva, em que todas as possibilidades de topologias são verificadas; 2) busca heurística, em que apenas um subconjunto de árvores probabilisticamente mais prováveis é examinado. Este último, em termos práticos, reduz sensivelmente o tempo de processamento computacional.

Tendo em vista que o uso de diferentes marcadores moleculares tem se mostrado útil para o estudo das relações evolutivas em diversos grupos, o presente trabalho visa determinar as relações filogenéticas entre as diferentes espécies de *Pimelodella* que ocorrem nos rios da bacia

hidrográfica do Alto Paraná através do sequenciamento de regiões específicas do DNA mitocondrial utilizando o método da Máxima Parcimônia

Materiais e métodos:

Material de estudo e locais de coleta:

No presente trabalho foram analisadas espécies e populações do gênero *Pimelodella*, provenientes de rios pertencentes às principais bacias hidrográficas do Estado de São Paulo. Os exemplares utilizados no trabalho estão depositados na coleção do Laboratório de Ictiologia de Ribeirão Preto (LIRP), Departamento de Biologia da FFCLRP-USP.

Após as coletas, os espécimes foram trazidos ao Laboratório de Ictiogenética da Universidade de São Paulo (USP-SP) e processados. Após a retirada dos tecidos para a extração do DNA, os espécimes receberam numeração correspondente aos registros do próprio laboratório e foram armazenados em etanol 100%. Esses exemplares foram levados para Ribeirão Preto para serem identificados, para tanto contamos com o auxílio do Dr. Flávio Alicino Bockmann e, posteriormente, foram depositados na coleção (LIRP). Os exemplares de *Pimelodella spelaea*, *Pimelodella kronei* e *Pimelodella transitoria*, após preparo citogenético e retirada de tecidos para extração de DNA, foram devolvidos para a professora Dra. Eleonora Trajano (Departamento de Zoologia da Universidade de São Paulo).

Algumas amostras foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Claudio Oliveira, UNESP- Botucatu.

Foram os seguintes os pontos de coleta:

Tabela 3.1: Locais de coletas das espécies e suas respectivas coordenadas geográficas.

Espécie	Localidade	Bacia Hidrográfica	GPS	Nº de indivíduos	Nº Tombo
<i>Pimelodella sp</i>	Araras - SP	Paraná	22°22,994" 47°25,825"	6	LIRP 8141
<i>Pimelodella sp</i>	Pilar do Sul - SP	Paraná	23°48,800" 47°42,500"	6	LIRP 8149
<i>Pimelodella sp</i>	São Miguel Arcanjo – SP (dois lotes)	Paraná	23°54'690" 47°57,649"	6	LIRP 8151 e 8152
<i>Pimelodella sp</i>	Botucatu - SP	Paraná	22°52,081" 48°22,270"	6	LIRP 8146
<i>Pimelodella lateristriga</i>	Serra D'água - RJ	Atlântico- leste	22°53,491" 44°16,772"	6	LIRP 8142
<i>Pimelodella spelaea</i>	São Domingos – GO Gruta	Tocantins	13°49, 46°21,	4	LIRP 8160
<i>Pimelodella sp</i>	Cordirburgo – MG	São Francisco	19°07,296" 44°21,124"	4	LIRP 8153
<i>Pimelodella sp</i>	Mariápolis - SP	Paraná	21°47,607" 51°18,481"	6	LIRP 8150
<i>Pimelodella sp</i>	Cardoso - SP	Paraná	20°04,905" 49°55,373"	6	LIRP 8144
<i>Pimelodella sp</i>	Colina-SP	Paraná	20°44,635" 48°34,334"	6	LIRP 8143
<i>Pimelodella sp</i>	Guapiara-SP	Paraná	24°01,337" 48°34,262"	6	LIRP 8145
<i>Pimelodella sp</i>	Pirassununga- SP	Paraná	21°55,558" 47°22,195"	8	LIRP 8147 e 8148
<i>Pimelodella sp</i>	Salesópolis-SP	Paraná	23°31,465" 45°47,510"	6	Lote 1059
<i>Pimelodella australis</i>	Pelotas-RS	Atlântico- Sudeste	31°28,463" 52°12,469"	5	Lote 3365
<i>Pimelodella mucosa</i>	Cuiabá-MT	Paraguai	15°21,20" 56°06,54"	3	Lote 3963
<i>Pimelodella sp</i>	Marapoama- SP	Paraná	21°11,35" 49°07,22"	4	Lote 4704
<i>Pimelodella sp</i>	São Gabriel da Cachoeira- AM	Amazônica	00°04,665" 66°49,546"	6	Lote 6942
<i>Pimelodella lateristriga</i>	Campos dos Goytacazes- RJ	Atlântico- leste	21°20,463" 41°20,100"	5	Lote 3463
<i>Pimelodella avanhandavae</i>	Bela Vista de Goiás-GO	Paranaíba	17°05,580" 48°45,415"	5	Lote 7265
<i>Pimelodella lateristriga</i>	Macaé-RJ	Atlântico- leste	22°14,070" 41°51,446"	5	Lote 3475
<i>Pimelodella lateristriga</i>	Morretes-PR	Atlântico- sudeste	25°31,149" 48°47,527"	2	Lote 3660
<i>Pimelodella mucosa</i>	Aquidauana- MS	Paraguai	19°34,337" 56°14,495"	5	Lote 3774
<i>Pimelodella kronei</i>	PETAR - Sistema Bombas	Paraná	24°36,250" 48°41,221"	6	Animais devolvidos ao rio
<i>Pimelodella transitoria</i>	PETAR – Rio Betari	Paraná	24°33,026" 48°40,875"	6	Animais devolvidos ao rio

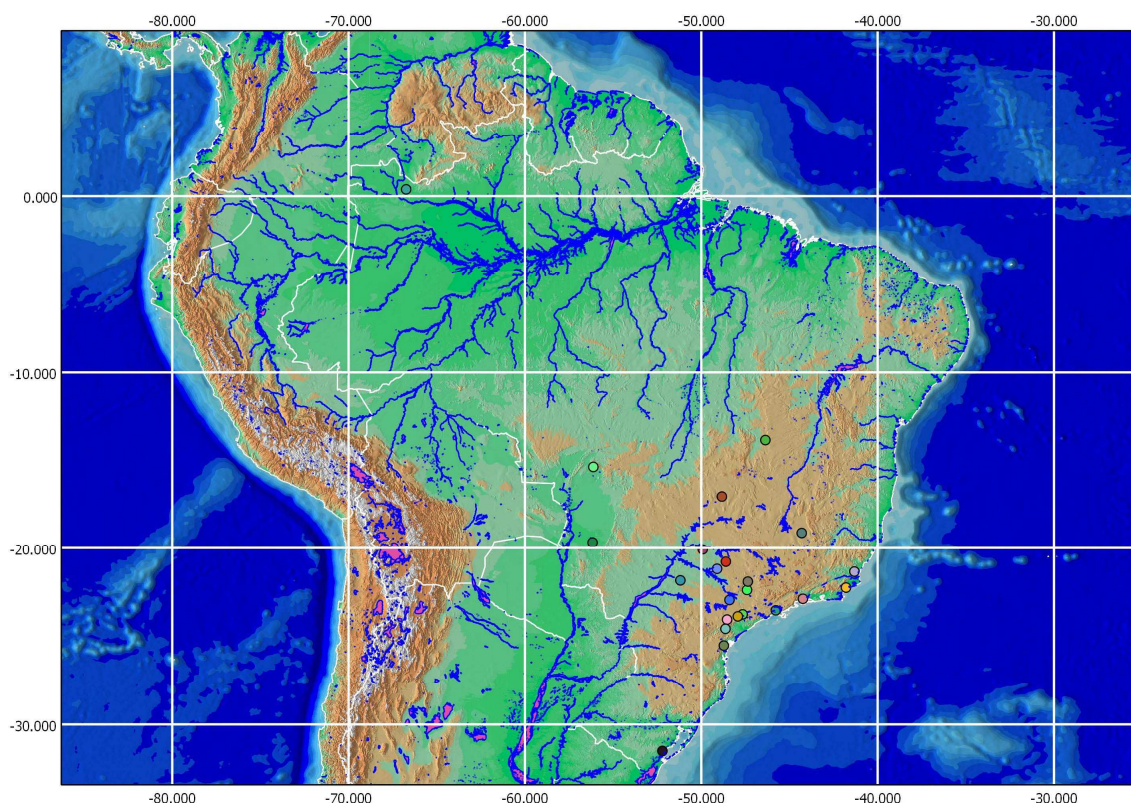


Figura 3.1: Pontos de coleta marcados no mapa do Brasil. Fonte: Quantum GIS 1.6.0-Capiapo.

