



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRIELLE DE OLIVEIRA BEZERRA

**ESPECIAÇÃO INCIPIENTE DE MANDIS-CHORÕES
RELACIONADOS À *PIMELODELLA MEEKI*
(SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE), EVIDENCIADA
POR ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MOLECULARES**

Londrina
2024

ANDRIELLE DE OLIVEIRA BEZERRA

**ESPECIAÇÃO INCIPIENTE DE MANDIS-CHORÕES
RELACIONADOS À *PIMELODELLA MEEKI*
(SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE), EVIDENCIADA
POR ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MOLECULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Oscar Akio Shibatta.

Londrina
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

d278e de Oliveira Bezerra, Andrielle .
Especiação incipiente de mandis-chorões relacionados à *Pimelodella meeki* (Siluriformes, Heptapteridae), evidenciada por análises morfológicas e moleculares / Andrielle de Oliveira Bezerra. - Londrina, 2024.
62 f. : il.

Orientador: Oscar Akio Shibatta.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Delimitação de espécie - Tese. 2. *Pimelodella* com diferença Intraespecífica - Tese. 3. Técnica de DNA barcode - Tese. 4. Especiação incipiente - Tese. I. Akio Shibatta, Oscar . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 574

ANDRIELLE DE OLIVEIRA BEZERRA

**ESPECIAÇÃO INCIPIENTE DE MANDIS-CHORÕES
RELACIONADOS À *PIMELODELLA MEEKI*
(SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE), EVIDENCIADA
POR ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MOLECULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Oscar Akio Shibatta
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. José Luís Oliven Birindelli
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Veronica de Barros Slobodian Motta
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Fernando Camargo Jerep
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Lenice Souza Shibatta
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 21 de maio de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente o meu orientador Prof. Dr. Oscar Akio Shibatta, por ter aceito me orientar, pela confiança e paciência; sugestões, críticas e auxílio em todo o projeto.

A Prof. Dra. Lenice Souza Shibata também pela confiança e paciência; sugestões, críticas e auxílio em toda a análise molecular do projeto.

Deixo ainda aqui meu enorme respeito e admiração por esses dois profissionais que me orientaram.

Ao meu namorado João Vitor Xavier dos Anjos, além de companheiro de laboratório, também companheiro da vida, que me auxiliou em várias dúvidas e análises no projeto.

Aos meus pais por todo o apoio, Devanir José Bezerra, e Rosinei Fernandes de Oliveira.

E aos amigos que fiz no laboratório Ian Solon, Humberto Filho, Mariana Buaretto e Rafael Marques.

Ao Museu de Zoologia Uel (MZUEL) por disponibilizar o uso dos animais da coleção para a pesquisa.

Ao Laboratório de Ictiologia (LIC) por todo espaço, material e equipamentos disponibilizados, e também aos professores do LIC, Prof. Dr. José Luís Olivan Birindelli e Prof. Dr. Fernando Jerep.

Aos técnicos do LIC, Edson Santana da Silva e Aparecido de Souza por toda coleta que participei.

A Universidade Estadual de Londrina, junto ao Departamento de Biologia Vegetal e Animal e Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pela infraestrutura oferecida.

Aos professores, técnicos e servidores da instituição Universidade Estadual de Londrina que me auxiliaram diretamente ou indiretamente ao longo de toda a pós-graduação.

E a todos que contribuíram e contribuem para manter o acesso ao ensino público de qualidade no país, e o financiamento público de pesquisas científicas. À CAPES pelo auxílio financeiro (PROAP) que possibilitou a visita ao Museu Capão da Imbuia em Curitiba.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

BEZERRA, Andrielle de Oliveira. **Especiação incipiente de mandis-chorões relacionados à *Pimelodella meeki* (Siluriformes, Heptapteridae), evidenciada por análises morfológicas e moleculares.** 2024. 62. Dissertação – Mestrado em Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

RESUMO GERAL

O gênero *Pimelodella* faz parte da ordem Siluriformes um grupo constituído por peixes de água doce distribuídos globalmente, inclusive na Antártica, representando a segunda maior ordem de peixes em número de espécies descritas. Desprovidos de escamas, esses peixes podem apresentar corpos revestidos por placas ósseas ou uma pele espessa. Muitas espécies possuem três pares de barbilhões, e algumas desenvolvem raios nas nadadeiras dorsais e peitorais modificadas em acúleos pontiagudos. O gênero *Pimelodella*, pertencente à família Heptapteridae, é encontrado desde a Costa Rica até o rio da Prata na Argentina, com 77 espécies reconhecidas. Suas espécies são conhecidas pelo hábito alimentar onívoro e caracterizados pelos acúleos pungentes das nadadeiras peitoral e dorsal. Este gênero é marcado por lacunas de conhecimento que dificultam a compreensão da distribuição real das espécies pelas diferentes bacias hidrográficas, relacionadas à delimitação imprecisa de suas espécies, ampla distribuição geográfica, morfologia conservadora e descrições antigas e imprecisas, bem como à perda de material tipo. Espécimes de *Pimelodella* foram coletados nas cidades de Lapa-PR, São João do Triunfo-PR e São Mateus do Sul-PR na região da bacia do alto rio Iguaçu. A falta de registros anteriores na literatura da ocorrência desse gênero nessa bacia leva à necessidade de identificação desses espécimes. O presente estudo investigou os espécimes do alto rio Iguaçu por meio de técnicas tradicionais baseadas em morfologia externa e interna, e a técnica de *DNA barcode*, para comparação com populações de *Pimelodella meeki* das bacias dos rios Tibagi e Tietê, *P. kronei* do Ribeira de Iguape, *P. lateristriga* de Guaraqueçaba e *P. gracilis* do baixo Paraná e alto rio Paraguai. A técnica do DNA barcode se fundamenta na região do gene mitocondrial Citocromo C oxidase 1, aplicada para estudos de biodiversidade e taxonomia para a delimitação da espécie. Nossos resultados de delimitação de espécie revelaram similaridades da *Pimelodella* do Iguaçu com a espécie *Pimelodella meeki*, cuja localidade-tipo é a bacia do rio Tietê, e com ocorrência também na bacia do rio Tibagi, que é próxima ao local onde os exemplares do alto rio Iguaçu foram amostrados. No entanto, observou-se também uma profunda variação molecular intraespecífica entre as populações do Iguaçu e Tietê (1,4%) e Tibagi (1,8%), indicando a possibilidade de especiação incipiente, evidenciada também por diferenças morfológicas sutis na coloração e nos números de raios ramificados da nadadeira peitoral.

Palavras-chave: Delimitação; Intraespecífico; *DNA barcode*; Especiação.

BEZERRA, Andrielle de Oliveira. **Incipient speciation of mandis-chorões related to *Pimelodella meeki* (Siluriformes, Heptapteridae), evidenced by morphological and molecular analyses**. 2024. 62. Dissertation – Master's degree in Biological Sciences – State University of Londrina, Londrina, 2024.

GENERAL ABSTRACT

The genus *Pimelodella* is part of the order Siluriformes, a group of freshwater fish distributed globally, including in Antarctica, representing the second largest order of fishes in number of described species. Devoid of scales, these fishes may have bodies covered by bony plates or thick skin. Many species have three pairs of barbels, and some develop rays in the dorsal and pectoral fins modified into sharp spines. The genus *Pimelodella*, belonging to the family Heptapteridae, is found from Costa Rica to the Rio de la Plata in Argentina, with 77 recognized species. Its species are known for their omnivorous feeding habits and are characterized by the presence of the spines of the pectoral and dorsal fins. This genus is marked by knowledge gaps that hinder the understanding of the actual distribution of species across different river basins, related to the imprecise delimitation of its species, wide geographical distribution, conservative morphology, and old and imprecise descriptions, as well as the loss of type material. Specimens of *Pimelodella* were collected in the cities of Lapa-PR, São João do Triunfo-PR, and São Mateus do Sul-PR in the Upper Iguaçu River basin region. The lack of previous literature records of the occurrence of this genus in this basin leads to the need to identify these specimens. The present study investigated the specimens from the Upper Iguaçu River using traditional techniques based on external and internal morphology and the *DNA barcode technique* for comparison with populations of *Pimelodella meeki* from the Tibagi and Tietê river basins, *P. kronei* from the Ribeira de Iguape, *P. lateristriga* from Guaraqueçaba and *P. gracilis* from the lower Paraná and upper Paraguay River. The DNA Barcode Technique is based on the mitochondrial gene region Cytochrome C oxidase 1, applied for biodiversity and taxonomy studies for species delimitation. Our species delimitation results revealed similarities of *Pimelodella* from the Iguaçu River with *Pimelodella meeki*, whose type locality is the Tietê River basin, and with occurrences also in the Tibagi River basin, which is close to where specimens from the Upper Iguaçu River were sampled. However, there was also deep intraspecific molecular variation with the population of Iguaçu from Tietê (1.4%) and Tibagi (1.8%) populations, indicating the possibility of incipient speciation, also evidenced by subtle morphological differences in coloration and the number of branched rays of the pectoral fins.

Key-words: Delimitation; Intraspecific; *DNA barcode*; Speciation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplar de *Pimelodella* sp. coletada na bacia do alto rio Iguaçu na cidade de Lapa, PR (Foto: Oscar Akio Shibatta).

Figura 2 – Distribuição das espécies analisadas morfológicamente e molecularmente de *Pimelodella* da bacia do alto rio Paraná (rio Tibagi e rio Tietê), baixo rio Paraná, bacia do alto rio Iguaçu, bacia Litorânea, bacia do rio Ribeira de Iguape e bacia do rio Paraguai. Os espécimes correspondem às seguintes cores: verde, *P. gracilis*; marrom, *P. kronei*; amarelo, *P. lateristriga*; rosa, *P. meeki*; e vermelho, *Pimelodella* sp.

Figura 3 – Desenho esquemático da vista lateral de *Pimelodella* sp. e *Pimelodella meeki*. A letra A, *P. sp.*, bacia do alto rio Iguaçu; letra B e C *P. meeki*, bacia do alto rio Paraná (rio Tibagi) e bacia do alto rio Paraná (rio Tietê). Destacando o padrão de colorido e as principais manchas de coloração de cada população.

Figura 4 – Desenho esquemático da vista dorsal do espinho da nadadeira peitoral esquerda de *Pimelodella* sp. e *Pimelodella meeki*. A letra A, *P. meeki* da bacia do rio Tietê, comprimento total 12 mm, desenho retirado e adaptado da Tese Slobodian (2017) corresponde a figura 137 (pág. 638 tese). Letra B, *P. sp.*, bacia do alto rio Iguaçu comprimento total 10.2 mm, e Letra C, *P. meeki*, bacia do alto rio Paraná (rio Tibagi) comprimento total 10.9 mm.

Figura 5 – *Boxplot* da contagem vertebral dos espécimes de *Pimelodella* sp. da bacia do rio Iguaçu (n=37); *P. meeki* da bacia do rio Tibagi (n=9); *P. lateristriga* da bacia Litorânea (n=33); *P. kronei* da bacia do rio Ribeira de Iguape (n=2) e *P. gracilis* da bacia do rio Paraguai (n=5).

Figura 6 – Gráfico de dispersão (*Scatter Plot*) resultado da Análise dos Componentes Principais (PCA) com base nas 56 variáveis morfométricas. Em verde, *P. gracilis* da bacia do rio Paraguai; amarelo, *P. lateristriga* da bacia Litorânea; marrom, *P. kronei* da bacia do rio Ribeira de Iguape; rosa *Pimelodella* sp., da bacia do alto rio Iguaçu e; roxo, *P. meeki* da bacia do rio Tibagi.

Figura 7 – Árvore filogenética bayesiana com base na sequência do gene COI (*DNA Barcode*) e numa análise de Máxima Verossimilhança. À direita da figura, os resultados das análises de delimitação de espécies através do GMYC, mPTP e ABGD, e da Distância Genética (DG).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações sobre número de tombo, localidade, coordenada geográfica e número de espécimes dos exemplares de *Pimelodella* analisados do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina, totalizando 102 espécimes.

Tabela 2 – Informações sobre as sequências utilizadas nas análises, incluindo dados sobre os vouchers e número de acesso no *GenBank*.

Tabela 3 – Variáveis merísticas dos espécimes de *Pimelodella* sp., da bacia do alto rio Iguaçu (MZUEL), e *P. meeki* da bacia do alto rio Paraná (rio Tibagi) (MZUEL) e da localidade-tipo bacia do rio Tietê.

Tabela 4 – Dados morfométricos analisados, discriminados pelo nome original da espécie e localidade de *Pimelodella* sp., da bacia do alto rio Iguaçu e *P. meeki* da bacia do alto rio Paraná, rio Tibagi.

Tabela 5 – Dados morfométricos analisados, discriminados pelo nome original da espécie e localidade, de *P. lateristriga* da bacia Litorânea, *P. kronei* da bacia do rio Ribeira de Iguape e *P. gracilis* da bacia do rio Paraguai.

Tabela 6 – Distância genética entre os grupos de *Pimelodella* utilizando o marcador COI e o modelo K2P realizado no programa MEGA v.6. Os números em negrito na diagonal representam a distância intra-amostra, os números abaixo da linha diagonal em vermelho as distâncias entre as amostras, e os números acima da linha diagonal em azul, o erro padrão.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABGD	<i>Automatic Barcode Gap Discovery</i>
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CC	Comprimento da Cabeça
COI	Citocromo C Oxidase
CP	Comprimento Padrão
DG	Distância Genética
GMYC	<i>Generalized Mixed Yule Coalescent</i>
MOTUs	Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares
MZUEL	Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina
PCA	Análise dos Componentes Principais
PR	Paraná (estado brasileiro)
PTP	<i>Poisson Tree Processes</i>
SC	Santa Catarina (estado brasileiro)
SP	São Paulo (estado brasileiro)
UEL	Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
Uso da análise morfológica e morfométrica (PCA).....	3
Uso da análise molecular na delimitação de espécies.....	5
A bacia do alto rio Iguaçu e o compartilhamento da ictiofauna com as bacias do alto rio Paraná e costeiras.....	7
Objetivo gerais e abordagem da dissertação.....	10
REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO ÚNICO	17
Resumo.....	17
INTRODUÇÃO	18
MATERIAL E MÉTODOS	20
Morfometria e merística.....	22
Identificação das espécies.....	22
Análise osteológica.....	22
Análise dos componentes principais (PCA).....	23
Análise molecular.....	23
Análises de distância genética e análises filogenéticas.....	25
Análises de delimitação de espécies.....	26
RESULTADOS	26
Morfologia.....	26
Análise das variáveis merísticas e contagem vertebral.....	28
Análise das variáveis morfométricas.....	30
Análise dos componentes principais (PCA).....	38
Distância genética.....	38
ABGD, mPTP e GMYC.....	39
Relógio molecular.....	41
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÃO GERAL	44
REFERÊNCIAS	45

APRESENTAÇÃO

Neste trabalho de dissertação para a obtenção de título de Mestre, o formato usado para a redação atende às normas das “Regras Básicas para Apresentação Formal de Trabalhos”, editada pela Biblioteca Central da UEL.

<https://www.uel.br/bc/portal/arquivos/apostila-normalizacao.pdf>

INTRODUÇÃO GERAL

Da ordem Siluriformes ao gênero *Pimelodella*. Os Siluriformes são a ordem de peixes conhecidos popularmente como bagres e cascudos no Brasil, ou *catfishes* em inglês. São a sexta maior ordem entre os vertebrados vivos, e seus representantes geralmente são de água doce, que colonizaram tanto os habitats aquáticos subterrâneos como os superficiais (Lundberg, 1975). Além disso, é considerada a segunda maior ordem em espécies descritas de peixes (Ferraris, 2007; Sullivan *et al.*, 2013a).

Os Siluriformes são teleósteos que compõe a superordem Ostariophysi (Rodrigues, 2010), fazendo parte do clado Otophysi, grupos de peixes ósseos que possuem o aparelho de Weber, um complexo de ossículos que ligam a bexiga natatória à orelha interna (Burgess, 1989; Fink & Fink, 1996, Chen *et al.*, 2013). A análise de filogenia feita por Fink & Fink (1996), com base na morfologia interna e externa, propõe que Cypriniformes seja grupo-irmão dos demais membros de Otophysi, e os Characiformes como grupo-irmão de Siluriformes mais Gymnotiformes.

Os Siluriformes são encontrados em todos os continentes, incluindo registros fósseis do gênero *Hypsidoris* na Antártica (Ferraris, 2007). Até 2013, eram registradas 14 famílias nas bacias hidrográficas da América do Sul (Moyle & Cech, 2000; Cramer *et al.*, 2007; Sullivan *et al.*, 2013a).

Em relação à morfologia dos Siluriformes, eles possuem corpo nu, sem escamas, mas podem ser revestidos por placas ósseas ou por pele espessa, além de terem uma grande variedade de formas, cores e tamanhos. Entre as espécies dessa ordem é comum a existência de três pares de barbilhões, e o primeiro raio da nadadeira peitoral e o segundo da nadadeira dorsal transformado em acúleo pungente, com algumas exceções; na maioria, a nadadeira adiposa encontra-se presente e geralmente é alongada (Britski *et al.*, 2007).

Dentre as famílias de Siluriformes, Heptapteridae é atualmente composta por 22 gêneros e 237 espécies válidas (Fricke *et al.*, 2024). A família Heptapteridae é endêmica da região Neotropical, mas é encontrada desde o México até o sul da Argentina; os tamanhos variam de pequenos a médio porte (Bockmann & Guazzelli, 2003) chegando até 50 cm de comprimento (Gomes *et al.*, 2000).