O DNA total dos espécimes foi extraído a partir de porções de tecido do fígado, músculo, coração e/ou nadadeiras fixados em álcool 96% de acordo com o protocolo descrito por Aljanabi & Martinez (1997). Devido à boa quantidade e qualidade do DNA obtido das nadadeiras, esta foi utilizada preferencialmente.

Foram utilizadas seis amostras por ponto de coleta para a realização da amplificação dos genes em estudo, levando-se em conta a representatividade dos locais de coleta. Quando da ocorrência de amostras únicas como foi o caso de Linhares-ES e Cordisburgo-MG (rios epígeos), estas foram usadas como padrão da região em estudo.

Amplificação dos genes mitocondriais:

A partir do DNA extraído e diluído, foram realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação dos genes mitocondriais: ATPase 6 e 8, citocromo b, NADH2 e COI.

As amplificações dos genes mitocondriais foram realizadas como explicado no capítulo 2.

Para cada gene foi utilizado um programa específico listados na tabela 3.2.

Tabela 3.2: Programas utilizados para a amplificação dos genes mitocondriais:

Genes mitocondriais	Programa utilizado
ATPase 6/8	94°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos a 92°C por 1 minuto; 52°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.
Citocromo b	94°C por 4 minutos; seguida de 6 ciclos a 92°C por 30 segundos; 52°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto e 30 segundos; seguida de 41 ciclos a 94°C por 30 segundos; 56°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.
NADH2	94°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos a 92°C por 1 minuto; 52°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.
COI	94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 92°C por 1 minuto; 56°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os oligonucleotídeos iniciadores ("primers") utilizados para a amplificação dos genes mitocondriais seqüenciados no presente trabalho estão apresentados na tabela 3.3.

Tabela 3.3: *Primers* utilizados para a amplificação do genoma mitocondrial, suas seqüências e referências bibliográficas:

Gene	“Primer”	Seqüência 5’→3’	Referência Bibliográfica
ATPase6/8	L8331	5’AAAGCRTYRGCCCTTTTAAGC 3’	Sivasundar et al., 2001
	H9236	5’GTTAGTGGTCAKGGGCTTGGRTC 3’	
Citocromo b	L14724	5’ TGA CTT GAA RAA CCA YCG TTG 3’	Perdices, 2002
	H16460	5’ CGA YCT TCG GAT TAC AAG ACC G 3’	
NADH2	L4437	5’ AAG CTT TCG GGC CCA TAC C 3’	Macey et al. (1997a,b)
	H4980	5’ ATT TTT CGT AGT TGG GTT TGR TT 3’	
COI	COXI-F2	5’ TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC 3’	Ward et al., 2005
	COXI-R2	5’ ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA 3’	

Depois de terminada a reação, os produtos foram precipitados utilizando-se acetato de sódio seguindo protocolo sugerido pelo fabricante (Applied Biosystems).

As seqüências foram visualizadas em seqüenciador automático (modelo ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer da Applied Biosystems/fabricado pela HITACHI) do Instituto de Química-USP.

As seqüências obtidas foram verificadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando-se o programa ‘Blastn’, para confirmação da similaridade com as seqüências mitocondriais de outros peixes.

Sequenciamento e Alinhamento:

Foram sequenciadas seis amostras de cada ponto de coleta. Depois de realizado o alinhamento, se todas as seqüências eram idênticas, apenas uma foi utilizada na análise. No caso de duas ou mais seqüências serem diferentes, todas eram usadas. As regiões gênicas foram primeiramente analisadas separadamente e posteriormente concatenadas.

As sequências de DNA foram verificadas individualmente, usando-se o programa BioEdit versão 5.0.9 (HALL, 1999) e posteriormente alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W v1.4 (THOMPSON et al., 1994). Analisamos a saturação nos genes utilizando o programa DAMBE (XIA & XIE, 2001) com modelo de distância Tamura-Nei (TAMURA & NEI, 1993).

As análises baseadas no método de Máxima Parcimônia foram realizadas com o auxílio do programa PAUP 4.0 (Swofford, 2002), utilizando busca heurística (adição de passos – *stepwise addition*) com algoritmo “tree bisection and reconnection” (TBR). Foram calculados os índices de consistência (IC), índice de homoplasia (IH) e índice de retenção (IR) através do programa PAUP 4.0 (SWOFFORD, 2002).

O programa TreeRot 2.0 (SORENSEN, 1999) foi empregado para a obtenção do índice de decaimento de Bremer (BREMER, 1994). O suporte particionado de Bremer - PBS (BAKER & DESALLE, 1997), que é uma variação do suporte de Bremer, que indica a contribuição de cada conjunto de dados para o valor final do suporte de Bremer. O valor de PBS individual pode ser positivo, negativo ou zero.

As filogenias obtidas pela máxima parcimônia foram testadas pelo método de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) usando-se 100 réplicas de bootstrap e 1000 de *random stepwise addition* e as deleções foram consideradas dados ausentes.

Resultados e Discussão:

A escolha dos genes utilizados neste trabalho (ATPase subunidades 6 e 8, citocromo b, NDH2 e COI) foi baseada nos dados obtidos na literatura e também em resultados obtidos sobre o gênero *Rhamdia* (PERDICES, 2002), onde estes genes distinguiram múltiplas linhagens e deram suporte para a monofilia do gênero.

Os grupos externos utilizados foram: *Imparfinis minutus* (Heptapteridae), *Microglanis cottoides* (Pseudopimelodidae), *Acentronichthys leptos* (Heptapteridae) e *Rhamdia quelen* (Heptapteridae).

Os dados obtidos com o sequenciamento dos quatro genes mitocondriais estão apresentados na tabela 3.4.

Tabela 3.4: Comprimento das sequências obtidas, número de sítios invariáveis, número de sítios variáveis não informativos e informativos para a parcimônia, taxas de transição e transversão (Ti/Tv) e frequência de bases para os táxons estudados.

	Dados concatenados
Comprimento (pb)	3029
Sítios variáveis informativos para Parcimônia	791
Nº de árvores geradas	6
Comprimento	2721
Índice de Consistência	0,567
Índice de Homoplasia	0,433
Índice de Retenção	0,689

Foram obtidas as sequências dos quatro genes mitocondriais para 128 indivíduos de *Pimelodella*, sendo que 32 foram utilizados para a construção da árvore filogenética. Esses indivíduos são provenientes de 18 drenagens.

As seguintes espécies foram analisadas neste trabalho: *P. australis*, *P. lateristriga*, *P. kronei*, *P. transitoria*, *P. sp nova* (Amazônia), *P. gracilis*, *P. spelaea*, *P. mucosa*, *P. laurenti* e *P. avanhandavae*.

A reconstrução filogenética a partir da Máxima Parcimônia foi realizada, inicialmente, com cada gene em separado (dados não apresentados) e depois foi realizada a análise simultânea das sequências concatenadas (figura 3.2).

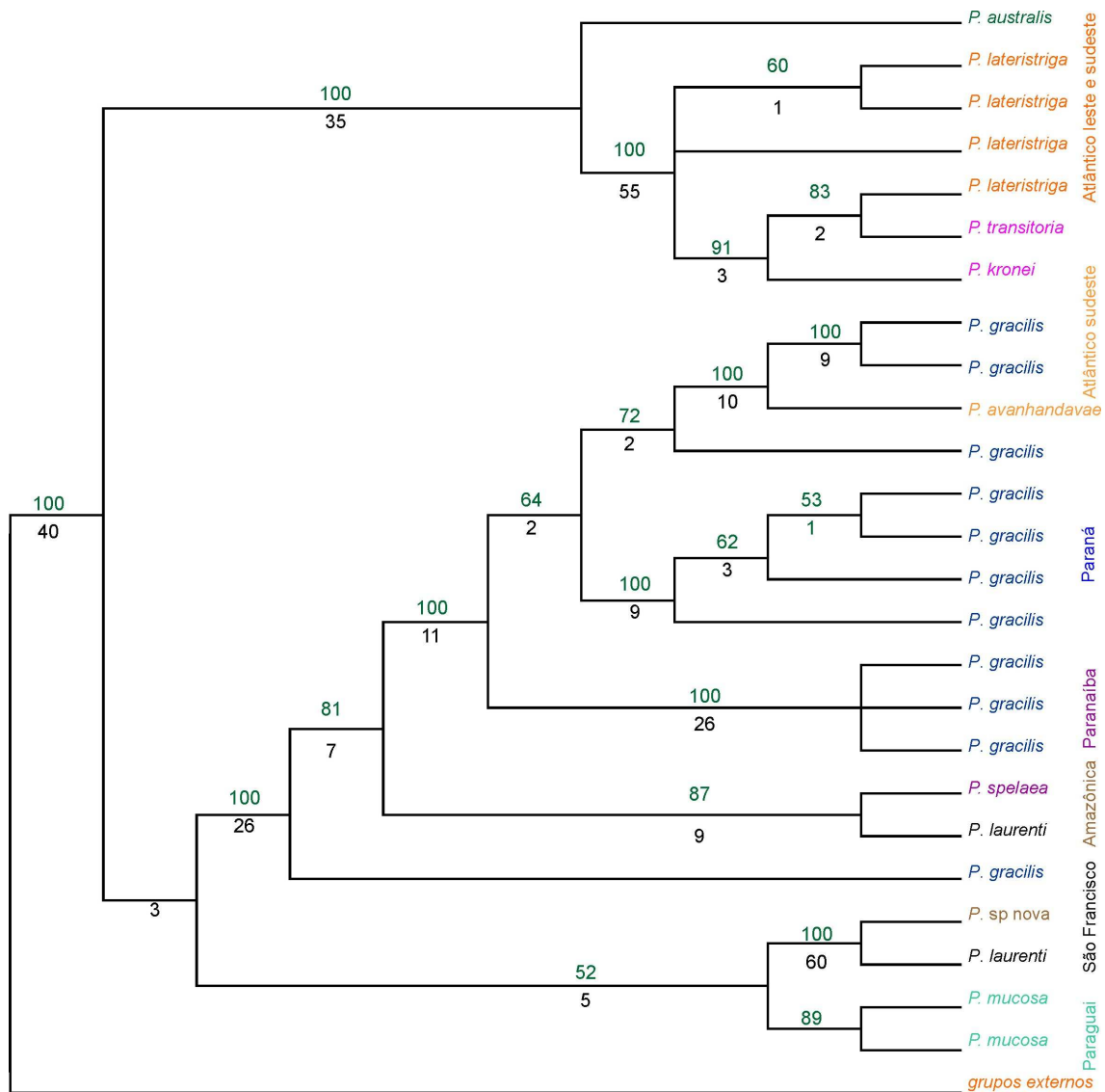


Figura 3.2: Árvore filogenética de consenso estrito de seis árvores mais parcimoniosas com base na análise simultânea dos quatro genes mitocondriais. Valores de *bootstrap* estão localizados acima dos ramos (em verde) e o Índice de Bremer abaixo dos ramos (em preto).

A árvore combinada dos quatro genes possui uma resolução melhor que a análise separada. Da combinação de todas as partições emerge um suporte não encontrado quando os genes são analisados separadamente. Os valores de sustentação dos ramos (*bootstrap*) obtidos para todas as análises variaram de 53 a 100. O teste estatístico do *bootstrap* é realizado para testar a confiabilidade das relações filogenéticas. Através de estudos de simulação, Hillis & Bull (1993) sugerem os valores de *bootstrap* de 70% como limiar de significância.

Os valores de PBS para cada nó específico são mostrados na tabela 3.5.

Tabela 3.5: Valor absoluto de contribuição de cada um dos genes para todos os ramos.

	ND2	Citocromo b	ATPase 6 e 8	COI	Total/nó
1	1	0	-1	0	0
2	1	1	0	0	2
3	0	2	1	-1	2
4	9	9	21	16	55
5	4	18	6	7	35
6	0	5	4	0	9
7	1	6	3	0	10
8	0	2	0	0	2
9	0	0	1	0	1
10	-1	1	2	-1	1
11	0	5	3	1	9
12	3	-3	2	0	2
13	3	13	8	2	26
14	4	6	0	1	11
15	-3	16	-4	-2	7
16	-2	8	1	0	7
17	5	25	-2	-2	26
18	9	20	19	12	60
19	-8	61	-25	-13	15
20	4	6	-4	-1	5
21	4	-4	2	1	3
22	11	15	5	13	44
23	9	20	8	3	40
24	0	13	3	0	16
Total/gene	54	245	53	36	

Apesar de todas as partições apresentarem algum pontos de conflito (números negativos) a contribuição final total é positiva. O citocromo b foi a

partição com maior suporte de topologia final, cerca de 4 vezes maior do que as outras partições.

A saturação de nucleotídeos foi analisada com o programa Dambe versão 5.2.6 (XIA & XIE, 2001) com modelo de distância Tamura Nei. A distribuição de mudanças nucleotídicas em função das distâncias genéticas deve ser linear (SCHNEIDER, 2003) e não evidenciou saturação para os genes individualmente, nem concatenados. Os valores de transição e transversão mantiveram uma tendência de aumento linear com o aumento na divergência entre as sequências (figura 3.3).

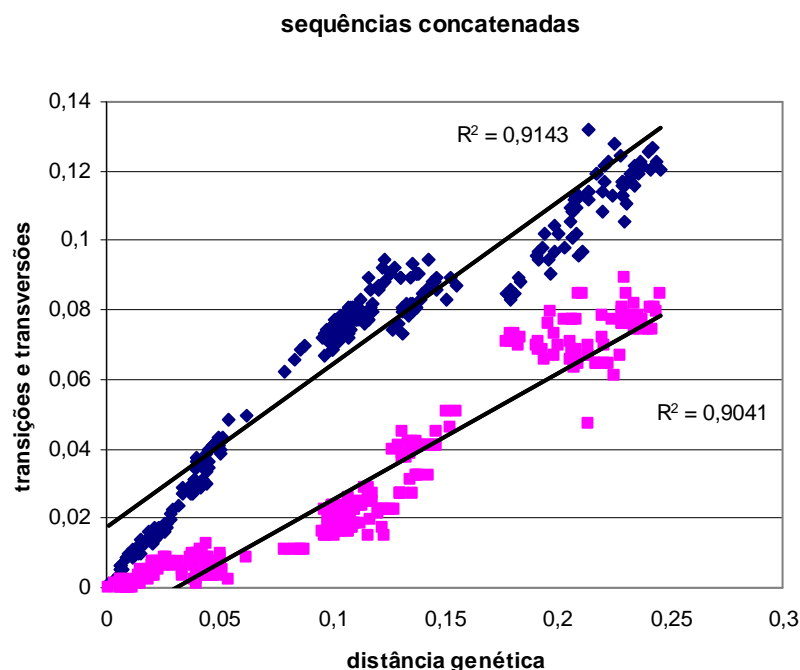


Figura 3.3: Gráfico mostrando a frequência de transições (s) e transversões (v) *versus* a divergência das sequências utilizando o modelo Tamura-Nei (1993), para os todos os genes concatenados.

A análise do cladograma permite ter uma noção da separação das espécies por bacias e microbacias hidrográficas. É possível observar dois clados distintos, sendo um clado formado pelas populações do Atlântico

leste, sudeste e Paranapanema, e outro formado pelas populações da Bacia do Paraná, Tocantis, São Francisco, Amazonas e Paraguai.