Os Heptapteridae possuem hábito noturno ou crepuscular (Severo-Neto *et al.*,

2023), mas algumas espécies costumam ser ativas durante o dia quando as águas ficam turvas, e preferem se abrigar entre a vegetação, rochas ou locas (Britski *et al.*, 2007). Alguns gêneros de Heptapteridae são exclusivos de fundo, mas os espécimes do gênero *Pimelodella* fazem incursões frequentes na coluna da água e tendem a se organizar em pequenos grupos (Bockmann, 1998; Peixoto, 2011).

O gênero *Pimelodella* possui 77 espécies válidas (Fricke *et al.*, 2024), que habitam rios e córregos menores (Peixoto, 2011) com distribuição desde a Costa Rica até a bacia do rio da Prata (Bussing, 2002; Slobodian, 2017). Este gênero possui morfologia conservadora, com espécies de distribuição provavelmente ampla, porém pouco estudados (Slobodian, 2017). É facilmente encontrado em riachos com vegetação abundante, e é popularmente chamado de “mandi-chorão”, devido ao som emitido por sua nadadeira peitoral, quando se sente acuado. De hábito onívoro, possui as nadadeiras peitoral e dorsal com acúleo pungente, o que pode provocar ferimentos dolorosos aos seus predadores (Peixoto, 2011).

O gênero possui o seguinte conjunto de características: corpo modestamente alongado, variando de 12–30 cm de comprimento padrão; processo supraoccipital alongado, atingindo a placa nugal anterior; fontanelas anterior e posterior abertas, longas, separadas por barra epifisiana; limites do olho bem definidos pelo rebordo orbitário livre, especialmente pronunciado anterior e dorsalmente; nadadeira peitoral com espinho forte e pungente com serras anteriores e posteriores e 7-9 (geralmente 8) raios ramificados; geralmente 6 raios branquiostegais; nadadeira caudal profundamente bifurcada; raios medianos da nadadeira caudal não articulados à placa hipural; hipural 5 como uma estrutura única e não fundido à placa hipural; corpo geralmente com faixa mediolateral escura estendendo-se do focinho ou posterior à cabeça até a inserção ou sobre os raios medianos da nadadeira caudal (Slobodian, 2017).

As bacias hidrográficas do estado do Paraná onde ocorrem espécies de *Pimelodella* são: o rio Paraná (com *P. gracilis*), rios costeiros (*P. lateristriga*), Ribeira do Iguape (*P. kronei*, *P. lateristriga*), alto rio Paraná (*P. meeki*, *P. boschmai*, *P. gracilis*, e *P. avanhandavae*) (Langeani *et al.*, 2007; Slobodian, 2017; Dagosta *et al.*, 2024). Para a bacia do rio Iguaçu, não havia registro de ocorrência de espécies de *Pimelodella* na literatura. Porém, na cidade de Lapa-PR, São Mateus do Sul-PR e São João do Triunfo-PR (na região da bacia do alto rio Iguaçu) foram coletados espécimes desse gênero (Figura 1) que necessitam de investigações.

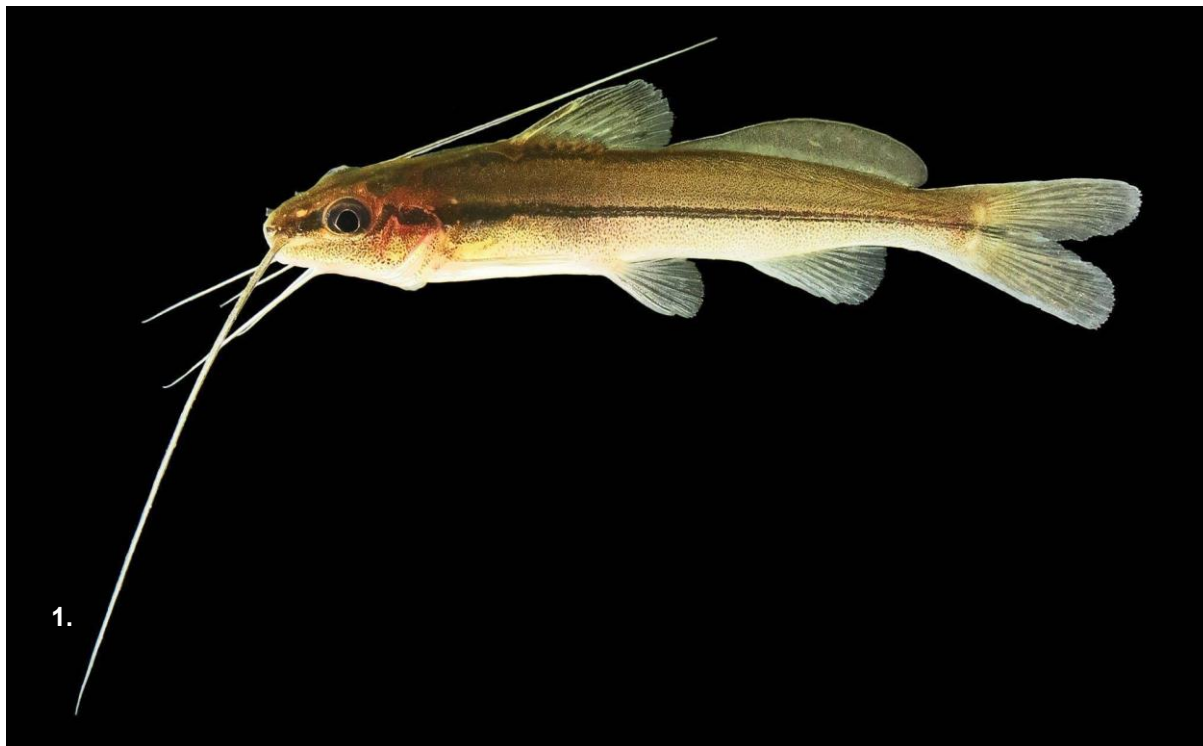


Figura 1. Exemplar de *Pimelodella* sp. coletada na bacia do alto rio Iguaçu na cidade de Lapa, PR (Foto: Oscar Akio Shibatta).

Além do uso de técnicas tradicionais baseadas em morfologia externa para a identificação de espécies (Garavello & Britski, 1987), o uso da técnica do *DNA barcoding* vem sendo aplicada para estudos de biodiversidade, identificação de espécies crípticas e taxonomia (Souza-Shibatta *et al.*, 2018). Essa técnica usa uma região do gene mitocondrial Citocromo C oxidase 1, denominada *barcode*, para a delimitação das espécies (Hebert *et al.*, 2003).

Uso da análise morfológica e morfométrica (PCA). Ainda hoje, os métodos de identificação, nomeação e classificação de peixes, são amplamente baseados na morfologia externa. Embora os trabalhos taxonômicos modernos empreguem regularmente outras características, incluindo anatomia interna, fisiologia, comportamento, genes, isoenzimas e geografia, caracteres morfológicos ainda continuam sendo a pedra angular dos tratamentos taxonômicos (Ward *et al.*, 2009).

A identificação das espécies de *Pimelodella*, baseia se, principalmente, em caracteres morfológicos externos, tais como a cor e outras marcas da coloração como faixas castanho escuras ao longo do corpo e manchas próximas à cabeça, comprimento do barbilhão maxilar, formato da nadadeira peitoral e formato dos espinhos da peitoral, comprimento das nadadeiras comparados ao comprimento

padrão, e o processo occipital delgado que se conecta à placa nugal (Bockmann, 1998).

Todavia, variações morfológicas intra-específicas podem ser observadas em peixes, que podem representar a variação total de uma determinada característica ecológica (ou conjunto de características) expressa por indivíduos de uma mesma espécie (Albert *et al.*, 2011). Slobodian (2017), encontrou significativa plasticidade para alguns caracteres de *P. meeki*, e observou variações na quantidade de raios da peitoral, raios da anal, total de vértebras, e raios articulados à placa dorsal da nadadeira caudal. Desta forma, é preciso considerar esses aspectos nos estudos morfológicos de *P. meeki*.

Os métodos morfométricos também podem ser usados para detectar diferenças sutis entre as populações. A morfometria multivariada é útil na detecção de diferenças e no estudo das variações de caracteres quantitativos (Cavalcanti & Lopes, 1993). A Análise de Componentes Principais (PCA) é utilizada para facilitar a ordenação de dados morfométricos e a detecção e interpretação de parâmetros biológicos (Blackith & Reyment, 1971; Reis, 1988). Essa análise sumariza os dados e permite encontrar possíveis padrões morfométricos entre as populações de uma mesma espécie.

As medidas morfométricas tomadas de cada indivíduo podem ser usadas na PCA após serem convertidas em uma matriz de covariâncias, para verificar se há variação morfológica entre populações. A maior parte da variação morfológica entre indivíduos está associada ao tamanho corporal devido a relações alométricas (Peres-Neto, 1995).

O PCA pode ser usado como um método de classificação não supervisionado (Swarbrick, 2012), para testar se a delimitação *a priori* é explicada por um conjunto de dados (James & McCulloch, 1990). Se grupos distintos (clusters) recuperados estiverem de acordo com o conhecimento prévio de discriminação, pode-se concluir que as propriedades das medidas são capazes de classificar as amostras (Swarbrick, 2012) (por exemplo, se dados morfométricos para duas espécies analisadas em PCA resultarem em clusters distintos na parcela, os dados morfométricos utilizados são suficientes para discriminá-las adequadamente).

O número de componentes principais se torna o número de variáveis consideradas na análise, mas geralmente os primeiros componentes são os mais importantes, já que explicam a maior parte da variação total. Existe um autovalor para

cada componente, e a magnitude do autovalor é uma indicação direta da importância do componente na explicação da variação total dentro do conjunto de dados (Varela, 2008). Ou seja, o autovalor explica a importância do componente sobre a variação total dos dados. Sendo assim, quando existe uma discrepância muito acentuada entre as variâncias, os demais componentes principais acabam sendo de pouca utilidade, uma vez que cada componente tende a ser dominado por uma variável (Varela, 2008).

Uso da análise molecular na delimitação de espécies. Apesar da maior parte dos trabalhos de identificação de peixes basear-se apenas na morfologia, o emprego da análise molecular é agora considerada uma ferramenta fundamental para a delimitação segura das espécies. Mas, não devem substituir a taxonomia e a sistemática tradicionais (Larson *et al.*, 2016).

A análise molecular tem como objetivo auxiliar a taxonomia, para aumentar a eficácia da delimitação das espécies. Um fragmento denominado *DNA Barcode*, do gene mitocondrial subunidade I do *citocromo c oxidase* (COI) de, aproximadamente, 640 pares de bases, se revelou particularmente promissor para a identificação de espécies (Ward *et al.*, 2009). Dessa forma, o *DNA Barcode* refere-se a uma sequência gênica pequena com uma posição padrão no genoma, com variação nucleotídica dentro da espécie, em comparação com a variação entre as espécies (Ward *et al.*, 2009).

Esta região já vem sendo utilizada para investigar diversos grupos de animais vertebrados e invertebrados, incluindo os peixes (Ward *et al.*, 2005; Waugh, 2007; Lakra *et al.*, 2011, Pereira *et al.*, 2011; Benzaquem *et al.*, 2015; Carvalho *et al.*, 2015; Ramirez *et al.*, 2017; Ribolli *et al.*, 2017). Para peixes neotropicais de água doce, um limite de 2% foi proposto para delimitar as espécies, e mostrou-se útil para 80% das comparações interespecíficas (Pereira *et al.*, 2013).

Porém, esse limite fixo deve ser cuidadosamente analisado para a identificação das espécies, pois o uso de 2% de divergência como valor de corte pode esconder a verdadeira diversidade do grupo (Pereira *et al.*, 2013). Além disso, esse valor de divergência genética do *DNAmt* como único critério para delimitação de espécies recebe críticas (Hausdorf *et al.*, 2011), porque há casos, em que as espécies estreitamente relacionadas, podem ter divergências “recentes” para serem claramente separadas (Toffoli *et al.*, 2008; Steinke *et al.*, 2009; Serra-Pereira *et al.*, 2010). Deste modo, valores entre 1% e 3%, em estudos de peixes neotropicais, também podem ser

considerados (Lara *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2011, 2013). Entretanto, métodos para delimitação de espécie usando apenas regra de corte porcentual têm uma fraca relação com as teorias de evolução e variação genética (Barracough *et al.*, 2009; Kapli *et al.*, 2017).

Atualmente, existem análises disponíveis que incorporam princípios das teorias evolutivas, tais como o *General Mixed Yule Coalescent* (GMYC) (Fujisawa & Barracough, 2013), o *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) (Puillandre *et al.*, 2012), e o *multi rate Poisson Tree Processes* (mPTP) (ZHANG *et al.*, 2013)

O método *Generalized Mixed Yule Coalescent* (GMYC), é um modelo de delimitação de espécie proposto por Fujisawa & Barracough (2013). O GMYC identifica os pontos de transição entre as taxas de ramificação inter e intra-específicas, em uma árvore ultramétrica calibrada no tempo, maximizando a pontuação de probabilidade do modelo (Zhang *et al.*, 2013). Ele assume que todas as linhagens principais da raiz, nos pontos de transição, são espécies diferentes (Zhang *et al.*, 2013).

Esse modelo estima os limites entre espécies a partir de sequências de DNA, identificando em uma árvore filogenética os padrões dos ramos como uma transição entre fenômenos de coalescência, e de especiação de linhagens que tem evoluído independentemente, examinando os maiores valores de verossimilhança em cada transição.

A desvantagem do GMYC é que ele depende da precisão da árvore ultramétrica. A obtenção de uma árvore ultramétrica a partir de um dado de filogenia é um processo intensivo de computação e potencialmente propenso a erros. O método GMYC que utiliza o programa *BEAST* (Drummond & Rambaut, 2007) conta com amostragem bayesiana para calibração de árvore baseada em probabilidade mais avançada.

O mPTP, assim como o GMYC, requerem uma estimativa da árvore genética, mas com comprimentos de ramificação proporcionais à quantidade de mudança genética e não ao tempo. O mPTP tende a superar o GMYC quando as distâncias interespecíficas são pequenas (Zhang *et al.*, 2013), embora os dois métodos geralmente produzam estimativas de limites de espécies (Zhang *et al.*, 2013).

Os métodos mPTP e GMYC são fundamentados em árvores e utilizam uma estrutura coalescente para identificar linhagens evolutivas independentes, buscando distinguir potenciais espécies sem fluxo gênico. Para realizar a análise mPTP, foi

empregado o *Poisson Tree Processes* (PTP), o qual modela a especiação através do número de substituições nucleotídicas, permitindo inferir limites de espécies potenciais em uma árvore filogenética específica (Zhang *et al.*, 2013). Esse método parte da premissa de que o número de substituições nucleotídicas entre espécies é consideravelmente maior do que dentro das espécies. O mPTP incorpora a divergência potencial na diversidade intraespecífica ao PTP e implementa um método eficiente para calcular a delimitação de máxima verossimilhança a partir de uma árvore filogenética inferida (Kapli *et al.*, 2017).

O método ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*), detecta o intervalo do código de barras, como o primeiro intervalo significativo além desse limite, e o utiliza para particionar os dados. A inferência do limite e a detecção de lacunas são aplicadas recursivamente a grupos obtidos anteriormente para obter partições mais finas até que não haja mais particionamento (Puillandre *et al.*, 2012).

A bacia do alto rio Iguaçu e o compartilhamento da ictiofauna com as bacias do alto rio Paraná e costeiras. A bacia hidrográfica do rio Iguaçu, no Brasil, abrange os estados do Paraná e Santa Catarina. O rio Iguaçu é o maior rio do estado do Paraná, sua formação se dá pela junção dos rios Atuba e Iraí (Baumgartner, 2012), e possui extensão territorial de 1.060 km, percorrendo no sentido leste-oeste, desde suas nascentes na vertente ocidental da Serra do Mar, até a foz, no rio Paraná (Paiva, 1982).

A formação da bacia do rio Iguaçu, remonta do final da era Mesozóica e o início da era Cenozóica (período Cretáceo e Terciário). Xavier *et al.* (1996) constatou que a diferença hipsométrica entre as porções norte e sul da Serra do Mar, principalmente próxima ao paralelo 20°S, seria devido a diferenças tectônicas herdadas do Pré-Cambriano/Eopaleozóico que condicionaram soerguimentos diferenciais. Destes movimentos escalonados do soerguimento da Serra do Mar (Hauck, 2009), se originou três planaltos paranaenses: 1º região de Curitiba; 2º região de Ponta Grossa, e 3º região de Guarapuava (Maack, 2001). A partir dessas características geomorfológicas, o rio Iguaçu foi também subdividido em três regiões, o Alto Iguaçu, região do 1º planalto, o Médio Iguaçu, região do 2º planalto, e o Baixo Iguaçu, região do 3º planalto.

A região do alto rio Iguaçu não possui definição formal de seus limites, sendo

aceito que compreenda o trecho desde suas nascentes, em Curitiba (PR), até o início de suas corredeiras no município de Porto Amazonas (PR). O alto rio Iguaçu e seus formadores dissecam a bacia formando depósitos fluviais recentes com planícies de larguras variadas, constituindo o domínio geomorfológico das planícies de inundação, atualmente sujeitas a todo tipo de ação antrópica (Salamuni *et al.*, 2004).