No primeiro clado, as bacias apresentam uma grande proximidade geográfica, sendo que o clado da população do Paranapanema (PETAR) é grupo-irmão na população do Atlântico-sudeste (Morretes-PR), por serem espécies próximas. Contudo, outras populações provenientes também do Paranapanema (São Miguel Arcanjo-SP, Pilar do Sul-SP e Guapiara-SP) ficaram distantes da população do PETAR, devido ao fato de serem espécies diferentes.

Outro clado observado compreende amostras provenientes das microbacias do Mogi-Guaçu, Pardo, Paranaíba, Turvo, e Tietê que se encontram próximos geograficamente, porém sem conexões atuais, sendo que nossos dados moleculares e morfológicos indicam que esses indivíduos sejam mesma espécie (*Pimelodella gracilis*). Todas essas amostras são provenientes do Alto Paraná.

Altas taxas de divergência intra-específica podem ser consequência da existência de diferentes populações geograficamente isoladas (Herbert et al, 2003). Portanto, a separação em clados distintos de amostras da mesma espécie pode ser explicada pelo isolamento geográfico, visto que algumas sub-bacias tiveram conexão no passado. Por exemplo, o ocorrido entre os rios Tietê e Paraíba do Sul (CASTRO et al., 2003), que foram responsáveis pela distribuição de algumas de suas espécies também em drenagens vizinhas, tais como: rios Paraíba do Sul, Ribeira de Iguape e algumas drenagens litorâneas menores (LANGEANI, 1989; WEITZMAN & MALABARBA, 1999; RIBEIRO, 2006; RIBEIRO et al., 2006, SERRA et al., 2007), ou ainda no Rio São Francisco (BRITSKI et al., 1988, BRITTO & CASTRO, 2002).

Juntamente com o clado de populações provenientes do Alto Paraná, encontra-se a população do Paranaíba (Bela Vista de Goiás-GO), identificada no nosso trabalho como *Pimelodella avanhandavae*. A proximidade geográfica entre as Bacias do Paraná e do Paranaíba poderia explicar o agrupamento no mesmo clado.

Um grupo-irmão do clado das amostras do Paraná é formado por populações provenientes da Bacia do Tocantins e São Francisco. Essas Bacias encontram-se geograficamente e filogeneticamente mais distantes quando comparadas com as amostras da Bacia do Paraná. A proximidade do ponto de coleta de São Domingos-GO (Bacia do Tocantins) com o limite da divisa da Bacia do São Francisco provavelmente foi um dos motivos que agrupou essas amostras no mesmo clado.

A população da microbacia do Rio do Peixe (Mariápolis-SP) foi recuperada como grupo-irmão do clado do Alto Paraná e também com o clado do Tocantins e São Francisco. Provavelmente há necessidade de mais informações que resolvermos melhor a relação dessa população com as outras estudadas, pois são populações da mesma espécie, *Pimelodella gracilis*.

As populações do Amazonas (espécie nova ainda não descrita) e Paraguai agruparam em um clado separado e são mais basais na árvore filogenética obtida.

Esses dados são provenientes de dados filogenéticos preliminares. Se observarmos detalhadamente a árvore pelas espécies identificadas, podemos concluir que os agrupamentos obtidos podem ser explicados com a identificação das espécies e também com a biogeografia do grupo. As populações da mesma espécie estão num mesmo clado, com exceção da amostra proveniente de Mariapolis-SP.

Os nós mais internos apresentam valores de *bootstrap* mais altos. Este fato pode ser explicado pela necessidade de inclusão de outras espécies, o que auxiliaria em uma melhor separação dos clados.

Os grupos externos estão presentes na base da árvore, sendo que o gênero *Imparfinis* foi o que se mostrou geneticamente mais distante de *Pimelodella*, enquanto *Rhamdia* se mostrou geneticamente mais próximo.

Desta forma, nossos dados sobre as sequências sugerem que, populações separadas por microbacias se agrupam, apesar do isolamento geográfico.

Eventos de vicariância separando espécies-irmãs têm sido atribuídos a tectônica ou outros como movimentos epirogênicos, erosão diferencial, resultando em mudanças nos limites das bacias hidrográficas (por exemplo, captura de córrego de cabeceira), e transgressões marinhas (LUNDBERG et al., 1998; RIBEIRO, 2006; SABAJ PEREZ et al., 2007).

Por estarem confinados aos rios e córregos, peixes de água doce têm capacidade limitada de dispersão através das barreiras marítimas ou terrestres (MYERS 1949; 1966). Essa limitação acarreta num empobrecimento da ictiofauna da América do Sul em níveis taxonômicos. (LUNDBERG et al 1998; ALBERT & LOVEJOY et al., 2006).

Os dados obtidos para o gênero *Pimelodella* nos permitem sugerir que durante as formação da Bacia do Paraná não houve troca das espécies com as Bacias adjacentes (para o gênero em questão). Devido ao fato de não termos encontrado, com a metodologia utilizada, populações da mesma espécie em diferentes bacias hidrográficas, podemos sugerir que um dos motivos que gerou esse padrão de distribuição pode ser a baixa capacidade de dispersão.

A análise filogenética obtida corrobora com os resultados gerados com a metodologia do DNA *barcode*, pois o padrão da árvore obtida é muito semelhante nas duas metodologias. Isso reforça a ideia da importância de utilizarmos metodologia diferentes para tentarmos explicar as relações existentes entre as espécies.

Referências Bibliográficas



AB'SABER, A. N. 1957. **Geomorfologia**. Boletim Paulista de Geografia. 26: 38-49.

AB'SABER, A. N. 1998. Megageomorfologia do território brasileiro. In: CUNHA, S. B. & GUERRA, A. J. T. (Eds.). **Geomorfologia do Brasil**. Rio de Janeiro : Bertand Brasil, 71-106.

ALBERT, J.S.; LOVEJOY, N.R. & CRAMPTON, W.G.R. 2006. Miocene tectonism and the separation of cis- and trans-Andean river basins: evidence from Neotropical fishes. **J S Am Earth Sci.** 21: 14–27.

ALJANABI, S.M. & MARTINEZ, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Res.** 25: 4692-4693.

ALMEIDA FILHO, R.; MIRANDA, F. P. & BEISL, C. H. 2005. Evidência de uma mega captura fluvial no Rio Negro (Amazônia) revelada em modelo de elevação digital da RTM. In: **XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, 2005, Goiânia. Anais.São José dos Campos: INPE, 1701-1707.

ALMEIDA, F.S.; SODRE, L.M.K. & CONTEL, E.P.B. 2003. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tiete e Paranapanema Rivers. **Genet Mol Biol.** 26(3): 301-305.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; TRAJANO, E. & TOLEDO FILHO, S.A. 1992. Cytogenetic analysis of the Brazilian blind catfish *Pimelodella kronei* and of its presumed ancestor *Pimelodella transitoria*. **Caryologia.** 45: 255-262.

APONE, F.; CARVALHO, M. & CAVALLARO, M. R. 2011. Biogeografia de três espécies de piranhas (Characiformes: Serrasalminidae) com distribuição compartilhada entre as bacias do Rio Paranaíba (alto Rio Paraná) e Rio Tocantins, Brasil central. Painel apresentado no **XIX Encontro Brasileiro De Ictiologia**, Manaus- AM.

ARDURA, A.; LINDE, A.R.; MOREIRA, J.C. & GARCIA-VAZQUEZ, E. 2010. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. **Biol Conserv.** 143: 1438–1443.

ARMSTRONG, K.F. & BALL, S.L. 2005. DNA Barcodes for biosecurity: invasive species identification. **Phil Trans R Soc B.** 360: 1813-1823.

AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A. & SAUNDERS, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Ann Rev Ecol Syst.** 18: 489-522.

AVISE, J.C.; LANSMAN, R.A. & SHADE, R.O. 1979. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. **Genetics.** 92: 279-295.

BAKER, R.H. & DeSALLE, R. 1997. Multiple sources of character information and the phylogeny of Hawaiian drosophilids. **Syst Biol.** 46(4):654-673.

BARTLETT, S. E. & W. S. DAVIDSON. 1991. Identification of Thunnus Tuna species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b genes. **Can J Fish Aquat Sci.** 48:309-317.

BERMINGHAM E. & AVISE, J.C. 1986. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. **Genetics**. 113: 939-965.

BILLINGTON, N. & HEBERT, P. 1991. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. **Can J Fish Aquat.Sci.** 48(1, suppl):80-94.

BISHOP, P. 1995. Drainage rearrangement by river capture, beheading and diversion. **Phys Geogr** 19 (4):449-473.

BOCKMANN, F. A. & G. M. GUAZZELLI. 2003. Family Heptapteridae (Heptapterids). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O. & FERRARIS, C.J. JR. (Orgs.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 406-431.

BOCKMANN, F.A. 1998. **Análise filogenética da família Heptapteridae (Teleostei, Ostariophysi, Siluriformes) e redefinição de seus gêneros**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 599p.

BOCKMANN, F.A., 1994. Description of *Mastiglanis asopos*, a new pimelodid catfish from northern Brazil, with comments on phylogenetic relationships inside the subfamily Rhamdiinae (Siluriformes: Pimelodidae). **Proc Biol Soc Wash.** 107: 760– 777.

BOORE, J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Res.** 27:1767-1780.

BORBA, R.S.; PARISE-MALTEMPI, P.P. & ALVES, A.L. 2008. Análise cariotípica de *Pimelodella meeki* (Teleostei: Heptapteridae) do Ribeirão Claro na bacia do Corumbataí (Rio Claro – SP). **XII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes**, CD-ROM. Uberlândia, MG.

BREMER, K. 1994. Branch support and tree stability. **Cladistics**. 10: 295-304.

BRITSKI, H.A. 1981. Peixes de água doce. In: CARVALHO, J.C.M. (Coord.) **Atlas da fauna brasileira**. São Paulo: Melhoramentos, 84-93.

BRITSKI, H.A., SATO, Y. & ROSA, A.B.S. 1988. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco)**. 3ª ed. Brasília: CODEVASF, 115p.

BRITTO, M.R. & CASTRO, R.M.C. 2002. New Corydoradine catfish (Siluriformes: Callichthyidae) from the upper Paraná and São Francisco: the sister group of *Brochis* and most of *Corydoras* species. **Copeia**. 4:1006-1015.

BROWN, W.M.; GEORGE, M. JR. & WILSON, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proc Natl Acad Sci**. 76: 1967-1971.

BRUFORD, M.W. & WAYNE, R.K. 1993. Microsatellites and their application to population genetics studies. **Curr Opin Genet Devel**. 3: 939-943.

BRUNNER, P.C.; DOUGLAS, M.R. & BERNATCHEZ, L. 1998. Microsatellite and mitochondrial DNA assessment of population structure and stocking effects in Arctic charr *Salvelinus alpinus* (Teleostei: Salmonidae) from central Alpine lakes. **Mol Ecol**. 7: 209-223.

BUCKUP, P. A. 2011. The eastern Brazilian Shield. In: ALBERT, J. S. & R. E. REIS (Eds.). **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. Los Angeles: University of California Press, 203-210.

CALCAGNOTTO, D., S.A. SCHAEFER, & R. DeSALLE. 2005. Relationships among characiforms fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Mol Phylogenet Evol.** 36(1): 135–153.

CALCAGNOTTO, D.; RUSSELLO, M. & DESALLE, R. 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. **Mol Ecol Notes.** 1(4): 245-247.

CASTRO, R.M.C.; CASATTI, L.; SANTOS, H.F.; FERREIRA, K.M.; RIBEIRO, A.C.; BENINE, R.C.; DARDIS, G.Z.P.; MELO, A.L.A.; ABREU, T.X.; BOCKMANN, F.A.; CARVALHO, M.; GIBRAN, F.Z. & LIMA, F.C.T. 2003. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do Rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. **Biota Neotrop.** 3(1): <http://www.biotaneotropica.org.br/v3n1/pt/abstract?article+BN01703012003>.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L.A.C. & MOREIRA-FILHO, O. 2006. Cytogenetic characterization and description of an XX/XY1Y2 sex chromosome system in catfish *Hartia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). Cytogenetic **Gen Res.** 112: 320-324.

CHRISTOFOLETTI, A. 1980. **Geomorfologia**. São Paulo: Edgard Blücher. 174p.

CLAYTON, D.A. 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. **Cell** 28: 693-705.

DIAS, A.L. & FORESTI, F. 1993. Cytogenetic studies on fishes of the family Pimelodidae (Siluroidei). **Rev Brasil Genet.** 16: 585-600.

EIGENMANN, C.H. 1917. Pimelodella and Typhlobagrus. Mem. **Carnegie Mus.** 7(4): 229-258.

FELSENSTEIN, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the *bootstrap*. **Evolution**. 39: 783-791.

FERRARIS, C. J., Jr. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**. 1418: 1-628.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. 1996. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2ª ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEM.

FITZSIMMONS, N.N.; MORITZ, C.; LIMPUS, C.J.; POPE, L. & PRINCE, R. 1997. Geographic structure of mitochondrial and nuclear gene polymorphisms in Australian green turtle populations and malebiased gene flow. **Genetics**. 147: 1843–1854.

FOWLER, H. W. 1941. A collection of fresh-water fishes obtained in eastern Brazil by Dr. Rodolpho Von Ihering. **P Acad Nat Sci Phila**. 93: 123-199.

GARAVELLO, J. C.; GARAVELLO, J. P. & A. K. OLIVEIRA. 2010. Ichthyofauna, fish supply and fishermen activities on the mid-Tocantins River, Maranhão State, Brazil. **Braz J Biol**. 70 (3): 575-585.

GARCIA, C. & ALMEIDA-TOLEDO, L.F. 2010. Comparative chromosomal analyses in species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae): occurrence of structural and numerical polymorphisms. **Caryologia**. 63 (1): 32-40.

GARCIA, C. 2010. **Estudos cromossômicos e moleculares em *Rhamdia* (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae): análise de relações evolutivas**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 181p.

GUAZZELLI, G. M. 2003. **Relações filogenéticas do gênero *Pimelodella* Eigenmann & Eigenmann 1888 (Siluriformes, Pimelodidae)**. Universidade de São Paulo, São Paulo. Tese de Doutorado não publicada. 232p.

GUAZZELLI, G. M. 1997. **Revisão das espécies de *Pimelodella* Eigenmann & Eigenmann, 1888 (Teleostei: Siluriformes: Pimelodidae) dos sistemas costeiros do Sul e Sudeste do Brasil**. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Dissertação de Mestrado não publicada. 150p.

HALL, T.A. 1999. **BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis**. Raleigh, US: North Carolina State University.

HARDMAN, M. & LUNDBERG, J.G. 2006. Molecular phylogeny and chronology of diversification for “phractocephaline” catfishes (Siluriformes: Pimelodidae) based on mitochondrial DNA and nuclear recombination activating gene 2 sequences. **Mol Phylogenet Evol** 40: 410-418.

HARDMAN, M. 2005. The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome b sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes). **Mol Phylogenet Evol** 37: 700–720.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L. & DEWAARD, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc R Soc Lond B Biol Sci.** 270: 313–321.

HEBERT, P.D.N.; PENTON, E.H.; BURNS, J.M.; JANZEN, D.H. & HALLWACHS, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proc Natl Acad Sci.** 101: 14812–14817.

HEBERT, P.D.N.; STOECKLE, M.Y.; ZEMLAK, T.S. & FRANCIS, C.M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS Biol.** 2: e312.

HILLIS, D.M. & BULL, J.J.1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Syst. Biol.** 42: 182–192.

KERR, K.C.R.; STOECKLE, M.Y.; DOVE, C.J.; WEIGT, L.A.; FRANCIS, C.M. & HEBERT, P.D.N. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. **Mol Ecol Notes.** 7: 535-543.

KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol.** 16: 111–120.

KOBMULLER, S.; STURMBAUER, C.; VERHEYEN, E.; MEYER, A. & SALZBURGER, W. 2006. Mitochondrial phylogeny and phylogeography of East African squeaker catfishes (Siluriformes, *Synodontis*. **BMC Evol. Biol.** 6:49.