A bacia Sedimentar de Curitiba é drenada pelo alto rio Iguaçu e seus tributários de primeira, segunda e terceira ordens (*sensu* Strahler, 1952), havendo ainda a influência, na sua porção norte, de algumas drenagens pertencentes à bacia hidrográfica do rio Ribeira de Iguape (Salamuni *et al.*, 2004) e alto rio Paraná. Essa influência remonta da origem de movimentos entre as placas (reativação de fendas antigas), e foi o principal motivo do surgimento de várias bacias tafrogênicas (bacias originada pelo rebaixamento de blocos fendidos) como a do “Sistema *Rift* da Serra do Mar”, que inclui Taubaté, bacias de São Paulo, Resende, Volta Redonda, Curitiba, Sete Barras e Depressão Guanabara (Almeida, 1976; Almeida & Carneiro, 1998).

A evolução das bacias tafrogênicas é de crucial importância para o sistema hidrográfico estabelecido entre o final do Cretáceo ao Terciário. Uma vez desenvolvidas, essas bacias foram responsáveis pela captação de cabeceiras entre sistemas hidrográficos de terras altas adjacentes (Ribeiro, 2006). Diante disso, os eventos vicariantes mais recentes de compartilhamento de espécies da bacia do alto rio Iguaçu com os rios do escudo cristalino das terras altas, alto rio Tietê, e as drenagens costeiras adjacentes, levam ao reconhecimento de espécies compartilhadas entre essas bacias e, em alguns casos, de zonas verdadeiramente híbridas (Ribeiro, 2006). Por exemplo, as espécies de *Mimagoniates* são diversificadas (seis espécies) e espalhadas ao longo das drenagens costeiras, mas seu grupo-irmão, o gênero *Glandulocauda* (duas espécies), é endêmica do escudo cristalino do sudeste do Brasil, do alto rio Tietê e alto rio Iguaçu (Weitzman *et al.*, 1988; Weitzman & Menezes, 1998).

Outras espécies da ictiofauna do alto rio Iguaçu também são relatados nas bacias vizinhas, Ribeira de Iguape e Paranapanema, como *Trichomycterus davisii* (Siluriformes: *Trichomycteridae*) (Ingenito, 2004; Nascimento *et al.*, 2017), *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: *Loricariidae*) (Oyakawa, 2005) e *Rhamdiopsis moreirai* (Siluriformes: *Heptapteridae*) (Bizerril & Lima, 2000). Esse fenômeno de compartilhamento de espécies entre alto rio Iguaçu com as bacias do Ribeira e do alto rio Paraná, sugere, junto com registros fósseis de alguns táxons endêmicos das

drenagens costeiras, que a região do alto rio Paraná sofreu uma entrada posterior da ictiofauna, outrora encontrada apenas em rios costeiros onde eles eram endêmicos antes desses eventos cladogenéticos (Ribeiro, 2006).

Outros representantes típicos da ictiofauna das drenagens costeiras recentemente registradas na bacia do alto rio Iguaçu, são *Hyphessobrycon griemi*, *H. bifasciatus*, e *H. reticulatus* (Ingenito *et al.*, 2004). Esse compartilhamento de espécies decorre provavelmente da captura de riachos, que podem agir de duas formas em áreas tectonicamente ativas (Saadi *et al.*, 2002): a primeira, é um efeito direto do movimento tectônico, quando os cursos de água sofrem um desvio abrupto. E a segunda ocorre por erosão, no qual a drenagem em novo nível de base faz com que córregos rebaixados, com declividade mais acentuada e, conseqüentemente, mais energia, estendam sua cabeceira de vale devido à erosão, eventualmente capturando parte ou toda a drenagem de riachos adjacentes mais lentos (Tarbuck & Lutgens, 2002).

Segundo Ribeiro (2006), essa fauna de peixes compartilhados, das drenagens costeiras com as terras altas (rios Ribeira de Iguape, Iguaçu e Paranapanema, e a porção superior do rio Tietê) deriva provavelmente de eventos geológicos, sendo o de maior destaque o que originou o Arco de Ponta Grossa. O Arco de Ponta Grossa, foi o soerguimento do embasamento cristalino ao longo da porção sudeste da bacia do Paraná (Petri & Fulfaro, 1983) e exibiu um sistema de falhas profundas e fraturas no qual derivou um intenso fluxo de magma no Cretáceo, sobre a bacia do Paraná, conhecido como Formação Serra Geral, que deixou um grande sistema de diques de magma intrusivo. Essa intensa atividade tectônica durante a era Cenozóica, no Arco de Ponta Grossa pode ter resultado um dinamismo fluvial particularmente acelerado entre os sistemas de drenagem adjacentes, facilitando o intercâmbio faunístico entre eles. Os movimentos que ocorreram entre as falhas geológicas e conseqüentemente a erosão dos rios ao longo dos *riftes*, provavelmente fez com que nas drenagens adjacentes ocorressem as trocas faunísticas entre a bacia costeira, Ribeira de Iguape e as terras altas dos rios Iguaçu e Paranapanema (Ribeiro, 2006). E os mesmos mecanismos tectônicos provavelmente permitiram intercâmbios entre os rios costeiros brasileiros com drenagens vizinhas, e com as bacias localizadas no interior do continente no escudo cristalino. A atividade geológica desse período, ficou conhecida como *Rift Continental do Sudeste do Brasil (Continental Rift of Southeastern Brazil - CRSB)* e, segundo Bizerril (1994), explicaria porque a bacia do Paraná contribuiu mais

(em termos de estoques ancestrais) para o desenvolvimento da ictiofauna das drenagens costeiras.

Costa (2001) já havia proposto que as cabeceiras de rios fossem os locais de trocas faunísticas e não apenas o estoque de espécies correspondente à sua bacia. Porém, os argumentos apresentados por Ribeiro (2006), vão contra as teorias que propõem que a diversificação da ictiofauna das drenagens costeiras da América do Sul esteve exclusivamente relacionada às mudanças do nível do mar durante o Pleistoceno Superior (Weitzman *et al.*, 1988). Nesse período, o nível do mar estaria 100 metros abaixo do nível atual, e a ictiofauna conseguiu se espalhar mais. Quando o nível do mar subiu novamente, as bacias hidrográficas se isolaram, ocorrendo o processo de especiação. Essa teoria, segundo Ribeiro (2006), não explica o fato das espécies de rios costeiros, supostamente originados no final do Pleistoceno, ocorrerem secundariamente em rios de altitude, como o alto Tietê e o Iguaçu.

Apenas durante o *Rift* Continental do Sudeste do Brasil, é que se foi possível ter trocas de espécies típicas de rios costeiros encontrados na porção superior das bacias do Tietê e do Iguaçu, para o planalto, e isso só ocorreria novamente em outro evento geológico significativo. Já o contrário tende a continuar, o recuo erosivo da margem leste do sudeste do Brasil pode introduzir estoques ancestrais de rios de altitude em drenagens costeiras (Ribeiro, 2006).

A ictiofauna presente nas bacias hidrográficas do alto rio Iguaçu, dos rios costeiros e do alto rio Paraná, provavelmente se diversificaram antes das mudanças do nível do mar do Pleistoceno Superior (final da era Cenozóica) (Ribeiro, 2006). Ao todo duraram desde o final do Cretáceo até o início do Quaternário. As mudanças no nível do mar do Pleistoceno Superior, explicam a distribuição da ictiofauna ao longo das drenagens costeiras, mas falham em explicar a ocorrência em bacias de terras altas de algumas espécies que surgiram de um ancestral comum que era endêmico dos rios costeiros das terras baixas (Ribeiro, 2006).

Objetivo gerais e abordagem da dissertação. O objetivo geral desta dissertação foi identificar a espécie de *Pimelodella* sp. da região do alto rio Iguaçu, coletada nos municípios de Lapa-PR, São Mateus do Sul-PR e São João do Triunfo-PR, por meio de dados morfológicos, anatômicos e moleculares.

Os objetivos específicos são: investigar a relação filogenética dessa espécie com as congêneres de distribuição geográfica mais próxima, e a provável data de

isolamento dessas espécies. Baseado em um exame morfológico prévio, a principal hipótese é que seja *Pimelodella meeki*, que está distribuída nos rios da bacia do alto rio Paraná, é a espécie mais próxima .

REFERÊNCIAS

- ALBERT, C. H., GRASSEIN, F., SCHURR F. M., VIEILLEDENT, G., & VIOLLE, C. (2011). *When and how should intraspecific variability be considered in traitbased plant ecology?*. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 13(3), 217–225. DOI: 10.1016/j.ppees.2011.04.003.
- ALMEIDA, F. F. M. & CARNEIRO, D. R. (1998). *Origem e evolução da Serra do Mar*. Revista Brasileira de Geociências, 28(2): 135–150.
- ALMEIDA, F. F. M. (1976). *The system of continental rifts bordering the Santos Basin, Brazil*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 48 (supplement): 15–26.
- BARRACLOUGH, T. G., HUGHES, M., ASHFORD-HODGES, N., FUJISAWA, T. (2009). *Inferring evolutionarily significant units of bacterial diversity from broad environmental surveys of single-locus data*. Biol. Lett. 5, 425–428. doi:10.1098/rsbl.2009.0091.
- BAUMGARTNER, G. (2012). *Peixes do baixo rio Iguaçu*. Maringá: Eduem, 2012. Disponível em: < <http://books.scielo.org/id/sn23w/pdf/baumgartner-9788576285861.pdf> >. Acesso em: 2023.
- BENZAQUEM, D. C., OLIVEIRA, C., da SILVA BATISTA, J., ZUANON, J., & PORTO, J. I. R. (2015). *DNA barcoding in pencilfishes (Lebiasinidae: Nannostomus) reveals cryptic diversity across the Brazilian Amazon*. PloS one, 10(2), e0112217.
- BIZERRIL, C. R. S. F. & N. R. W. LIMA. (2000). *Levantamento da ictiofauna da bacia do rio Ribeira de Iguape, Brasil*. Acta Biologica Leopoldensia, 22(1): 103–110.
- BIZERRIL, C. R. S. F. (1994). *Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste brasileiro*. Acta Biologica Leopoldensia, 16(1): 51–80.
- BLACKITH, R. E., & REYMENT, R. A. (1971). *Multivariate morphometrics*. London, New York: Academic Press.
- BOCKMANN, F. A. & GUAZZELLI, G. M. (2003). *Family Heptapteridae*. (pp. 406-431). In: Reis, R. E., Kullander, S. O. & Ferraris, C. J.. Jr. (eds). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs. Porto Alegre. 729 p.
- BOCKMANN, Flávio Alicino. (1998). *Análise filogenética da família heptapteridae (Teleostei, Ostariophysi, Siluriformes) e redefinição de seus gêneros*. 1998. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo. Acesso em: 20 jul. 2023.
- BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. (2007). *Peixes do Pantanal: manual de identificação*. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica.

BURGESS, W. E. (1989). *An Atlas of Freshwater and Marine Catfishes: a preliminary survey of the Siluriformes*. T.F.H. Publications, Neptune City. 784 pp.

BUSSING, W. A. (2002). *Peces de las aguas continentales de Costa Rica*. San José, Editorial de la Universidad de Costa Rica. 468p.

CARVALHO, D. C., PALHARES, R. M., DRUMMOND, M. G., & FRIGO, T. B. (2015). *DNA Barcoding identification of commercialized seafood in South Brazil: A governmental regulatory forensic program*. *Food Control*, 50, 784-788.

CAVALCANTI, M. J & LOPES, P. R. D. (1993). *Análise morfométrica multivariada de cinco espécies de Serranidae (Teleostei, Perciformes)*. *Acta biológica leopoldensia*, v. 15, n. 1, p. 53-64.

CHEN, W. J., LAVOUÉ, S., & MAYDEN, R. L. (2013). *Evolutionary origin and early biogeography of otophysan fishes (Ostariophysi: Teleostei)*. *Evolution*, 67(8), 2218-2239.

COSTA, W. J. E. M. (2001). *O gênero de peixes neotropicais anuais Cynolebias (Cyprinodontiformes: Rivulidae): relações filogenéticas, revisão taxonômica e biogeografia*. *Exploração Ictiológica de Águas Doces*, 12(4): 333-383.

CRAMER, C. A. LIEDKE, A. M., BONATTO, S. L., & REIS, R. E. (2007). *The phylogenetic relationships of the Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae) as inferred from mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences*. *Bulletin of fish Biology*, v. 9, p. 51-59, 2007.

DAGOSTA, F. C. P., MONÇÃO, M. S., NAGAMATSU, B. A., PAVANELLI, C. S., CARVALHO, F. R., LIMA, F. C., ... & PINNA, M. D. (2024). *Fishes of the upper rio Paraná basin: diversity, biogeography and conservation*. *Neotropical Ichthyology*, 22, e230066.

DRUMMOND, A. J., & RAMBAUT, A. (2007). *BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees*. *BMC evolutionary biology*, 7(1), 1-8.

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

FINK, S. V.; FINK, W. L. (1996). *Interrelationships of ostariophysan fishes (Teleostei)*, p. 209–249. *Interrelationships of Fishes*. Academic Press, San Diego, 1996.

FRICKE, R., Eschmeyer, W. N. & R. van der Laan (eds) 2024. *Eschmeyer Catalog of Fishes: Genera, Species, References (CAS - Eschmeyer Catalog of Fishes:)*. Electronic version accessed 02 03 2024.

FUJISAWA, T., & BARRACLOUGH, T. G. (2013). *Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed yule coalescent approach: A revised method and evaluation on simulated data sets*. *Syst. Biol.* 62, 707–724. doi:10.1093/sysbio/syt033.

GARAVELLO, J. C., & BRITSKI, H. A. (1987). *Duas novas espécies do gênero Leporinus Spix, 1829, da bacia do alto Paraná (Teleostei, Anostomidae)*. Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, 44, 153-165.

GOMES, L. D. C., GOLOMBIESKI, J. I., GOMES, A. R. C., & BALDISSEROTTO, B. (2000). *Biologia do jundiá Rhamdia quelen (TELEOSTEI, PIMELODIDAE)*. Ciência Rural, 30, 179-185.

HAUCK, P. (2009). *Origens e evolução da Serra do Mar*. Publicado em: 2 de jun. 2009. Acesso em: 07 de jul. 2023.

HAUSDORF, B., WILKENS, H., STRECKER, U. (2011). *Population genetic patterns revealed by microsatellite data challenge the mitochondrial DNA based taxonomy of Astyanax in Mexico (Characidae, Teleostei)*, *Molecular Phylogenetics and Evolution*. n. 60, 89-97.

HEBERT, P. D., CYWINSKA A., BALL S.L., de WAARD J.R. (2003). *Biological identifications through DNA barcodes*. Proc. Biol. Sci. 270: 313–321.

INGENITO, L. F. S., DUBOC, L. F., ABILHOA, V. (2004). *Contribuição ao conhecimento da ictiofauna da bacia do alto rio Iguaçu, Paraná, Brasil*. Arq. ciên. vet. UNIPAR, 7(1):p.23-36, 2004.

JAMES, F. C. & C. E. MCCULLOCH. (1990). *Multivariate analysis in ecology and systematics: panacea or Pandora's box?*. Annual review of Ecology and Systematics 21(1): 129– 166.

KAPLI, P., LUTTEROPP, S., ZHANG, J., KOBERT, K., PAVLIDIS, P., STAMATAKIS, A., FLOURI, T., (2017). *Multi-rate Poisson Tree Processes for single-locus species delimitation under Maximum Likelihood and Markov Chain Monte Carlo*. Bioinformatics btx025. doi:10.1093/bioinformatics/btx025.

LAKRA, W. S., VERMA, M. S., GOSWAMI, M., LAL, K. K., MOHINDRA, V., PUNIA, P., ... & HEBERT, P. (2011). *DNA barcoding Indian marine fishes*. Molecular Ecology Resources, 11(1), 60-71.

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*. Biota Neotrop., vol. 7, no. 3, p. 181-197.

LARA, A., PONCE DE LEÓN, J.L., RODRÍGUEZ, R., CASANE, D., CÔTÉ, G., BERNATCHEZ, L., GARCÍA MACHADO, E. (2010). *DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: Evidence for cryptic species and taxonomic conflicts*. Mol. Ecol. Resour. 10, 421–430. doi:10.1111/j.1755- 0998.2009.02785.x

LARSON, E. R., CASTELIN, M., WILLIAMS, B. W., OLDEN, J. D., & ABBOTT, C. L. (2016). *Phylogenetic species delimitation for crayfishes of the genus Pacifastacus*. PeerJ, 4, e1915.

LUNDBERG, J. G. (1975). *Homologies of the upper shoulder girdle and temporal region bones in catfishes (Order Siluriformes), with comments on the skull of the Helogeneidae*. Copeia, 66-74.

MAACK, R. (2001). *Breves notícias sobre a geologia dos estados do Paraná e Santa Catarina*. Brazilian Archives of Biology and Technology: an international journal, Curitiba, p.169-288, Dec. 2001. Ed. fac-sim. Artigo publicado no Arquivos de Biologia e Tecnologia, v.2, p.63-154, 1947. Edição especial Jubilee volume (1946-2001).

MOYLE, P. B. & CECH, J. J. (2000). *Fishes: an introduction to ichthyology*. 4th edition. Prentice-Hall, Upper Saddle River.

OYAKAWA, O. T., A. AKAMA. & A. M. ZANATA. (2005). *Review of the genus Hypostomus Lacépède, 1803 from Ribeira de Iguape basin, with descriptions of a new species (Pisces, Siluriformes, Loricariidae)*. Zootaxa, 921: 1–27.

PAIVA, M. P. (1982). *Grandes represas do Brasil*. Brasília, Editerra. 304p.

PEIXOTO, M. D. S. (2011). *Estudos sobre as relações filogenéticas e biogeográficas de espécies do gênero Pimelodella (Siluriformes, Heptapteridae) Eigenmann & Eigenmann, 1888 do Alto Paraná*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PEREIRA, L. H. G., MAIA, G. M. G., HANNER, R., FORESTI, F., OLIVEIRA, C. (2011). *DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil*. Mitochondrial DNA 22, 71–79. doi:10.3109/19401736.2010.532213.

PETRI, S. & V. J. FULFARO. (1983). *Geologia do Brasil*. São Paulo, Edusp, 631p.

PULLANDRE, N., LAMBERT, A., BROUILLET, S., ACHAZ, G. (2012). *ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation*. Molecular Ecology, 21: 1864-1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>.

RAMIREZ, J. L., BIRINDELLI, J. L., CARVALHO, D. C., AFFONSO, P. R., VENERE, P. C., ORTEGA, H., ... & GALETTI Jr, P. M. (2017). *Revealing hidden diversity of the underestimated neotropical ichthyofauna: DNA barcoding in the recently described genus Megaleporinus (Characiformes: Anostomidae)*. Frontiers in Genetics, 149.

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*. Neotropical ichthyology, v. 4, p. 225-246.

RIBOLLI, J., SCARANTO, B. M., SHIBATTA, O. A., BOMBARDELLI, R. A., & ZANIBONI-FILHO, E. (2017). *DNA barcoding confirms the occurrence of Rhamdia branneri and Rhamdia voulezi (Siluriformes: Heptapteridae) in the Iguçu River Basin*. Neotropical Ichthyology, 15.

RODRIGUES, R. M. (2010). *Estudos cromossômicos e moleculares em Loricariinae com ênfase em espécies de Rineloricaria (Siluriformes, Loricariidae): uma perspectiva evolutiva*. Dissertação (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo.

SAADI, A., M. N. MACHETTE, K. M. HALLER, R. L. DART, L. BRADLEY & A. M. P. D. SOUZA. (2002). *Map and database of Quaternary faults and lineaments in Brazil*. U.S. Geological Survey, OpenFile Report 02-230. (available at <http://pubs.usgs.gov/of/2002/ofr-02-230>).

- SALAMUNI, E; HEBERT, H., D; HASUI, Y. (2004). *Morfotectônica da bacia sedimentar de Curitiba*. Revista Brasileira de Geociências, v. 34, n. 4, p. 469-478, 2004.
- SERRA-PEREIRA, B.; MOURA, T.; GRIFFITHS, A.; GORDO, L.; FIGUEIREDO, I. (2010). *Molecular barcoding of skates (Chondrichthyes: Rajidae) from the southern Northeast Atlantic*. Zoologica Scripta. n. 40: 76–84.
- SEVERO-NETO, F., BREJÃO, GL, & CASATTI, L. (2023). *Fish functional trophic groups in headwater karst streams from the Upper Paraguay River basin*. Neotropical Ichthyology, 21, e220103.
- SLOBODIAN, V. (2017). *Taxonomic revision of Pimelodella Eigenmann & Eigenmann, 1888 (Siluriformes: Heptapteridae): an integrative proposal to delimit species using a multidisciplinary strategy*. Dissertação (Tese de Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SOUZA-SHIBATTA, L., TONINI, J. FABRAHAO, V. P. JARDULI, L. R., OLIVEIRA, C., MALABARBA, L. R., & SHIBATTA, O. A. (2018). *Reappraisal of the systematics of Microglanis cottoides (Siluriformes, Pseudopimelodidae), a catfish from southern Brazil*. PLoS ONE, 13 (7), e 0199963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199963>.
- STEINKE, D.; ZEMLAK, T. S.; BOUTILLIER, J. A.; HEBERT, P. D. N. (2009). *DNA barcoding of Pacific Canada's fishes*. Marine Biology. n. 156, p. 2641–2647.
- STRAHLER., A. N. (1952). *Hypsometric (areal-altitude) analysis of erosional topography*. Geol. Soc. Am. Bull., 63:1117-1142.
- SULLIVAN, J. P. MURIEL-CUNHA, J.; LUNDBERG, J. G. (2013a). *Phylogenetic relationships and molecular dating of the major groups of catfishes of the Neotropical superfamily Pimelodoidea (Teleostei, Siluriformes)*. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia 162: 89–110. <https://doi.org/10.1635/053.162.0106>.
- SWARBRICK, B. (2012). *Multivariate Data Analysis for Dummies*. Wiley & Sons, England. 43p.
- TARBUCK, E. J. & F. K. LUTGENS. (2002). *Earth: an introduction to physical geology*. New Jersey, Prentice Hall, 670p.
- TOFFOLI, D.; HRBEK, T.; ARAÚJO, M. L. G.; ALMEIDA, M. P.; CHARVET-ALMEIDA P, FARIAS, I. F. (2008). *A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus Potamotrygon (Potamotrygonidae, Myliobatiformes)*. Genetics Molecular Biology. n. 3, p. 324–336.
- VARELLA, A. A. C. (2008). *Análise de Componentes Principais*. Pós-Graduação (Professor). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica – Rio de Janeiro.
- WARD, R. D; HANNER, R; HEBERT, P. D. N. (2009). *Review paper the campaign to DNA barcode all fishes*, FISH-BOL. J. Fish Biol, v. 74, p. 329-356.
- WAUGH, J. (2007). *DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls*. BioEssays 29, 188–197.

WEITZMAN, S. H. & MENEZES, N. A. (1998). *Relationships of the tribes and genera of the Glandulocaudinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) with a description of a new genus, Chrysobrycon*. Pp. 171–192. In: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre, Edipucrs, 603p.

WEITZMAN, S. H. MENEZES, N. A. WEITZMAN, M. J. (1988). Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes, Characidae) with comments on the distributions of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. In *Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns* (Vol. 379, p. 427). Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências.

XAVIER, E. M., WIEDEMANN, C., ZATMARI, P. (1996). *Reativação meso-cenozóica do limite estrutural norte da Serra do Mar no Brasil e na África*. In: SBG, Congr. Brasil. Geol., 39, Salvador. Atas, 372-374.

ZHANG, J., KAPLI, P., PAVLIDIS, P., STAMATAKIS, A. (2013). *A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements*. *Bioinformatics*. 29 (22): 2869-76. doi: 10.1093/bioinformatics/btt499.

CAPÍTULO ÚNICO

Especiação incipiente de mandis-chorões relacionados à *Pimelodella meeki* (Siluriformes, Heptapteridae), evidenciada por análises morfológicas e moleculares

Resumo

Não havia registros na literatura de espécies de *Pimelodella* Eigenmann & Eigenmann, 1888 na bacia do rio Iguaçu antes dessa pesquisa. Entretanto, amostras foram obtidas na região do alto rio Iguaçu, nos municípios de Lapa, São José do Triunfo e São Mateus do Sul. A região do alto rio Iguaçu está isolada, mas próxima das bacias dos rios Tibagi, Ribeira de Iguape e de riachos costeiros, o que faz supor que sua espécie de *Pimelodella* também possa ter relações filogenéticas com *Pimelodella kronei* (Miranda Ribeiro, 1907a) e *Pimelodella lateristriga* (Lichtenstein, 1823). Outra espécie amplamente distribuída na bacia do rio Paraná é a *Pimelodella gracilis* (Valenciennes, 1835), que é facilmente distinta das três espécies acima pela morfologia. Dessa forma, comparações morfológicas e moleculares foram utilizadas para comparar essas espécies com o objetivo de delimitá-las com mais segurança. Para as análises morfológicas, foram examinados exemplares de *Pimelodella meeki* Eigenmann, 1910 da bacia do rio Tibagi (n = 10), *P. lateristriga* da bacia Litorânea e do rio Ribeira de Iguape (n = 37), *P. kronei* da bacia do rio Ribeira de Iguape (n = 2), e *P. gracilis* da bacia do alto rio Paraguai (n = 10), por meio de análise morfométrica multivariada de Componentes Principais, métricas (contagens de raios e vértebras), e do padrão de colorido. A análise do gene citocromo oxidase subunidade I (COI) foi empregada para comparar as amostras de *Pimelodella* sp. do alto rio Iguaçu (n = 4), *P. meeki* do rio Tibagi (n = 3), *P. meeki* do rio Tietê (n = 2), *P. lateristriga* da bacia Litorânea e Ribeira de Iguape (n = 12) e do rio Paraíba do Sul (n = 2) e *P. gracilis* da bacia do baixo rio Paraná (n = 2). As análises morfológicas apontaram diferenças sutis no padrão de colorido entre as amostras de *Pimelodella* sp. e *P. meeki*, mas nenhuma diferença morfométrica, inclusive com *P. lateristriga*. Já *P. kronei* e *P. gracilis* foram morfometricamente distinguidas de *Pimelodella* sp. e *P. meeki*. *Pimelodella gracilis* apresentou maior número de vértebras que as demais (45 – 47 vs. 40 – 42). Apesar das diferenças morfológicas de *P. gracilis* com as demais espécies, a análise do gene COI aponta para uma distância genética superior a 10,0% com *P. lateristriga* e

somente 2,5% com *P. meeki*, o que pode sinalizar uma proximidade filogenética dessas espécies da bacia do rio Paraná. Entre as *Pimelodella* sp. e *P. meeki*, há formação de grupos delimitados conforme a localidade, mas com distâncias menores que 1,4%. O uso de diferentes métodos de delimitação de espécies com base no gene COI (GMYC, mPTP e ABGD) mostra resultados congruentes, com a inclusão da espécie do Iguaçu no grupo *P. meeki*, mas separando-a como espécie distinta. Dessa forma, devido à dificuldade de separar a espécie do Iguaçu por meios morfológicos, mas considerando a ocorrência do isolamento geográfico das bacias hidrográficas analisadas e a separação das espécies por meio das análises moleculares, é possível inferir que as amostras de *Pimelodella* sp. do Iguaçu é uma espécie incipiente relacionada a *Pimelodella meeki*.

Palavras-chave: alto rio Paraná; Análise Morfológica; Bacias costeiras; Citocromo oxidase subunidade I; *DNA barcode*; rio Iguaçu.

INTRODUÇÃO

A região da América Central e do Sul que compreende da Costa Rica até a bacia do rio da Prata é o lar da diversificada fauna do gênero *Pimelodella* Eigenmann & Eigenmann 1888 (Bussing, 2002; Slobodian, 2017), conhecidos popularmente como mandis-chorões, com um total de 96 espécies válidas (Fricke *et al.*, 2024). Apresentam uma morfologia conservadora, com espécies com distribuição provavelmente ampla, embora tenham sido pouco estudadas (Slobodian, 2017). No entanto, a taxonomia dessa ictiofauna apresenta desafios significativos desde Eigenmann (1917), quando o gênero *Typhlobagrus* foi considerado sinônimo de *Pimelodella*, e várias outras espécies foram recentemente descritas, removidas ou transferidas para *Pimelodella* (Ferraris, 2007; Slobodian, 2017).

Adicionalmente, algumas espécies já descritas enfrentam incertezas taxonômicas, incluindo complexos de espécies e biodiversidade críptica (Mees, 1974, 1986; Guazzelli, 1997; Souza-Shibatta *et al.*, 2013), tornando desafiadora a definição precisa dos limites entre espécies intimamente relacionadas. A maior parte das espécies desse gênero que são consideradas válidas frequentemente correspondem apenas a uma lista selecionada de nomes disponíveis (Slobodian, 2017). Slobodian (2017) realizou uma revisão taxonômica abrangente no gênero, e correlacionou características úteis para delimitação das espécies. Quando estas possuem

comprimentos padrão e a morfologia geral semelhante, alguns caracteres, como contagens vertebrais, morfologia do espinho da nadadeira peitoral e padrões de cores, são úteis para fins taxonômicos. No entanto, é crucial observar que essas características não estão isentas de sobreposições entre espécies, especialmente ao considerar a variação geográfica (Bockmann & Slobodian, 2013).

A distribuição real dos exemplares de *Pimelodella meeki* Eigenmann, 1910 é provavelmente ampla, estendendo-se além da bacia do rio Tietê e registradas para o alto rio Paraná, conforme observado por Shibatta *et al.*, (2002), Slobodian (2017), Vianna *et al.*, (2023) e Dagosta *et al.*, (2024). Espécimes semelhantes a *P. meeki* foram coletados na bacia do alto rio Iguaçu, nas cidades de Lapa-PR, São José do Triunfo-PR e São Mateus do Sul-PR. Até então, não havia registros na literatura da ocorrência deste gênero nesta bacia. Além disso, a ocorrência de compartilhamento de espécies do Iguaçu com os rios que percorrem o escudo cristalino das terras altas, como o alto rio Tietê, juntamente com as drenagens costeiras adjacentes, revelam a existência de zonas verdadeiramente híbridas (Ribeiro, 2006). As espécies pertencentes ao gênero *Mimagoniates*, por exemplo, apresentam uma diversificação notável, com seis espécies distribuídas ao longo das drenagens costeiras. Por outro lado, seu grupo-irmão, o gênero *Glandulocauda*, composto por duas espécies e caracterizado por características primitivas, é endêmico do escudo cristalino no sudeste do Brasil, abrangendo o alto rio Tietê e o alto rio Iguaçu (Weitzman *et al.*, 1988; Weitzman & Menezes, 1998).

Levando em conta este compartilhamento faunístico entre as bacias hidrográficas é necessária a delimitação apropriada da espécie do Iguaçu, já que identificações incorretas podem resultar em uma cascata de erros, impactando negativamente tanto o progresso científico quanto a biodiversidade (Bortolus, 2008).

Para superar esses desafios, junto a taxonomia, a informação do *DNA* tem sido empregada na pesquisa da biodiversidade, considerando a diversidade genética na identificação e descoberta de táxons, especialmente novas espécies (Ramirez *et al.*, 2017; Souza-Shibatta *et al.*, 2018; Ribolli *et al.*, 2021). O código de barras do *DNA* tornou-se a principal ferramenta molecular para a identificação de espécies, sendo frequentemente combinado com outras fontes de dados para fortalecer os estudos taxonômicos (Durand *et al.*, 2017). Dentre essas fontes, destacam-se as medidas morfométricas tradicionais utilizadas na taxonomia, possibilitando a detecção de diferenças sutis nos níveis intra e interespecíficos (Vasconcellos *et al.*, 2008; Nirchio

et al., 2018). Estudos que incorporam tanto morfologia quanto *DNA* têm se revelado cada vez mais eficazes na identificação de linhagens crípticas (Padial *et al.*, 2010; Yeates *et al.*, 2011), contribuindo para a resolução de questões taxonômicas em grupos complexos, como o gênero *Pimelodella*. Nesse contexto, no presente estudo foi realizada uma análise integrada (morfologia e genética) para delimitar a espécie incipiente de *Pimelodella* sp. que ocorre na bacia do alto rio Iguaçu.

MATERIAL E MÉTODOS

Os exemplares para exame morfométrico e morfológico foram obtidos das coleções do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL). Já as coordenadas geográficas dos espécimes analisados do MZUEL, foram obtidas do próprio tombo, quando estas possuíam, e estão apresentados no Tabela 1, a seguir.

Tabela 1. Informações sobre número de tombo, localidade, coordenada geográfica e número de espécimes dos exemplares de *Pimelodella* analisados do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina, totalizando 102 espécimes.

ESPÉCIE	Nº DE TOMBO MZUEL	LOCALIDADE (DRENAGEM)	COORDENADA GEOGRÁFICA	N
<i>Pimelodella</i> sp.	21363	Lapa-PR, bacia do alto rio Iguaçu (afluente do rio Iguaçu)	25°39'06.4"S 49°51'22.0"W	10
<i>Pimelodella</i> sp.	21333	Lapa-PR, bacia do alto rio Iguaçu (afluente do rio Iguaçu)	25°39'06.4"S 49°51'22.0"W	16
<i>Pimelodella</i> sp.	14815	São José do Triunfo-PR, bacia do alto rio Iguaçu (Rio Cachoeira)	25°36'37.3"S 50°23'23.7"W	5
<i>Pimelodella</i> sp.	14876	São José do Triunfo-PR, bacia do alto rio Iguaçu (Ribeirão afluente do rio Iguaçu)	25°40'55.0"S 50°18'34.4"W	11
<i>Pimelodella</i> sp.	14834	São Mateus do Sul-PR, bacia do alto rio Iguaçu (Riacho tributário do rio Iguaçu)	25°49'03.3"S 50°19'14.3"W	1
<i>Pimelodella meeki</i>	22699	Jataizinho-PR, bacia do rio Tibagi (rio Couro do boi)	23°17'07.9"S 50°54'02.5"W	10
<i>Pimelodella lateristriga</i>	21392	Guaraqueçaba-PR, bacia Litorânea (rio Cubatão)	25°49'47.0"S 48°47'27.9"W	3
<i>Pimelodella lateristriga</i>	22036	Guaraqueçaba-PR, bacia Litorânea (rio Canavieira)	25°42'23.3"S 48°45'13.2"W	6
<i>Pimelodella lateristriga</i>	04518	Guaraqueçaba-PR, bacia Litorânea (rio Guaraqueçaba)	-	1
<i>Pimelodella lateristriga</i>	21110	Morretes-PR, bacia Litorânea (Rio Sambaqui)	25°31'38.0"S 48°44'56.8"W	26
<i>Pimelodella lateristriga</i>	22099	Sete Barras-SP, bacia do rio Ribeira de Iguape (Riacho afluente do rio Ipiranga)	24°10'49.3"S 47°51'30.6"W	1
<i>Pimelodella kronei</i>	16232	Iporanga-SP, bacia do rio Ribeira de Iguape (rio Iporanga)	24°34'49.0"S 48°35'30.2"W	2
<i>Pimelodella gracilis</i>	11133	Corumbá-MS, bacia do rio Paraguai (rio Miranda)	19°33'00.0"S 57°14'00.0"W	3
<i>Pimelodella gracilis</i>	11192	Corumbá-MS, bacia do rio Paraguai (rio Miranda)	19°34'40.8"S 57°01'19.2"W	1
<i>Pimelodella gracilis</i>	13699	Corumbá-MS, bacia do rio Paraguai (rio Miranda)	19°32'28.49"S 57°2'23.2"W	5
<i>Pimelodella gracilis</i>	11187	Corumbá-MS, bacia do rio Paraguai (rio Miranda)	19°32'28.5"S 57°02'23.2"W	1

O estudo também comparou os exemplares de *Pimelodella* sp. do rio Iguaçu com a espécie *P. meeki* da bacia do rio Tibagi e Tietê, *P. kronei* e *P. lateristriga* das bacias do rio Ribeira de Iguape e bacia Litorânea, e *P. gracilis* do rio Paraguai e Paraná (Figura 2).