LANGEANI, F. 1989. **Ictiofauna do Alto Curso do rio Tietê (SP): taxonomia.** Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LANGEANI, F., CASTRO, R.M.C., OYAKAWA, O.T., SHIBATTA, O.A., PAVANELLI, C.S., CASATTI, L. 2007. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biot Neotrop.** 7(3):181-197.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.; et al. 2007. ClustalW and ClustalX version 2.0. **Bioinformatics.** 23:2947-2948.

LEE, W. J. & T. D. KOCHER. 1996. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. **J Fish Biol.** 49:169-171.

LIMA, J.E.F.W & SILVA, E.M. 2008. Hidrografia. In: **Águas Emendadas**. FONSECA, F. O. (Org.). Brasília: **Secretaria de Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente**, 542p.

LOWE-MCCONEEL, R.M. 1975. **Fish communities in tropical freshwaters, their distribution, ecology and evolution**. London: Longman, 337p.

LOWE-MCCONNELL, R.H. 1999. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: Edusp.

LUNDBERG, J.G.; BORNBUSCH, A.H. & MAGO-LECCIA, F. 1991a. *Gladioganis conquistador* s. sp., from Ecuador with diagnoses of the subfamilies Rhamdiinae Bleeker and Pseudopimelodinae n. subf. (Siluriformes, Pimelodidae). **Copeia**, 1991:190-209.

LUNDBERG, J.G.; MAGO-LECCIA, F. & NASS, P. 1991b. *Exallodontus aguanai*, a new genus and species of Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from deep river channels of South America, and delimitation of the subfamily Pimelodinae. **Proc Biol Soc Wash.** 104: 840-869.

LUNDBERG, J.G.; MARSHALL, L.G.; GUERRERO, J.; HORTON, B.; MALABARBA, M.C.L.S. & WESSELINGH, F. 1998. The stage for neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M. & LUCENA, C.A.S. (Eds.). **Phylogeny and Classifications of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 13-48p.

MACEY, J. R., LARSON, A., ANANJEVA, N. B., FANG, Z., & PAPENFUSS, T. J. 1997a. Two novel gene orders and the role of light-strand replication in rearrangement of the vertebrate mitochondrial genome. **Mol. Biol. Evol.** 14: 91–104.

MACEY, J. R., LARSON, A., ANANJEVA, N. B., & PAPENFUSs, T. J. 1997b. Evolutionary shifts in three major structural features of the mitochondrial genome among iguanian lizards. **J Mol Evol.** 44: 660–674.

MADDISON, D.R. & SCHULZ, K.S. 2006. **The Tree of Life Web Project.** [<http://tolweb.org>].

MADDISON, W. P. & MADDISON, D. R. 1992. **MacClade: Analysis of phylogeny and character evolution.** Sinauer Associates, Sunderland, MA.

MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S. & LUCENA, C.A.S. 1998. **Phylogeny and classification of Neotropical Fishes.** Porto Alegre: Edipucrs, 316 p.

MARTIN, A. P. & BERMINGHAM, E. 2000. Regional endemism and cryptic species revealed by molecular and morphological analysis of a widespread species of neotropical catfish. **Proc R Soc Lond.** 267: 1135-1141.

MATSUMOTO, C.K. & HILSDORF, A.W.S. 2009. Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implication for its conservation and sustainable management. **Neotrop Ichthyol.** 7(3):395-402.

MEES, G. F. 1974. The Auchenipteridae and Pimelodidae of Suriname (Pisces, Nematognathi). **Zool Verhandl.** 132:1-256.

MELO, M. S. 2002. Canyon do Guartelá, PR: profunda garganta fluvial com notáveis exposições de arenitos devonianos. In: SCHOBENHAUS, C.; D. A. CAMPOS; E. T. QUEIROZ; M. WINGE & M. L. C. BERBERT-BORN (Eds.). **Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil**. Brasília: Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM), 279–288p.

MENEZES, N.A.; RIBEIRO, A.C.; WEITZMAN, S. & TORRES, R.A. 2008. Biogeography of Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae) revisited: phylogenetic patterns, historical geology and genetic connectivity. **Zootaxa**. 1726: 33-48.

MEYER, A. 1993. Molecular phylogenetic studies of fish. In: BEAUMONT, A.R. (Ed.). **Genetics and evolution of aquatic organisms**. London: Chapman & Hall, 219-249p.

MIRANDA RIBEIRO, A. 1914. Pimelodidae, Trachycorystidae, Cetopsidae, Bunocephalidae, Auchenipteridae, e Hypophthalmidae. In: **Comissão de Linhas Telegraficas Estrategicas de Matto-Grosso ao Amazonas, Anexo no. 5 (Historia Natural: Zoologia)**. 1–13 p, pls. 1–2.

MIYAKI, C.Y.; RUSSO, C.A.M. & PEREIRA, S.L. 2004. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: MATIOLO, S. R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 97-107p.

MOESER, A.A. & BERMINGHAM, E. 2005. Isolation and characterization of eight microsatellite loci for the Neotropical freshwater catfish *Pimelodella chagresi* (Teleostei: Pimelodidae). **Mol Ecol**. 5:363-365.

MOREIRA, A.A.; HILSDORF, A.W.S.; SILVA, J.V. & SOUZA, V.R. 2007. Genetic variability of two Nile tilapia strains by microsatellites markers. **Pesq Agropec Bras**. 42(4):521-526.

MOYER, G.R.; BURR, B.M. & KRAJEWSKI, C. 2004. Phylogenetic relationship of thorny catfishes (Siluriformes, Doradidae) inferred from molecular and morphological data. **Zool J Linnean Society**. 140: 551-575.

MOYSÉS, C.B. 2005. **Diversidade genética, estrutura populacional e análises filogenéticas no gênero *Eigenmannia* (Pisces: Gymnotiformes)**. São Paulo, 216 p. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

MYERS, G.S. 1949. Salt-tolerance of fresh-water groups in relation to zoogeographic problems. **Bijdr Dierkd.** 28: 315-322.

MYERS, W.B. & HAMILTON, W. 1966. Cenozoic tectonics of the western United States. **Rev Geophys.** 4 (4): 509-549.

NEI, M., 1978 Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**. 89: 583-590.

NELSON, S.J. 2006. **Fishes of the world**. 4a ed. United States of America: John Wiley & Sons, 600p.

NEVADO, B.; LLER, S.K.; STURMBAUER, C. SNOEKS, J.; USANO-ALEMANY, J. & VERHEYEN, E. 2009. Complete mitochondrial DNA replacement in a Lake Tanganyika cichlid fish. **Mol Ecol**. 18: 4240–4255.

NWANI, C.D.; BECKER, S.; BRAID, H.E.; UDE, E.F.; OKOGWU, O.I. & HANNER, R. 2011. DNA barcoding discriminates freshwater fishes from southeastern Nigeria and provides river system-level phylogeographic resolution within some species. **Mitochondr DNA**. Early Online: 1–9

O'REILLY, P.T.; CANINO, M.F.; BAILEY, K.M. & BENTZEN, P. 2004. Inverse relationship between F_{st} and microsatellite polymorphism in the marine fish, walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*): implications for resolving weak population structure. **Mol Ecol.** 13: 1799-1814.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R. & M.L. CARNEIRO VIEIRA. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genet Mol Biol.** 29:294-307.

ORBACZ, E.A & GAFFNEY, P.M. 2000. Genetic structure of tautog (*Tautoga onitis*) populations assayed by RFLP and DGGE analysis of mitochondrial and nuclear genes. **Fish Bull.** 98:336-344.

PALUMBI, S. R. 1996. What can molecular genetics contribute to marine biogeography? An urchin's tale. **J Exp Mar Biol Ecol.** 203:75-92.

PERDICES A, BERMINGHAM E, MONTILLA A, DOADRIO I. 2002. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei:Pimelodidae) in Central America. **Mol Phylogenet Evol.** 25:172-189.

PEREIRA, S.L.; BAKER, A.J. & WAJNTAL, A. 2002. Combined nuclear and mitochondrial DNA sequences resolve generic relationships within the Cracidae (Galliformes, Aves). **Syst Biol.** 51(6): 946-958.

dePINNA M. C. C. 1998. Phylogenetic relationships of neotropical Siluriforms: historical overview and synthesis of hypotheses. In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S. & LUCENA, C. A. S. (Eds.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes.** Porto Alegre, Edipucrs, 279-330p.