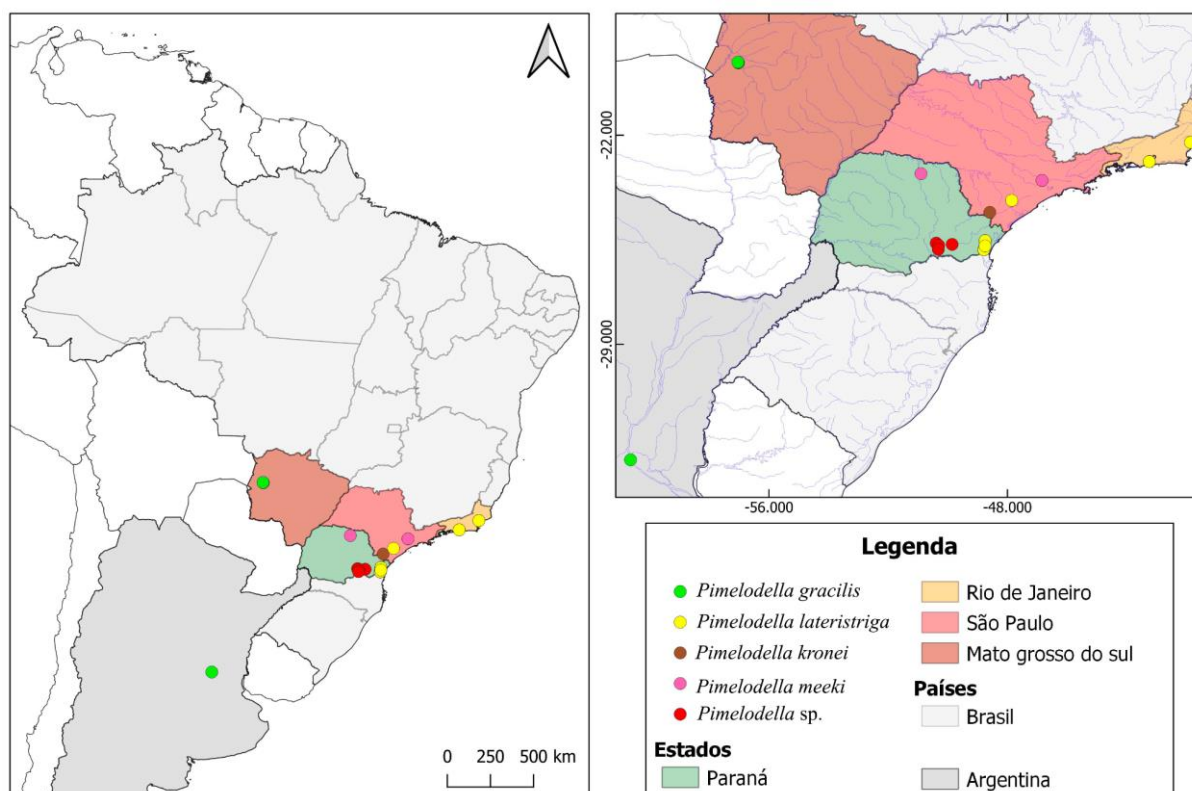


Figura 2. Distribuição das espécies analisadas morfologicamente e molecularmente de *Pimelodella* da bacia do alto rio Paraná (rio Tibagi e rio Tietê), baixo rio Paraná, bacia do alto rio Iguaçu, bacia Litorânea, bacia do rio Ribeira de Iguape e bacia do rio Paraguai. Os espécimes correspondem às seguintes cores: verde, *P. gracilis*; marrom, *P. kronei*; amarelo, *P. lateristriga*; rosa, *P. meeki*; e vermelho, *Pimelodella sp.*

Morfometria e merística. O número total de exemplares analisados foi de 102, todas as medidas morfométricas foram realizadas ponto a ponto com paquímetro digital, seguindo o protocolo apresentado por Slobodian & Bockmann (2013). Ao total, foram mensuradas 59 medidas morfométricas em cada exemplar. As variáveis merísticas e a posição das nadadeiras seguem Bockmann & Castro (2010). Foram contabilizadas a quantidade de raios ramificados da nadadeira dorsal (D), raios ramificados da peitoral (P), raios ramificados da pélvica (V), raios ramificados no lobo dorsal da caudal, raios ramificados no lobo ventral da caudal, raios simples e ramificados da nadadeira anal (A) e rastros branquiais. O número de espécimes analisados foi apresentado entre parênteses e as contagens no holótipo foram indicadas por um asterisco. A indicação por dois asteriscos aponta a divergência de contagem dos raios da nadadeira anal de exemplares da localidade-tipo (*P. gracilis*, *P. kronei*, *P. meeki* e *P. lateristriga*), que foram obtidas de Slobodian (2017) nos quais foram contabilizados os raios ramificados, simples e cobertos por pele. Com relação à contagem nos

espécimes do MZUEL, contabilizou-se a soma dos raios ramificados e raios simples visíveis externamente.

Identificação das espécies. Todas as espécies analisadas (*P. gracilis*, *P. kronei*, *P. lateristriga* e *P. meeki*) foram identificadas com o auxílio das descrições e chave de identificação apresentados por Slobodian (2017).

Análise osteológica. Para a análise osteológica foi usado o sistema de imagem pré-clínica *XPERT* 40. Para a identificação dos ossos foi seguida a nomenclatura osteológica utilizada por Arratia (2003a; 2003b), Slobodian & Bockmann (2013) e Bockmann & Miquelarena (2008). As contagens vertebrais incluíram os elementos do complexo vertebral, contados como cinco, todas as vértebras livres, e o centro caudal composto (PU1+U1) contado como um (Lundberg & Baskin, 1969).

A nomenclatura osteológica da nadadeira peitoral e as ornamentações dos espinhos da nadadeira dorsal seguiram Vanscoy *et al.* (2015). As serras foram consideradas retrorsas quando apontadas em direção à base da nadadeira. A ponta distal do espinho da nadadeira peitoral poderá apresentar uma a duas serras incipientes não completamente ossificadas, que não foram incluídas na contagem de serras da nadadeira peitoral.

Análise dos componentes principais (PCA). Os exemplares foram separados em cinco grupos, por bacia hidrográfica, em respectivas cores: *Pimelodella* sp. - bacia do rio Iguaçu (rosa); *P. meeki* - bacia do rio Tibagi (roxo); *P. lateristriga* - bacia Litorânea e bacia rio Ribeira do Iguape (amarelo); *P. kronei* - bacia rio Ribeira do Iguape (marrom) e *P. gracilis* - bacia do rio Paraguai (verde). Utilizou-se o programa *Past* 4.03 (Hammer *et al.*, 2001) (<https://past.en.lo4d.com/windows>). Os dados brutos da morfometria (excetuando-se as características: comprimento total e comprimento padrão) foram utilizados no programa *Past*. Os dados foram logaritimizados, e foi rodada a análise de *PCA (Multivariate-> Ordenation-> PCA)*. Em seguida, *Recompute* e *Scatter plot*, no qual foi possível obter o gráfico de dispersão e os valores de *PC (Eigenvalue e Variance %)*. O primeiro componente principal (PC1) é interpretado como um eixo de tamanho quando os pesos das variáveis são semelhantes em

magnitude e sinal, e o segundo (PC2) e o terceiro (PC3) componentes principais são interpretados como variáveis da forma (Jolicouer & Mosimann, 1960).

Análise molecular. As amostras de tecido das espécies de *Pimelodella* foram obtidas do banco de tecidos da Universidade Estadual de Londrina, e retiradas de exemplares depositados no MZUEL (Tabela 2). As sequências adicionais do gene COI das espécies de *Pimelodella* do rio Paraná (*P. gracilis*), da bacia do Paraíba do Sul (*P. lateristriga*) e alto rio Paraná (*P. meeki*) foram todas obtidas do *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Tabela 2). Foi realizada a extração e quantificação do DNA genômico e amplificada a região, denominada *Barcodeing*, do gene mitocondrial *Citocromo C Oxidase* subunidade I (COI) utilizando protocolo de extração de *Wizard Genomic DNA Purification – PROMEGA*), com aproximadamente 698 pares de bases, foi amplificada por reação de cadeia de polimerase (PCR) utilizando os *primers FishF1* e *FishR1* seguindo as condições de PCR propostas por Hajibabaei *et al.*, (2005). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 0,8%, corados com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies), seguindo protocolo do fabricante, e purificados utilizando ExoSAP IT® (Prodinol Biotecnologia).

Tabela 2. Informações sobre as sequências utilizadas nas análises, incluindo dados sobre os vouchers e número de acesso no *GenBank*.

ESPÉCIE	Nº DE TOMBO	Nº DO TECIDO	LOCALIDADE (DRENAGEM)	GENBANK (ACCESSION NUMBER)
<i>Pimelodella</i> sp.	MZUEL 21333	1	Lapa-PR, alto rio Iguaçu (afluente do rio Iguaçu)	-
<i>Pimelodella</i> sp.	MZUEL 21333	2	Lapa-PR, alto rio Iguaçu (afluente do rio Iguaçu)	-
<i>Pimelodella</i> sp.	MZUEL 21333	3	Lapa-PR, alto rio Iguaçu (afluente do rio Iguaçu)	-
<i>Pimelodella</i> sp.	MZUEL 21333	4	Lapa-PR, alto rio Iguaçu (afluente do rio Iguaçu)	-
<i>Pimelodella meeki</i>	LBPV 9130	-	São Paulo-SP, bacia do alto rio Paraná (afluente rio Tietê)	JN989125
<i>Pimelodella meeki</i>	LBPV 9131	-	São Paulo-SP, bacia do alto rio Paraná (afluente rio Tietê)	JN989126
<i>Pimelodella meeki</i>	MZUEL 22699	1	Jataizinho-PR, bacia do alto rio Paraná (afluente do rio Tibagi)	-
<i>Pimelodella meeki</i>	MZUEL 22699	2	Jataizinho-PR, bacia do alto rio Paraná (afluente do rio Tibagi)	-

<i>Pimelodella meeki</i>	MZUEL 22699	3	Jataizinho-PR, bacia do alto rio Paraná (afluente do rio Tibagi)	-
<i>Pimelodella lateristriga</i>	MZUEL 21392	1	Guaraqueçaba-PR, bacia Litorânea (rio Cubatão)	-
<i>Pimelodella lateristriga</i>	MZUEL 21392	2	Guaraqueçaba-PR, bacia Litorânea (rio Cubatão)	-
<i>Pimelodella lateristriga</i>	MZUEL 21392	3	Guaraqueçaba-PR, bacia Litorânea (rio Cubatão)	-
<i>Pimelodella lateristriga</i>	MZUEL 22036	1	Guaraqueçaba-PR, bacia Litorânea (rio Canavieira)	-
<i>Pimelodella lateristriga</i>	MZUEL 22036	2	Guaraqueçaba-PR, bacia Litorânea (rio Canavieira)	-
<i>Pimelodella lateristriga</i>	MZUEL 22036	3	Guaraqueçaba-PR, bacia Litorânea (rio Canavieira)	-
<i>Pimelodella lateristriga</i>	MZUEL 21110	1	Morretes-PR, bacia Litorânea (rio Sambaqui)	-
<i>Pimelodella lateristriga</i>	MZUEL 21110	2	Morretes-PR, bacia Litorânea (rio Sambaqui)	-
<i>Pimelodella lateristriga</i>	MZUEL 21110	3	Morretes-PR, bacia Litorânea (rio Sambaqui)	-
<i>Pimelodella lateristriga</i>	MZUEL 21110	4	Morretes-PR, bacia Litorânea (rio Sambaqui)	-
<i>Pimelodella lateristriga</i>	MZUEL 21110	5	Morretes-PR, bacia Litorânea (rio Sambaqui)	-
<i>Pimelodella lateristriga</i>	MZUEL 22099	1	Sete Barras-SP, bacia rio Ribeira de Iguape (afluente do rio Ipiranga)	-
<i>Pimelodella lateristriga</i>	MNLM 5105	-	Rio de Janeiro, Magé, Tributário do rio Suruí, bacia do Paraíba do sul	MG825040
<i>Pimelodella lateristriga</i>	LBP 20207	-	Rio de Janeiro, bacia do Paraíba do sul	GU702094
<i>Pimelodella gracilis</i>	MG ZV-P 302	-	Baixo rio Paraná	KU289024
<i>Pimelodella gracilis</i>	MG ZV-P 181-5	-	Baixo rio Paraná	KU288913

Análises de distância genética e análises filogenéticas. As sequências de nucleotídeos alinhadas foram utilizadas para cálculo das distâncias genéticas média entre as amostras e dentro de cada amostra através do modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980; Tamura *et al.*, 2011), no *Mega* v.6. A análise filogenética de Máxima

Verossimilhança foi realizada no programa *Mega* v.6 a partir das sequências alinhadas, e de sequências de espécimes de *Pimelodella* disponíveis no *GenBank*, foi feita uma análise de Inferência Bayesiana no programa *BEAST* V.2.6.6. Para isso, a matriz de sequências alinhadas foi salva no *Mega* v.6 no formato *FASTA*, e aberta no programa *Beauti*, onde um arquivo foi gerado com as opções de relógio molecular *strict clock*, opção que acomoda a possibilidade de taxas independentes de evolução molecular em diferentes ramos (Drummond, 2007); a taxa do relógio foi calibrado a 0.01 para observação do tempo de divergência na topologia da árvore (Thomaz *et al.*, 2015); e o modelo *Birth-death*, uma extensão do modelo *Yule*, que assume que em qualquer ponto no tempo cada linhagem pode sofrer especiação ou extinção. O modelo evolutivo HKY foi calculado através do pacote *bModelTest* com a taxa de mutação estimada (Bouckaert & Drummond, 2017). As buscas foram executadas no *Beast* por 30 milhões de gerações. Para assegurar que as amostras da distribuição posterior alcançaram o tamanho efetivo mínimo (ESS > 200) foi utilizado o programa *TRACER*. As árvores foram sumarizadas no *TreeAnnotator*, descartando 10% das árvores (Drummond & Rambaut, 2007). A árvore final foi editada no *FigTree*.

Análises de delimitação de espécies. Foram realizadas três análises diferentes de delimitação de espécies. A análise com o modelo *Generalized mixed Yule-coalescent* (GMYC) (Fujisawa & Barraclough (2013) foi feita no servidor virtual <https://species.h-its.org/gmyc/> onde foram incluída a árvore ultramétrica calculada previamente no *Beast*. A análise com o modelo *multi rate Poisson Tree Processes* (mPTP) (Zhang *et al.*, 2013) no servidor virtual mPTP <https://mptp.h-its.org/#/tree>, utilizando como arquivo de entrada uma árvore de Máxima Verossimilhança, previamente calculada no *Mega* v.6. A análise com o modelo *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD) (Junier & Zdobnov, 2010) foi respectivamente feita no servidor virtual <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>, onde fora incluída a matriz de sequências alinhadas; para essa análise foi escolhido o modelo de distância K80.

RESULTADOS

Morfologia. A análise morfológica dos exemplares coletados na bacia do alto rio Iguaçu aponta que suas características foram próximas com a descrição de

Pimelodella meeki feita por Slobodian (2017). Porém, houve diferença com relação ao padrão de colorido, foi notado que as *Pimelodella* sp. da bacia do alto rio Iguaçu e *P. meeki* do rio Tibagi são semelhantes e apresentam a listra abaixo da nadadeira dorsal indo até pouco mais do início da nadadeira adiposa, ao contrário da *P. meeki* da localidade-tipo (rio Tietê), que apresenta a listra apenas abaixo na nadadeira dorsal (Figura 3).