PROUDLOVE, S.P. 2001. The conservation status of hypogean fishes. **Environ Biol Fish.** 62:201-213.

QUEZADA-ROMEGIALLI, C.; FUENTES, M. & VÉLIZ, D. 2010. Comparative population genetics of *Basilichthys microlepidotus* (Atheriniformes: Atherinopsidae) and *Trichomycterus areolatus* (Siluriformes: Trichomycteridae) in north central Chile. **Environ Biol Fish.** 89:173–186.

RACH, J.; DESALLE, R.; SARKAR, I.N.; SCHIERWATER, B. & HADRY, H. 2008. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. **P Roy Soc B-Biol Sci.** 275, 237–247.

RATNASINGHAM, S. & HEBERT, P.D.N. 2007. Bold: The barcode of life data system. (www.barcodinglife.org). **Mol Ecol Notes.** 7: 355–364.

RAYMOND, M. & ROUSSET, F. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J Heredity.** 86(3):248–249.

RIBEIRO, A.C. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotrop. Ichthyol.** 4(3):225–246.

RIBEIRO, A.C., LIMA, F.C.T., RICCOMINI, C. & MENEZES, N.A. 2006. Fishes of the Atlantic rainforest of Boracéia: testimonies of the Quaternary fault reactivation within a Neoproterozoic tectonic province in Southeastern Brazil. **Ichthyol Explor Freshwaters** 17(2):157–164.

ROMERO, A. & PAULSON, K.M. 2001. It's a Wonderful Hypogean Life: A Guide to the Troglomorphic Fishes of the World. **Environ Biol Fish.** 62:13–48.

RUBINOFF, D. 2006. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. **Conserv Biol.** 4:1026-1033.

SABAJ PEREZ, MA H; AGUILERA, O. A.; JOHN G.S. & LUNDBERG, J.G. 2007. Fossil catfishes of the families Doradidae and Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes) from the Miocene Urumaco Formation of Venezuela. **P Acad Nat Sci of Phila.** 156:157-194.

SACCONE, C. & SBISÀ, E. 1994. The evolution of the mitochondrial genome. In: BITTAR, E.E. (Ed.). **Principles of Medical Biology** Vol. 1B. Evolutionary Biology. London: JAI Press, 39-72p.

SAVOLAINEN, V.; COWAN, R.S.; VOGLER, A.P.; RODERICK, G.K. & LANE, R. 2005. Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. **Philos T Roy Soc, B.** 360:1805–1811.

SCHNEIDER, H. 2003. **Métodos de análise filogenética: um guia prático.** 2^a Ed. Ribeirão Preto: Holos Editora.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. & EXCOFFIER, L. 2000. Arlequin: a software for population genetics data analysis. Version 2000. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.

SCHUBART, O. 1964. Duas novas espécies de peixe da família Pimelodidae do Rio Mogi-guaçu (Pisces, Nematognathi). **Bol Mus Nac N S Zool.** 244: 1-9.

SERRA, J.P., CARVALHO, F.R. & LANGEANI, F. 2007. Ichthyofauna of the rio Itatinga in the Parque das Neblinas, Bertioga, São Paulo: composition and biogeography. **Biota Neotrop.** 7(1): <http://www.biotaneotropica.org.br/v7n1/pt/abstract?article+BN01707012007>.

SHIMABUKURO-DIAS CK, OLIVEIRA C, REIS RE, FORESTI F. 2004. Molecular phylogeny of the armored catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). **Mol Phylogenet Evol.** 32: 152–163.

SILVA, T.M.; MONTEIRO, H.S.; CRUZ, M.A. & MOURA, J.R.S. 2006. Anomalias de Drenagem e Evolução da Paisagem no Médio Vale do Rio Paraíba do Sul (RJ/SP). **Anuário do Instituto de Geociências – UFRJ.** 29(2):210-224.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E. & ORTI, G. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochloodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Mol Ecol.** 10: 407-417.

SMITH, M. A.; FISHER, B. L.; HERBERT, P. D. N. 2005. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. **Phil Trans R Soc B.** 360: 1825–1834.

SORENSEN, M.D. 1999. **TreeRot**, version 2. Boston: Boston University.

STERBA, G. 1973. **Freshwater fishes of the world.** Vol I e II. EUA: T.F.H. Publications, 887 p.

SULLIVAN, J. P., J. G. LUNDBERG & M. HARDMAN, 2006. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes using rag1 and rag2 nuclear gene sequences. **Mol Phylogenet Evol.** 41: 636–662.

SUMMERFIELD, M.A. 1991. **Global Geomorphology.** Harlow, UK: Pearson Education Limited.

SUNNUCKS, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. **Trends Ecol. Evol.** 15: 199-203.

SUNNUCKS, P. & A. C. TAYLOR. 2008. The application of genetic markers to landscape management. In: C. PETTIT; W. CARTRIGHT; I. BISHOP; K. LOWELL; D. PULLAR; & D. DUNCAN. (Eds.). **Landscape analysis and visualisation: spatial models for natural resource management and planning**. Berlim, Alemanha: Springer, 292-317p.

SWARÇA, A.C. 2003. **Contribuição à citogenética dos Pimelodidae de grande porte: estudos cariotípicos de 4 espécies do “subgrupo” Sorubiminae**. Tese de Doutorado, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

SWOFFORD, D.L. 2000. **PAUP Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) v4.0b2 for Macintosh**. Washington: Smithsonian Institute.

TAMURA, K. AND NEI, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial-DNA in humans and chimpanzees. **Mol Biol Evol.** 10: 512–526.

TAVARES, E.S.; BAKER, A.J.; PEREIRA, S.L. & MIYAKI, C.Y. 2006. Phylogenetic relationships and historical biogeography of Neotropical parrots (Psittaciformes: Psittacidae: Arini) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Syst Biol.** 55: 454–470.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G. & GIBONS, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weighting matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22: 4673-4680.

TOLEDO, V. & FERRARI, I. 1976. Estudo citogenético de *Pimelodella* sp. e *Rhamdia hilarii* (Pimelodinae, Pimelodidae, Pisces): cromossomo marcador. **Científica** 4: 120-123.

TRAJANO E.; REIS, R.E.; BICHUETTE, M.E. & J. W. ARMBRUSTER. 2004. *Pimelodella spelaea*: A New Cave Catfish from Central Brazil, with Data on Ecology and Evolutionary Considerations (Siluriformes: Heptapteridae). **Copeia**. 2: 315-325.

TRAJANO, E. ; [Secutti, S.](#); [Mattox, G.M.T.](#) 2009. Epigean and subterranean ichthyofauna in Cordisburgo karst area, eastern Brazil. **Biota Neotrop.** (Edição em português. Impresso). 9: 277-281.

TRAJANO, E. 2007. The challenge of estimating the age of subterranean lineages: examples from Brazil. **Acta Carsologica**. 36(1):191-198.

TRAJANO, E. 2000. Cave Faunas in the Atlantic Tropical Rain Forest: Composition, Ecology, and conservation. **Biotropica** 32(4b): 882–893.

TRAJANO, E. 1997. Threatened fishes of the World: *Pimelodella kronei* (Ribeiro, 1907). **Environ Biol Fish.** 49: 332-332.

TRAJANO, E. 1996. **Ecologia, comportamento e evolução de peixes subterrâneos. Estudo de caso: *Trichomycterus* sp. da caverna Olhos d'Água, Itacarambi, MG.** Tese de Livre-Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo. 83 p.

TRAJANO, E. 1991. Population ecology of *Pimelodella kronei*, troglobitic catfish from southeastern Brazil (Siluriformes, Pimelodidae). **Environ Biol Fish.** 49(3): 757-769.

TRAJANO, E. 1987. Fauna cavernícola brasileira: composição e caracterização preliminar. **Rev Bras Zool.** 3:533-561.

VAN der STIGCHEL, J. W. R. 1946. **The South American Nematognathi of the Museums at Leiden and Amsterdam**. Leiden: E.J. Brill, 204p.