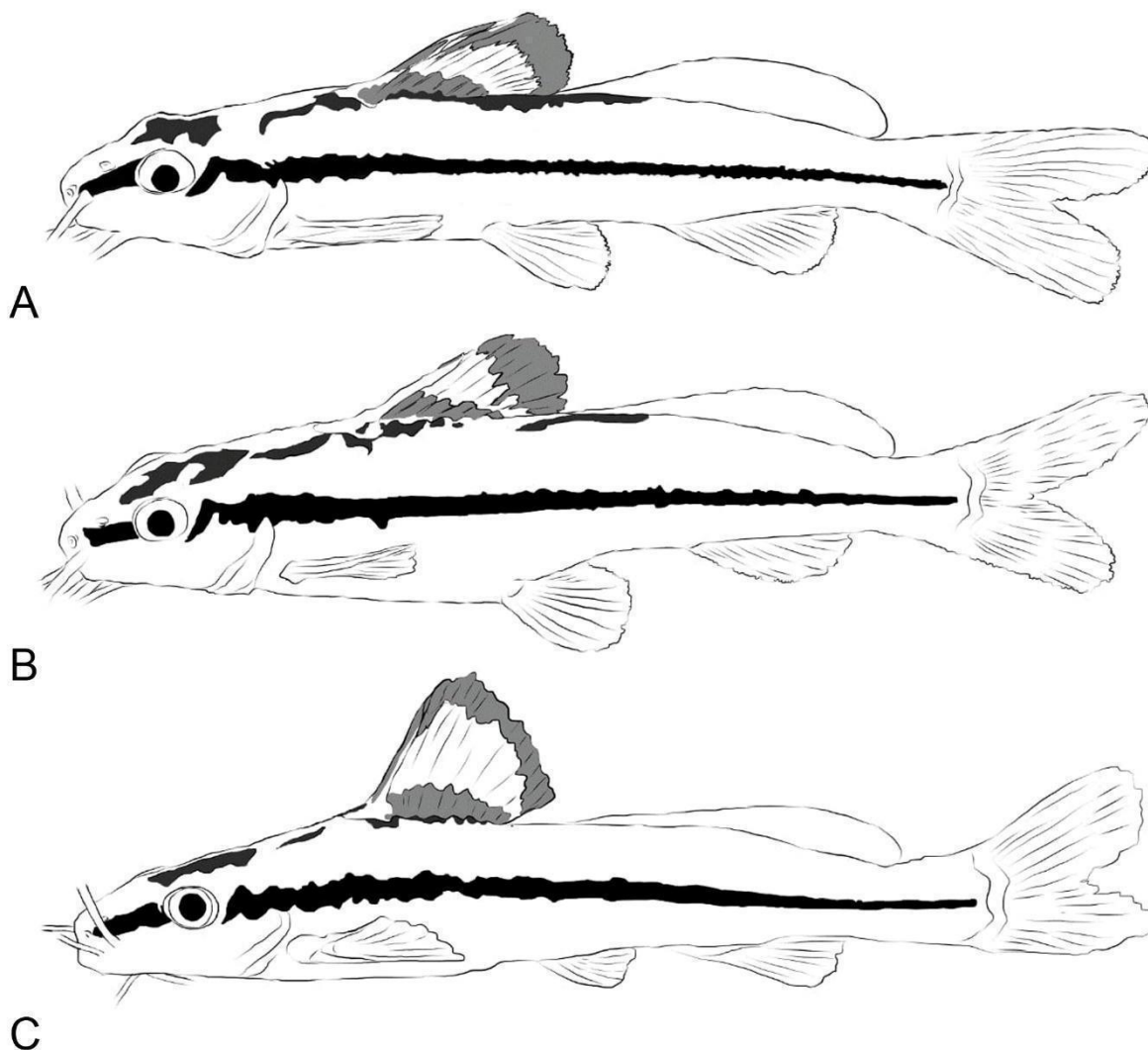


Figura 3. Desenho esquemático da vista lateral de *Pimelodella* sp. e *Pimelodella meeki*. A letra A, *P. sp.*, bacia do alto rio Iguaçu; letra B e C *P. meeki*, bacia do alto rio Paraná (rio Tibagi) e bacia do alto rio Paraná (rio Tietê). Destacando o padrão de colorido e as principais manchas de coloração de cada população.

A morfologia do espinho da nadadeira peitoral da *Pimelodella* sp. da bacia do alto rio Iguaçu possui suas serras na margem posterior mais rasas, e os da localidade-tipo (Tietê) são menores e mais estreitos que os do Tibagi. Se apresentaram com o formato curvado, com serras retrorsas e na margem posterior do espinho, a dois terços

basais. A quantidade de espinhos variou como esperado para a espécie, com a margem posterior com 5 a 10 espinhos em forma de serras triangulares, os dois ou três espinhos distais, mais retos, curtos e com bases maiores (Figura 4).

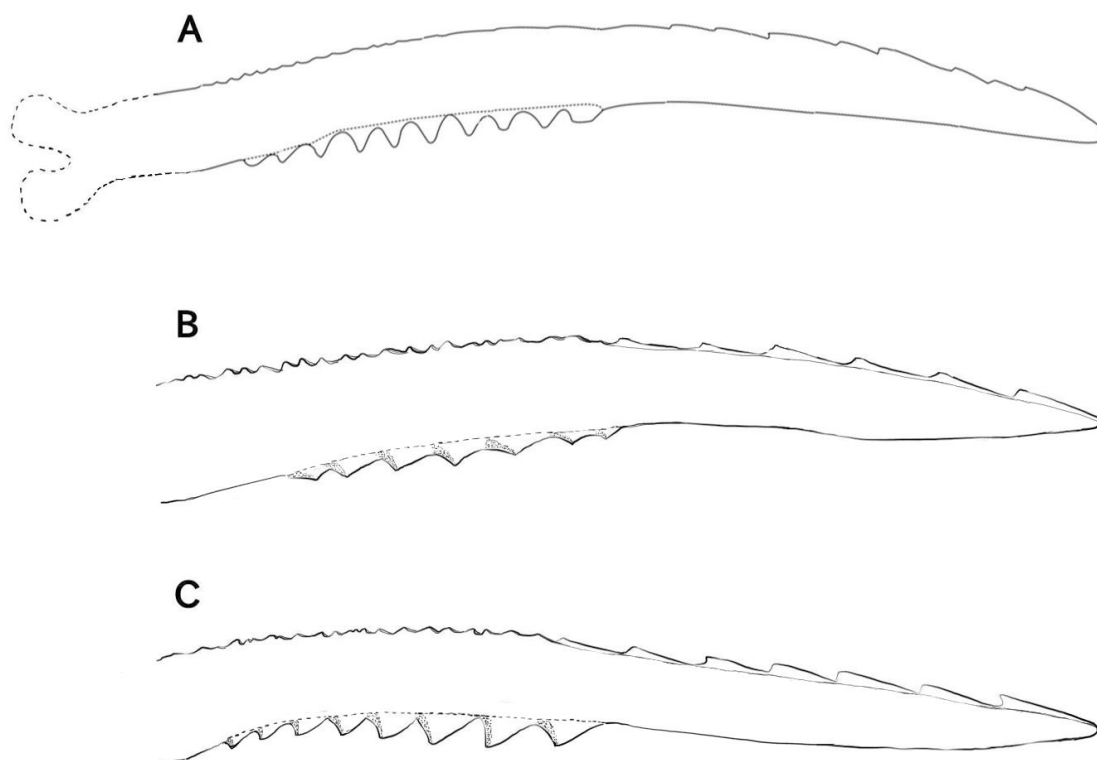


Figura 4. Desenho esquemático da vista dorsal do espinho da nadadeira peitoral esquerda de *Pimelodella* sp. e *Pimelodella meeki*. A letra A, *P. meeki* da bacia do rio Tietê, comprimento total 12 mm, desenho retirado e adaptado da Tese Slobodian (2017) corresponde a figura 137 (pág. 638 tese). Letra B, *P. sp.*, bacia do alto rio Iguaçu comprimento total 10.2 mm, e Letra C, *P. meeki*, bacia do alto rio Paraná (rio Tibagi) comprimento total 10.9 mm.

Análise das variáveis merísticas e contagem vertebral. Os dados merísticos de *Pimelodella* sp. do alto rio Iguaçu e *P. meeki* do rio Tibagi, estão apresentados na Tabela 3, comparados com *P. meeki* da localidade-tipo. Somente os rastros branquiais não foram comparados, devido à falta de informação da espécie da localidade-tipo. Os raios ramificados da nadadeira dorsal e da nadadeira pélvica e dos lobos da caudal não se diferenciam em quantidade entre as populações de *Pimelodella* sp. e *P. meeki* das diferentes bacias; e a *Pimelodella* sp. do Iguaçu e *P. meeki* do Tibagi mantiveram a mesma quantidade de raios da nadadeira peitoral (7), se diferenciando em um raio, da *P. meeki* da localidade-tipo (vs.7-8). As demais contagens de raios, se diferenciam dentro do padrão esperado de *P. meeki*. As variáveis merísticas dos exemplares de *P. gracilis*, *P. kronei*, *P. lateristriga* também foram analisados.

Entre a análise das populações da localidade-tipo, com os exemplares das outras espécies do MZUEL, a máxima do número de raios e mínima foram condizentes.

Tabela 3. Variáveis merísticas dos espécimes de *Pimelodella* sp., da bacia do alto rio Iguaçu (MZUEL), e *P. meeki* da bacia do alto rio Paraná (rio Tibagi) (MZUEL) e da localidade-tipo bacia do rio Tietê.

	Bacia do alto rio Iguaçu (MZUEL)	Bacia do alto rio Paraná, rio Tibagi (MZUEL)	Bacia do alto rio Paraná, rio Tietê (dados Tese Slobodian, 2017)
Raios ramificados da dorsal	6 (40)	6 (10)	6 (18)
Raios ramificados da peitoral	7 (43)	7 (10)	7 (14*) – 8 (1)
Raios ramificados da pélvica	5 (43)	5 (10)	5 (17)
Raios ramificados no lobo dorsal da caudal	7 (38)	7 (10)	7 (9)
Raios ramificados no lobo ventral da caudal	8 (41)	8 (10)	8 (9)
Raios da anal ramificados e simples (MZUEL) **Raios da anal ramificados, simples e cobertos por pele	9 (1) – 10 (42)	10 (10)	**10 (3) - 9 (1) - 11 (5) 12 (4) - 13 (2) - 14 (1)
Rastros branquiais	7 (1) – 8 (18)	8 (10)	—

A análise de contagem de vértebras foi a principal característica de separação entre as espécies *Pimelodella* sp. e *P. meeki*, de *P. kronei*, *P. lateristriga* e *P. gracilis*, segundo a recente revisão do gênero de Slobodian (2017). Dos 43 exemplares de *Pimelodella* sp. do alto rio Iguaçu, foi realizada a contagem vertebral de 37, dos quais 14 exemplares apresentaram 40 vértebras totais, 18 com 41 vértebras totais e cinco exemplares com 42 vértebras totais (Figura 5). Dos 10 exemplares da bacia do rio

Tibagi, foi realizada a contagem vertebral de 9, dos quais um exemplar apresentou 42 vértebras totais, sete com 40 e um exemplar com 41 vértebras totais (Figura 6). Ao total, a variação foi de 40 a 42 vértebras nos exemplares da bacia do rio Iguaçu e do rio Tibagi. Da análise de *P. meeki* da localidade-tipo (Slobodian, 2017) observam-se seis exemplares com 40 vértebras totais e o holótipo com 41 vértebras totais.

Dos cinco exemplares analisados de *P. gracilis*, houve variação de 45 a 47 no total de vértebras, um exemplar apresentou 47 vértebras. Os dois exemplares de *P. kronei* analisados apresentaram 42 vértebras totais (como na descrição da espécie). Dos 33 espécimes analisados de *P. lateristriga*, 29 apresentaram 42 vértebras totais (como na descrição de espécie), um com 41 vértebras e três exemplares com 40 vértebras totais; com variação de 40 a 42 vértebras totais. A comparação dos números de vértebras das espécies analisadas estão apresentados na Figura 5, em formato de *Boxplot*.

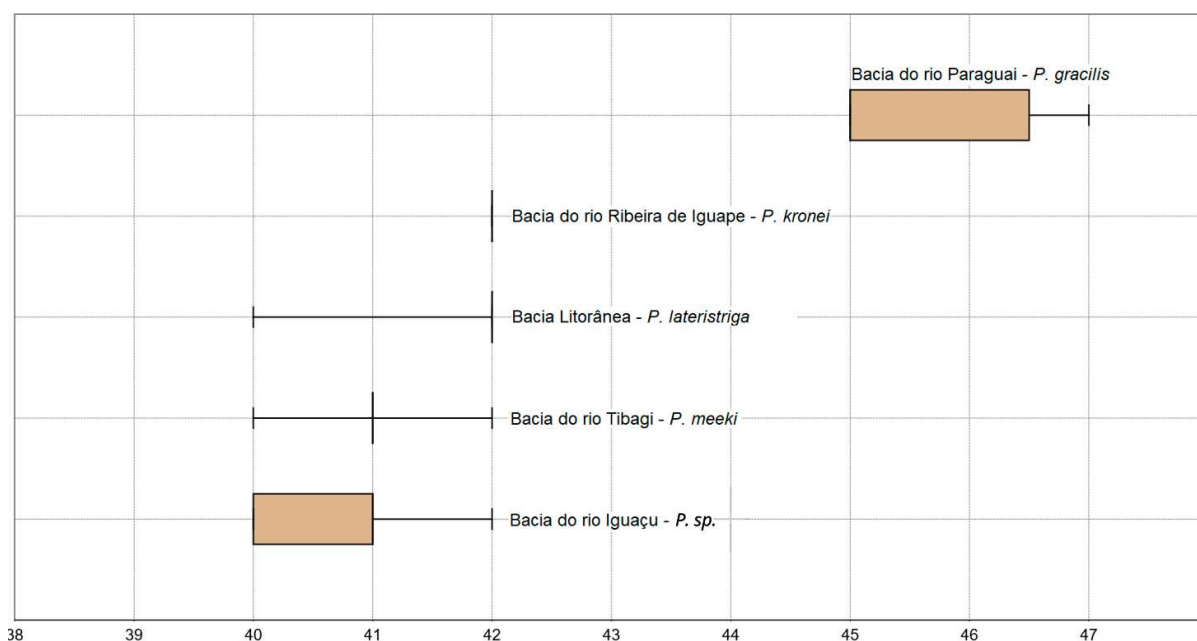


Figura 5. *Boxplot* da contagem vertebral dos espécimes de *Pimelodella* sp. da bacia do rio Iguaçu (n=37); *P. meeki* da bacia do rio Tibagi (n=9); *P. lateristriga* da bacia Litorânea (n=33); *P. kronei* da bacia do rio Ribeira de Iguape (n=2) e *P. gracilis* da bacia do rio Paraguai (n=5).

Análise das variáveis morfométricas. Os valores dos dados morfométricos de *Pimelodella* sp. do alto rio Iguaçu se encontram no Tabela 4, foi usado como comparativo às mesmas variáveis entre as diferentes populações de *P. meeki* da bacia do rio Tietê e rio Tibagi. Foi possível identificar características que diferiram entre os

espécimes do rio Iguaçu e rio Tibagi com os da localidade-tipo no rio Tietê (foi considerado como diferença o números com pelo menos uma casa decimal acima e uma casa decimal abaixo), como: altura do corpo; largura do corpo; comprimento do barbilhão mental externo; distância da nadadeira dorsal à nadadeira adiposa; comprimento pré-pélvico; distância entre a ponta do focinho e a ponta distal da nadadeira pélvica; comprimento do primeiro raio da nadadeira pélvica esquerda (não ramificado); comprimento da nadadeira adiposa; distância focinho-ânus; comprimento do lobo dorsal da nadadeira caudal; comprimento do lobo ventral da nadadeira caudal; altura da cabeça; largura da cabeça; largura interorbital e largura entre as narinas anterior.

Entre *Pimelodella* sp. do Iguaçu, comparado com *P. gracilis*, *P. kronei*, *P. lateristriga* (Tabela 5) não houve diferenças nas seguintes características: largura cleitral; distância entre a ponta do focinho e a ponta distal da nadadeira peitoral; distância entre as nadadeiras pélvicas; comprimento do primeiro raio da nadadeira pélvica esquerda (não ramificado); distância entre a ponta do focinho e a extremidade da base da nadadeira anal; altura da nadadeira adiposa; altura do pedúnculo caudal; distância anus papila urogenital.

Tabela 4. Dados morfométricos analisados, discriminados pelo nome original da espécie e localidade de *Pimelodella* sp., da bacia do alto rio Iguaçu e *P. meeki* da bacia do alto rio Paraná, rio Tibagi.

	<i>Pimelodella</i> sp. bacia do rio Iguaçu				<i>P. meeki</i> bacia do rio Tibagi					
	n	Min - Máx	Média	DP	n	Min - Máx	Média	DP		
Comprimento padrão (mm)	43	43,36	75,01	53,85	8,58	10	50,32	78,08	62,55	8,81
Porcentagem Comprimento padrão										
Altura do corpo (dorsal)	43	13,1	19,9	16,4	1,65	10	15,97	20,09	18,22	1,21
Largura do corpo (dorsal)	43	10,8	16,1	13,8	1,17	10	12,18	16,19	14,84	1,19
Largura cleitral	43	17,2	19,7	18,5	0,66	10	18,34	30,23	20,52	3,46
Comprimento da cabeça	43	30,0	34,4	32,0	0,99	10	17,20	34,28	30,84	4,91
Comprimento barbilhão maxilar (E)	43	42,5	68,1	59,1	4,85	10	59,16	73,73	64,78	4,81
Comprimento externo do barbilhão mental (E)	43	21,1	29,3	25,9	2,06	10	15,24	28,91	25,14	4,09
Comprimento interno do barbilhão mental (E)	43	10,4	15,9	13,9	1,21	10	13,28	26,32	16,51	3,85
Comprimento pré-dorsal	43	34,2	46,1	35,9	1,77	10	31,61	35,80	33,75	1,59
Distância entre a ponta do focinho e a extremidade final da base da nadadeira dorsal	43	45,3	51,3	48,7	1,22	10	44,77	48,95	47,63	1,34
Distância entre a ponta do focinho e a ponta distal da nadadeira dorsal	43	54,6	63,7	59,4	1,46	10	56,22	65,09	59,21	2,43
Nadadeira dorsal a nadadeira adiposa	43	5,7	18,6	9,7	3,05	10	7,15	14,79	11,45	2,62
Base da nadadeira dorsal	43	12,7	15,8	14,2	0,95	10	13,84	23,18	15,60	2,86
Comprimento do primeiro raio da nadadeira dorsal (não ramificado)	40	15,9	22,4	18,7	1,48	10	14,87	22,63	19,21	2,28
Comprimento da parte rígida do primeiro raio da nadadeira dorsal	42	11,7	17,4	14,4	1,28	10	13,04	21,96	15,95	2,44
Comprimento do segundo raio da nadadeira dorsal (primeira ramificação)	41	15,6	21,8	18,5	1,44	10	20,21	24,71	22,38	1,68
Comprimento do terceiro raio da nadadeira dorsal (segunda ramificação)	43	14,9	20,1	17,5	1,22	10	21,84	27,56	24,04	1,66
Comprimento pré-peitoral	43	20,9	26,0	24,1	1,09	10	21,50	24,85	23,02	1,24
Distância entre a ponta do focinho e a extremidade da base da nadadeira peitoral	43	23,1	29,3	26,7	1,48	10	22,91	26,53	25,25	1,02
Distância entre a ponta do focinho e a ponta distal da nadadeira peitoral	43	38,5	46,3	42,4	1,69	10	38,41	43,22	40,74	1,65

Comprimento do primeiro raio da nadadeira peitoral esquerda (não ramificado)	41	15,7	20,4	17,7	1,19	10	15,89	19,93	18,10	1,48
Comprimento da parte rígida do primeiro raio da nadadeira peitoral esquerda	42	10,8	16,8	14,5	1,06	10	13,24	16,55	15,12	1,13
Comprimento do segundo raio da nadadeira peitoral esquerda (primeira ramificação)	42	13,8	20,6	16,8	1,67	10	15,43	23,15	18,59	1,95
Comprimento do terceiro raio da nadadeira peitoral esquerda (segunda ramificação)	41	11,2	19,5	15,5	1,96	10	14,15	23,92	17,10	2,66
Comprimento pré-pélvico	43	44,8	51,2	48,1	1,37	10	44,25	49,20	46,03	1,63
Distância entre a ponta do focinho e a base da nadadeira pélvica	43	47,0	54,3	50,2	1,31	10	46,16	51,01	48,20	1,73
Distância entre a ponta do focinho e a ponta distal da nadadeira pélvica	43	59,3	64,3	62,3	1,35	10	40,73	61,88	53,46	8,54
Distância entre as nadadeiras pélvicas	43	3,4	5,6	4,4	0,42	10	3,80	5,40	4,89	0,52
Comprimento do primeiro raio da nadadeira pélvica esquerda (não ramificado)	43	10,0	14,2	12,0	1,02	10	10,24	14,84	12,93	1,49
Comprimento do segundo raio da nadadeira pélvica esquerda (primeira ramificação)	43	11,6	16,2	13,3	1,06	10	12,77	16,21	14,42	0,95
Comprimento do terceiro raio da nadadeira pélvica esquerda (segunda ramificação)	43	10,9	16,4	13,5	1,20	10	13,49	15,63	14,28	0,70
Base da nadadeira anal	43	9,5	14,9	11,9	1,19	10	10,03	14,21	11,78	1,33
Comprimento pré-anal	43	64,1	70,7	67,8	1,43	10	64,57	72,73	69,33	2,51
Distância entre a ponta do focinho e a extremidade da base da nadadeira anal	43	76,9	83,2	79,5	1,38	10	77,21	80,56	79,00	1,30
Distância entre a ponta do focinho e a ponta distal da nadadeira anal	43	84,2	91,7	87,2	1,57	10	84,94	88,62	86,86	1,47
Comprimento da nadadeira adiposa	43	21,2	37,9	30,6	3,51	10	24,40	38,25	32,09	3,70
Comprimento pré-adiposo	43	53,7	63,7	58,1	2,74	10	54,30	65,33	60,05	3,79
Distância entre a ponta do focinho e a extremidade da base da nadadeira adiposa	43	84,8	92,8	88,5	1,84	10	86,87	92,12	90,03	1,58
Altura da nadadeira adiposa	43	1,6	5,0	3,7	0,75	10	3,41	5,38	4,25	0,53
Comprimento do pedúnculo caudal	43	8,0	11,1	9,8	0,84	10	8,57	12,19	9,90	1,17
Altura do pedúnculo caudal	43	6,3	9,0	7,6	0,63	10	8,23	9,95	8,99	0,55
Distância focinho-ânus	43	52,5	59,4	55,0	1,44	10	51,69	56,89	54,21	1,94
Distância focinho-papila urogenital	43	56,9	61,3	58,9	1,22	10	54,30	63,08	58,96	2,61

Distância anus papila urogenital	43	2,2	3,9	3,0	0,46	10	3,36	6,78	4,94	1,11
Comprimento do lobo dorsal da nadadeira caudal	39	20,2	27,1	23,2	1,52	9	22,48	24,96	23,81	0,79
Comprimento do lobo ventral da nadadeira caudal	40	18,4	25,0	21,5	1,60	10	20,08	26,03	23,03	1,98
Porcentagem Cabeça										
Altura da cabeça	43	41,6	73,5	47,3	4,61	10	42,69	50,15	47,37	2,89
Largura da cabeça	43	42,4	60,0	52,8	3,40	10	48,76	57,49	54,85	2,39
Diâmetro do olho (E)	43	17,5	22,5	19,4	1,29	10	16,52	20,26	18,49	1,28
Largura do Interorbital carnoso	43	21,1	35,0	29,5	2,95	10	24,68	30,31	27,85	1,96
Largura do osso Interorbital	43	13,3	18,8	16,5	1,17	10	14,50	17,99	16,23	1,31
Boca largura (inclui lábios)	43	26,6	35,8	31,1	2,51	10	29,76	36,68	31,65	2,00
Comprimento focinho (E)	43	27,6	35,4	31,7	1,75	10	22,49	30,03	27,38	2,60
Distância entre a ponta do focinho e a narina posterior (E)	43	15,4	22,6	19,4	1,70	10	14,77	20,77	17,25	1,79
Largura entre as narinas anterior	43	11,3	17,2	14,4	1,21	10	11,24	14,78	13,08	1,18
Largura entre as narinas posterior	43	12,6	17,2	14,8	1,11	10	13,73	17,37	15,66	1,22
Comprimento intranarial (E)	43	10,9	15,3	13,0	1,15	10	9,05	13,27	11,40	1,14

Tabela 5. Dados morfométricos analisados, discriminados pelo nome original da espécie e localidade, de *P. lateristriga* da bacia Litorânea, *P. kronei* da bacia do rio Ribeira de Iguape e *P. gracilis* da bacia do rio Paraguai.

	<i>P. lateristriga</i> bacia Litorânea					<i>P. kronei</i> bacia Ribeira de Iguape				<i>P. gracilis</i> bacia do Paraguai					
	n	Min - Máx	Média	DP		n	Min - Máx	Média	DP	n	Min - Máx	Média	DP		
Comprimento padrão (mm)	37	36,85	95,3	45,03	11,2	2	38,21	45,76	41,99	5,34	10	59,16	135,8	97,00	25,14
Porcentagem Comprimento padrão															
Altura do corpo (dorsal)	37	12,54	19,64	14,86	1,20	2	14,93	15,76	15,34	0,59	10	14,61	18,31	16,36	1,06
Largura do corpo (dorsal)	37	9,98	14,44	11,94	0,97	2	12,24	12,30	12,27	0,04	10	13,03	17,00	14,58	1,22
Largura cleitral	37	16,30	19,34	17,47	0,82	2	18,08	19,06	18,57	0,69	10	17,08	19,86	18,50	0,80
Comprimento da cabeça	37	28,41	35,53	31,04	1,44	2	28,82	29,47	29,15	0,46	10	18,54	22,87	21,19	1,33

Comprimento barbilhão maxilar (E)	37	48,59	70,09	60,34	5,49	2	71,90	79,40	75,65	5,31	10	74,98	109,1	89,74	9,61
Comprimento externo do barbilhão mental (E)	37	19,39	27,87	24,34	2,01	2	12,48	14,63	13,55	1,52	10	4,28	40,66	32,58	10,2
Comprimento interno do barbilhão mental (E)	37	10,04	16,00	13,46	1,26	2	20,37	20,94	20,65	0,40	10	16,10	23,67	21,65	2,29
Comprimento pré-dorsal	37	29,95	37,39	34,08	1,90	2	34,44	34,70	34,57	0,19	10	29,70	32,39	31,15	1,09
Distância entre a ponta do focinho e a extremidade final da base da nadadeira dorsal	37	45,25	51,95	47,78	1,49	2	46,72	48,70	47,71	1,40	10	44,40	48,57	46,37	1,28
Distância entre a ponta do focinho e a ponta distal da nadadeira dorsal	37	56,63	62,52	58,78	1,34	2	58,76	60,46	59,61	1,20	9	53,00	59,42	56,37	2,08
Nadadeira dorsal a nadadeira adiposa	37	7,20	16,90	13,14	2,15	2	8,53	8,57	8,55	0,02	10	5,02	9,54	6,60	1,37
Base da nadadeira dorsal	37	12,46	20,91	14,38	1,54	2	11,87	15,62	13,75	2,66	10	15,10	42,70	19,79	8,70
Comprimento do primeiro raio da nadadeira dorsal (não ramificado)	36	17,69	25,78	21,07	1,63	2	20,39	21,02	20,70	0,44	9	17,00	23,92	22,03	2,16
Comprimento da parte rígida do primeiro raio da nadadeira dorsal	37	14,58	19,00	16,57	1,07	2	13,81	14,68	14,25	0,62	9	15,23	23,42	17,47	2,68
Comprimento do segundo raio da nadadeira dorsal (primeira ramificação)	37	18,29	28,87	22,94	1,97	2	19,89	21,39	20,64	1,06	9	19,54	24,75	22,80	1,58
Comprimento do terceiro raio da nadadeira dorsal (segunda ramificação)	37	18,40	30,23	23,20	2,23	2	21,62	22,01	21,81	0,27	9	20,62	23,99	22,66	1,15
Comprimento pré-peitoral	37	22,87	27,12	24,89	1,11	2	26,66	27,69	27,17	0,73	10	20,34	25,54	22,51	1,81
Distância entre a ponta do focinho e a extremidade da base da nadadeira peitoral	37	24,23	28,27	26,77	1,09	2	28,54	28,71	28,62	0,12	10	21,13	42,05	27,94	6,73
Distância entre a ponta do focinho e a ponta distal da nadadeira peitoral	37	38,73	46,36	43,16	1,63	2	42,87	43,77	43,32	0,64	10	36,91	43,97	41,15	2,24
Comprimento do primeiro raio da nadadeira peitoral esquerda (não ramificado)	37	14,70	25,10	19,26	1,85	2	16,94	18,40	17,67	1,03	10	17,02	24,23	19,73	2,14
Comprimento da parte rígida do primeiro raio da nadadeira peitoral esquerda	37	12,83	19,80	15,98	1,39	2	13,66	15,99	14,82	1,65	10	15,36	20,19	16,74	1,34
Comprimento do segundo raio da nadadeira peitoral esquerda (primeira ramificação)	37	14,25	25,93	19,09	2,09	2	17,50	18,61	18,06	0,78	10	16,18	21,49	18,21	1,61
Comprimento do terceiro raio da nadadeira peitoral esquerda (segunda ramificação)	37	13,27	26,50	18,16	2,21	2	18,20	19,24	18,72	0,73	10	14,34	20,60	16,77	1,84
Comprimento pré-pélvico	37	42,78	50,21	46,21	1,92	2	46,59	48,42	47,50	1,29	10	42,90	45,61	44,20	1,00
Distância entre a ponta do focinho e a base da nadadeira pélvica	37	45,14	63,50	49,16	3,58	2	48,34	49,20	48,77	0,61	10	24,81	63,25	46,53	9,31

Distância entre a ponta do focinho e a ponta distal da nadadeira pélvica	37	49,79	66,86	60,95	2,71	2	62,61	65,04	63,82	1,72	10	57,76	63,41	61,13	1,91
Distância entre as nadadeiras pélvicas	37	3,00	4,74	3,85	0,44	2	3,14	3,89	3,52	0,53	10	4,63	6,54	5,33	0,57
Comprimento do primeiro raio da nadadeira pélvica esquerda (não ramificado)	36	10,67	15,62	12,88	1,05	2	12,46	13,82	13,14	0,96	10	12,66	16,09	13,84	1,01
Comprimento do segundo raio da nadadeira pélvica esquerda (primeira ramificação)	37	12,49	17,44	14,49	1,06	2	13,64	15,41	14,53	1,26	10	14,19	17,63	15,35	0,97
Comprimento do terceiro raio da nadadeira pélvica esquerda (segunda ramificação)	37	12,04	17,71	14,95	1,22	2	14,86	17,01	15,94	1,52	10	13,65	17,76	16,06	1,38
Base da nadadeira anal	37	9,36	16,40	12,93	1,47	2	12,43	15,76	14,09	2,35	10	9,67	13,71	12,21	1,22
Comprimento pré-anal	37	63,16	71,81	67,91	2,23	2	66,89	68,38	67,64	1,05	10	64,38	79,31	69,06	4,65
Distância entre a ponta do focinho e a extremidade da base da nadadeira anal	37	74,47	83,98	79,93	1,90	2	79,92	80,21	80,07	0,21	10	77,58	88,22	79,58	3,19
Distância entre a ponta do focinho e a ponta distal da nadadeira anal	37	82,23	91,28	87,56	2,07	2	88,96	89,82	89,39	0,60	10	84,32	94,68	87,68	2,76
Comprimento da nadadeira adiposa	37	18,23	33,92	25,53	2,42	2	27,25	31,27	29,26	2,85	10	38,25	52,40	43,60	4,08
Comprimento pré-adiposo	37	55,65	67,12	61,85	2,41	2	55,98	56,05	56,02	0,05	10	49,70	54,77	52,15	1,75
Distância entre a ponta do focinho e a extremidade da base da nadadeira adiposa	37	76,48	88,99	86,25	2,35	2	84,44	86,31	85,38	1,32	10	87,78	94,99	91,58	2,10
Altura da nadadeira adiposa	37	0,40	4,35	3,43	0,70	2	3,78	4,32	4,05	0,38	10	3,42	5,27	4,25	0,50
Comprimento do pedúnculo caudal	37	8,08	14,25	10,87	1,22	2	8,04	8,35	8,20	0,22	10	5,81	9,72	7,50	1,32
Altura do pedúnculo caudal	37	6,38	7,91	7,01	0,44	2	7,14	7,41	7,28	0,19	10	6,89	8,83	7,66	0,58
Distância focinho-ânus	37	46,99	56,85	52,14	2,11	2	52,53	53,43	52,98	0,64	10	50,79	54,99	52,71	1,44
Distância focinho-papila urogenital	37	51,24	59,62	55,25	2,28	2	55,57	55,77	55,67	0,14	10	53,70	59,20	55,97	1,59
Distância anus papila urogenital	37	1,91	5,16	3,12	0,71	2	2,36	2,45	2,40	0,07	10	1,80	3,98	2,90	0,78
Comprimento do lobo dorsal da nadadeira caudal	33	20,43	27,38	24,10	1,57	2	24,63	25,67	25,15	0,74	7	20,76	30,24	24,93	3,35
Comprimento do lobo ventral da nadadeira caudal	36	20,84	26,45	23,85	1,20	2	24,71	25,24	24,97	0,38	8	22,08	29,66	24,33	2,45
Porcentagem Cabeça															
Altura da cabeça	37	36,87	51,36	44,33	2,77	2	50,27	50,80	50,53	0,37	10	60,00	86,69	66,58	7,43
Largura da cabeça	37	45,37	58,90	51,62	2,90	2	58,17	59,67	58,92	1,06	10	74,28	98,27	82,05	6,41

Diâmetro do olho (E)	37	16,60	22,30	19,33	1,07	2	18,04	20,34	19,19	1,62	10	21,56	27,24	23,74	2,10
Largura do Interorbital carnosos	37	24,94	36,93	31,99	2,62	2	32,30	33,84	33,07	1,09	10	31,85	43,03	36,49	3,79
Largura do osso Interorbital	37	16,58	21,86	18,74	1,41	2	18,95	19,80	19,38	0,60	10	21,70	33,55	26,49	3,18
Boca largura (inclui lábios)	37	26,47	36,19	30,28	1,76	2	34,34	35,26	34,80	0,65	10	47,58	57,89	50,87	3,31
Comprimento focinho (E)	37	27,93	36,02	32,50	1,87	2	34,37	35,10	34,74	0,52	10	44,60	50,25	47,93	2,35
Distância entre a ponta do focinho e a narina posterior (E)	37	16,18	24,35	20,86	1,70	2	22,02	23,50	22,76	1,04	10	23,53	34,46	26,80	3,03
Largura entre as narinas anterior	37	12,41	18,30	15,19	1,28	2	16,98	18,38	17,68	0,99	10	17,44	24,52	20,06	2,40
Largura entre as narinas posterior	37	14,38	19,90	17,07	1,17	2	19,11	20,25	19,68	0,81	10	19,59	26,53	21,82	2,04
Comprimento intranarial (E)	37	11,82	16,09	14,38	1,01	2	16,70	18,04	17,37	0,95	10	14,11	22,15	17,97	2,41

Análise dos componentes principais (PCA). Foram analisados ao total, 102 exemplares, e excluídos da análise 13 *outliers* (Figura 6). Logo, ficaram 41 *Pimelodella* sp. (bacia do alto rio Iguaçu); 8 *P. meeki* (bacia do rio Tibagi); 29 *P. lateristriga* (bacia Litorânea); 2 *P. kronei* (bacia do rio Ribeira de Iguape) e 9 *P. gracilis* (bacia do rio Paraguai). O PC 1 apresentou um autovalor que explica 73% dos dados, o PC 2 com 4,5%; e PC 3 com 2,6% de explicação dos dados, sendo os componentes com maiores influências para a análise.