VAN der STIGCHEL, J. W. R. 1964. A new species of pimelodid catfish from eastern brazil, *Pimelodella boschmai* nov. spec. **Zool Meded.** 39 (34): 325- 330.

VASCONCELOS, C. & MARTINS-SANTOS, L.C. 2000. Chromosome polymorphism in species of the Pimelodidae family (Pisces, Siluriformes). **Hereditas** 132: 103-109.

VERGARA, J., AZPELICUETA, M. M. & GARCIA, G. 2008. Phylogeography of the Neotropical catfish *Pimelodus albicans* (Siluriformes: Pimelodidae) from Rio de la Plata Basin, South America, and conservation remarks. **Neotro Ichthyol.** 6: 75–85.

VIDOTTO, A.P.; SWARÇA, A.C.; FENOCCHIO, A.S. & DIAS, A.L. 2004. Cytogenetic studies in three *Pimelodella meeki* populations (Pisces, Pimelodidae) from Tabagi river basin (Brazil). **J Hered.** 95 (6): 517-520.

VISSOTO, P.C.; FORESTI, F & OLIVEIRA, C. 1999. Supernumerarychromosomes in two species of the family Pimelodidae (Telostei, Siluriformes). **Chromosome science** 3: 9-13.

WARD, R.D.; HOLMES, B.H.; WHITE, W.T. & LAST, P.R. 2008. DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. **Mar Freshwater Res.** 59: 57–71.

WARD, R. D. & HOLMES, B. H. 2007. An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (cox1) in fishes. **Mol EcolNotes.** 7: 899–907.

WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST, P. R. & HERBERT, P. D. N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. **Phil Trans R Soc B**. 360: 1847–1857.

WARD, R.D.; HOLMES, B.H.; ZEMLAK, T.S. & SMITH, P.J. 2007. DNA barcoding discriminates spurdogs of the genus *Squalus*. In: LAST, P.R.; WHITE, W.T. & POGONOSKI, J.J. (Eds.). **Descriptions of new dogfishes of the genus *Squalus* (Squaloidea: Squalidae)**. Austrália: CSIRO, Marine and Atmospheric Research, 117–130p.

WEIR, B.S. & COCKERHAM, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**. 38:1358-1370.

WEITZMAN, S.H. & MALABARBA, L.R. 1999. Systematics of *Spintherobolus* (Teleostei: Characidae: Cheirodontinae) from Eastern Brazil. **Ichthyol Explor.Freshwaters**. 10(1):1-43.

WONG, L.L.; PEATMAN, E.; LU, J.; KUCUKTAS, H.; HE, S.; ZHOU, C.; NA-NAKORN, U. & LIU, Z. 2011. DNA Barcoding of Catfish: Species Authentication and Phylogenetic Assessment. **PLoS ONE**. 6(3): e17812.

WRIGHT J.M. & BENTZEN P. 1994. Microsatellites: genetic markers for the future. **Rev Fish Biol**. 4: 384-388.

XIA, X.; XIE, Z. 2001. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. **J Hered**. 92:371-373.

ZARDOYA, R.; CASTILHO, R.; GRANDE, C.; FAVRE-KREY, L.; CAETANO, S.; MARCATO, S.; KREY, G. & PATARNELLO, T. 2004. Differentail population structuring of two closely related fish species, the mackerel (*Scomber scombrus*) and the chub mackerel (*Scomber japonicus*), in the Mediterranean sea. **Mol. Ecol**. 13: 1785-1798.

Estudos sobre as relações filogenéticas e biogeográficas de espécies do gênero *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae) Eigenmann & Eigenmann, 1888 do Alto Paraná

Marilena da Silva Peixoto

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Errata

Página	Linha	Onde se lê	Leia-se
iv	9	quatro	três
5	15	essaa	essa
34	3	<i>P. vitatta</i>	<i>P. laurenti</i>
34	3	<i>P. sp</i>	<i>P. sp</i>
36	legenda tabela 2.2	<i>P. vitatta</i>	<i>P. laurenti</i>
38	Tabela 2.3	<i>P. vitatta</i>	<i>P. laurenti</i>
39	Tabela 2.3	<i>P. vitatta</i>	<i>P. laurenti</i>
95	Tabela 3.1	<i>P. sp</i>	<i>P. gracilis</i> *
95	Tabela 3.1	<i>P. sp</i>	<i>P. laurenti</i> **
105	31	georáfico	geográfico

* com exceção para as localidades: São Gabriel da Cachoeira-AM, onde está correto *P. sp* e Cordisburgo-MG.

** somente para a localidade Cordisburgo-MG.

Em anexo também segue a Figura 2.2, com os nomes das espécies e as localidades, para facilitar o entendimento da Arvore Filogenética.

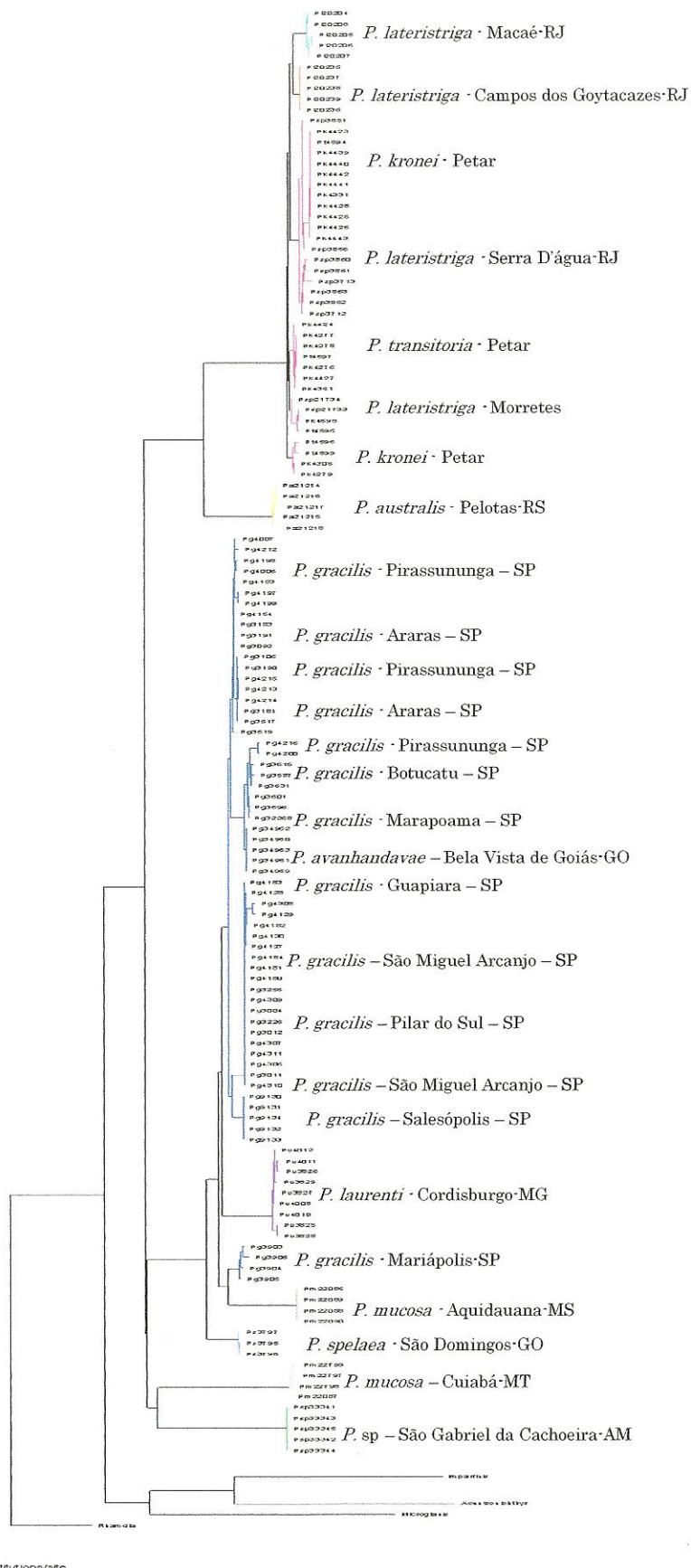


Figura 2.2: Árvore Filogenética construída a partir do sequenciamento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I.