Na análise usamos os valores de PC 2 no eixo x, e PC 3 no eixo y, uma vez que são os eixos que representam a forma. O gráfico de dispersão (figura 6), mostra as separações dos grupos analisados, identificados por cores. O único grupo que se separa morfometricamente dos demais foi *P. gracilis*, e um único indivíduo de *P. kronei*. Os demais grupos ficaram sobrepostos, *P. lateristriga* com os grupos de *P. meeki* e *Pimelodella* sp.

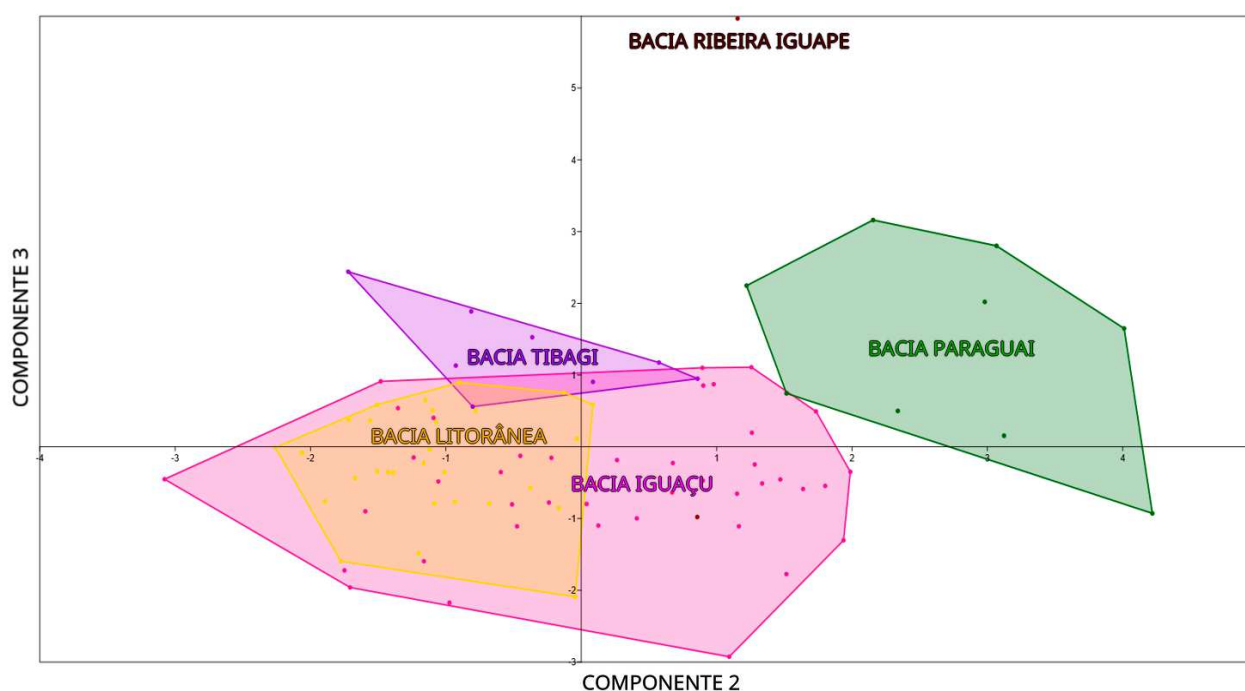


Figura 6. Gráfico de dispersão (*Scatter Plot*) resultado da Análise dos Componentes Principais (PCA) com base nas 56 variáveis morfométricas. Em verde, *P. gracilis* da bacia do rio Paraguai; amarelo, *P. lateristriga* da bacia Litorânea; marrom, *P. kronei* da bacia do rio Ribeira de Iguape; rosa *Pimelodella* sp., da bacia do alto rio Iguaçu; roxo, *P. meeki* da bacia do rio Tibagi.

Distância genética. A distância genética entre os grupos de *Pimelodella* estão presentes na Tabela 6. Considerando o valor de corte de 2%, separam-se três MOTUs sendo *Pimelodella* sp. e as *P. meeki* (Tietê e Tibagi) como um grupo, *P. gracilis* como outro grupo, e os exemplares de *P. lateristriga* das diferentes bacias no terceiro grupo.

Os espécimes de *P. meeki* da bacia do alto rio Tietê (localidade-tipo, *GenBank*) apresentaram distância genética de 1,4% em relação a *Pimelodella* sp. da bacia do alto rio Iguaçu e de *P. meeki* da bacia do rio Tibagi. Já *Pimelodella* sp. do rio Iguaçu se diferenciou em 1,8% das *P. meeki* do rio Tibagi, em 11,1% de *P. lateristriga* da localidade-tipo (bacia do rio Paraíba do Sul, *GenBank*), e em 10,6% da bacia Litorânea e do Ribeira de Iguape. A distância genética entre *P. gracilis* e *P. meeki* do alto rio tietê (ambas retiradas do *GenBank*) foi de 2,1%, entre *P. gracilis* e *P. lateristriga* da bacia do rio Paraíba do Sul foi de 10,6% e de *P. gracilis* com a bacia Litorânea e Ribeira de Iguape foi de 10,2%.

Tabela 6. Distância genética entre os grupos de *Pimelodella* utilizando o marcador COI e o modelo K2P realizado no programa *MEGA* v.6. Os números em negrito na diagonal representam a distância intra-amostra, os números abaixo da linha diagonal em vermelho as distâncias entre as amostras, e os números acima da linha diagonal em azul, o erro padrão.

	1	2	3	4	5	6
1. <i>Pimelodella</i> sp. do alto rio Iguaçu	0,0	0,6	0,6	0,7	1,6	1,6
2. <i>P. meeki</i> do rio Tietê	1,4	0,0	0,6	0,6	1,6	1,5
3. <i>P. meeki</i> do rio Tibagi	1,8	1,4	0,0	0,7	1,6	1,6
4. <i>P. gracilis</i> do baixo rio Paraná	2,5	2,1	2,5	0,0	0,6	1,5
5. <i>P. lateristriga</i> Litorânea e rio Ribeira do Iguape	10,6	10,0	10,6	10,3	0,0	0,4
6. <i>P. lateristriga</i> do rio Paraíba do Sul	11,1	10,3	11,4	10,6	1,1	1,4

ABGD, mPTP e GMYC. A análise está apresentada na Figura 7, o método GYMC resultou em cinco MOTUs (unidades taxonômicas operacionais), entre as quais *P. meeki* do Tietê e Tibagi em um grupo, e *Pimelodella* sp. em outro. A mesma análise apresentou um MOTU correspondente a *P. gracilis* e dois MOTUS para *P. lateristriga* (Ribeira de Iguape e bacia Litorânea em um grupo e Paraíba do Sul em outro). A análise baseada em ABGD e mPTP recuperaram sete MOTUs igualmente, considerando *Pimelodella* sp., *P. meeki* do Tietê, *P. meeki* do Tibagi e *P. gracilis* como pertencentes a espécies diferentes, além de diferenciarem as *P. lateristriga* da bacia Litorânea e Ribeira de Iguape, dos dois exemplares de *P. lateristriga* da bacia do Paraíba do Sul. As sequências de *P. lateristriga* da mesma bacia hidrográfica, Paraíba do Sul, obtidas de bancos de dados, que indicaram duas espécies distintas, podem sinalizar erros na identificação da espécie. Entretanto, essa investigação não será desenvolvida neste trabalho por fugir do foco principal.

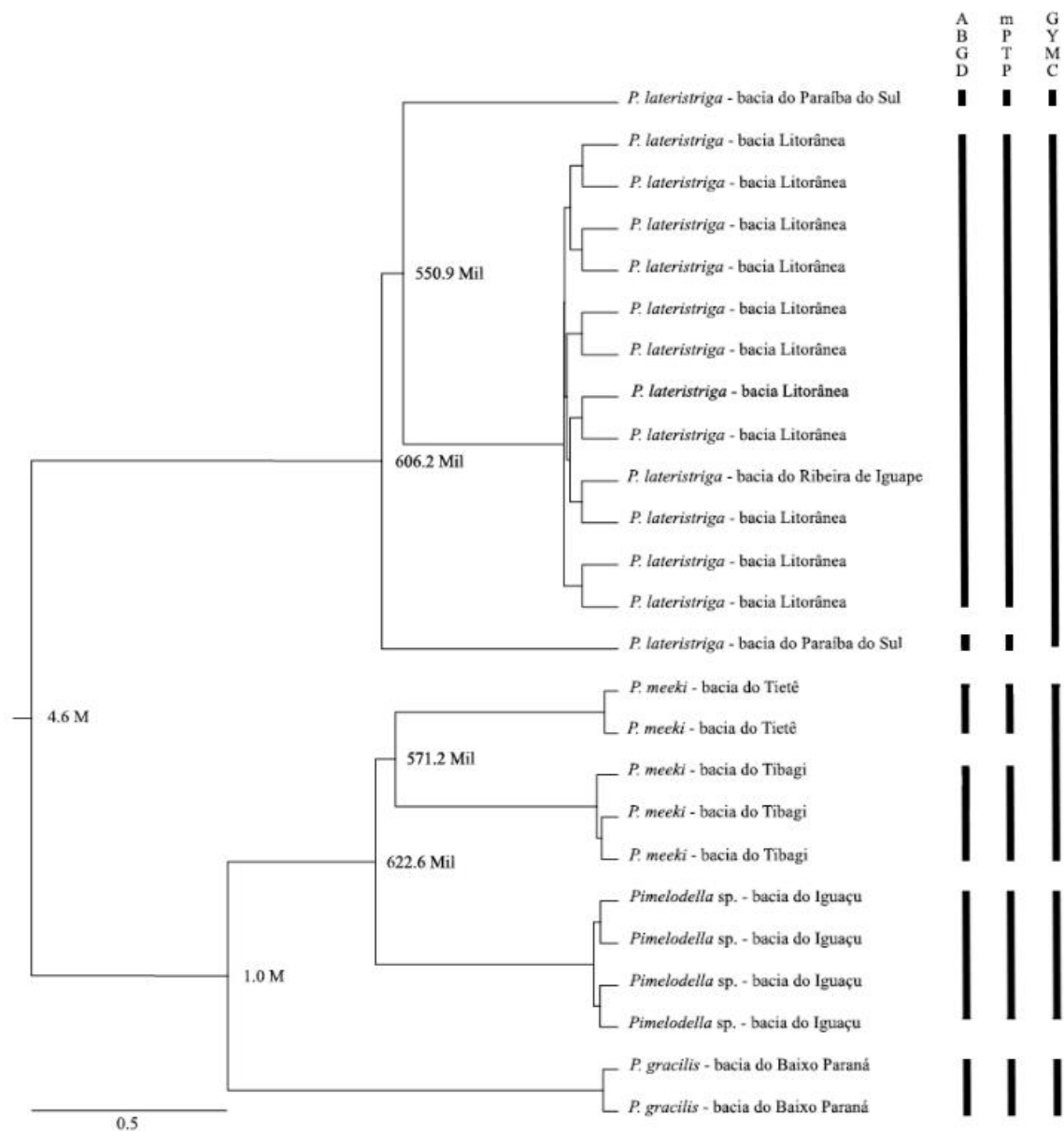


Figura 7. Árvore filogenética bayesiana com base na sequência do gene COI (*DNA Barcode*) e numa análise de Máxima Verossimilhança. À direita da figura, os resultados das análises de delimitação de espécies através do GMYC, mPTP e ABGD.

Relógio molecular. O gene COI analisado neste estudo com a taxa de mutação de 1% a cada milhão de anos, aponta que o isolamento geográfico das populações de *P. aff. meeki* do rio Iguaçu e *P. meeki* do alto rio Paraná ocorreu em um período de aproximadamente 622,6 a 571,2 mil anos. A separação com *P. gracilis* ocorreu a aproximadamente um milhão de anos e de *P. lateristriga* há cerca de 4,6 milhões (Figura 7).

DISCUSSÃO

Várias características morfológicas e merísticas encontradas nos espécimes de *Pimelodella* coletados no rio Iguaçu e no rio Tibagi são consistentes com a descrição de *Pimelodella meeki* do rio Tietê realizada por Slobodian (2017). Ambas compartilham uma faixa dorsolateral moderadamente larga, coloração escura abaixo da nadadeira dorsal, barbilhão maxilar alcançando entre o início da nadadeira pélvica e o início da nadadeira anal, espinho da nadadeira peitoral com formato reto, nadadeira peitoral com sete raios ramificados, lobo dorsal da nadadeira caudal ligeiramente mais longo que a ventral, e faixa dorsolateral emparelhada ao longo processo supraoccipital. Entretanto, a análise das manchas ao longo do corpo evidenciou um padrão com maior semelhança entre os espécimes das bacias do alto rio Iguaçu e do rio Tibagi, que em comparação com os indivíduos do rio Tietê, localidade-tipo de *P. meeki*. Observou-se também diferença na quantidade de raios da nadadeira peitoral (somente o holótipo apresentou 8 raios ramificados), indicando possíveis adaptações locais e influências ambientais nas diferentes bacias. Além disso, os indivíduos da bacia do rio Iguaçu apresentaram diferenças na quantidade vertebral em relação aos espécimes de *P. meeki* da localidade-tipo. Dos 37 exemplares analisados, cinco apresentaram 42 vértebras totais (vs. 40-41 da bacia do rio Tietê), demonstrando um intervalo intraespecífico de até três vértebras, também sugerindo possíveis influências ambientais atuantes nas diferentes bacias, como já observado para outras espécies (Dentry & Lindsey, 1977; Lindsey, 1981; Bosley & Conner, 1984; Frank, 1991; Kozhara *et al.*, 1996).

A contagem total de vértebras mostrou sobreposição com os espécimes dos rios Iguaçu e Tibagi, e com *P. kronei* e *P. lateristriga*, como já observado por Slobodian (2017). Segundo Mees (1983) e Bockmann & Slobodian (2013) caracteres morfológicos podem apresentar sobreposições interespecíficas, especialmente quando são espécies próximas geograficamente. Entretanto, *P. gracilis* destacou-se por ser a mais divergente morfometricamente e morfologicamente das demais espécies, com 45 a 47 vértebras totais (vs. 40 a 42 nas outras espécies analisadas). *Pimelodella gracilis* ainda divergiu molecularmente de *P. meeki* do Iguaçu e do rio Tietê, apresentando distância genética de 2,5% e 2,1%, respectivamente, ultrapassando o limite sugerido como valor de corte de 2,0% para delimitação de espécies (Hubert *et al.*, 2007; Carvalho, 2011; Pereira *et al.*, 2011).

As diferenças morfológicas sutis, e a distribuição geográfica entre *P. meeki* da

localidade-tipo, na bacia do rio Tietê, com exemplares coletados na bacia do rio Iguaçu e na bacia do rio Tibagi, sugerem que podemos estar tratando de espécies incipientes (grupos relacionados, mas isolados geograficamente a ponto de interromperem o fluxo gênico entre eles até se diferenciarem em alopatria da espécie ancestral (Mayr, 1942, 1963)).

Essa hipótese é suportada pelos resultados obtidos com o ABGD e mPTP que separaram os espécimes de *Pimelodella* das bacias dos rios Tietê, Iguaçu e Tibagi, em espécies diferentes. Os resultados do GYMC aproximaram os exemplares de *P. meeki* do Tibagi com os do Tietê, o que é coerente com a proximidade geográfica das cabeceiras (Ribeiro, 2006), e separou *P. meeki* do Iguaçu como espécie diferente.

As divergências genéticas entre *P. meeki* da bacia do rio Tietê com os espécimes do Iguaçu (1,4%) e Tibagi (1,4%), e entre *P. meeki* do Iguaçu com Tibagi (1,8%) e a ausência de divergência intraespecífica, também são indicativos do possível processo de especiação, o que coaduna com a complexidade taxonômica e as dificuldades na delimitação das espécies de *Pimelodella* (Slobodian, 2017).

É importante ressaltar que antes de definir um limite de distância genética entre espécies devem ser consideradas outras características do táxon estudado, como sua história evolutiva, diversidade de espécies dentro do gênero (Pereira *et al.*, 2013) e a variação da taxa de diferenciação do gene COI entre espécies (Ward *et al.*, 2009), sendo esse valor apenas um ponto de partida para investigar a divergência entre as linhagens. Moritz & Cícero (2004) argumentam que para uma análise precisa seria necessária uma baixa variação intraespecífica em comparação com a interespecífica, de modo que uma curta sequência de *DNA* permitiria a alocação precisa de um indivíduo a um táxon descrito. Meyer & Paulay (2005) corroboram que a precisão da análise depende especialmente da extensão e da separação entre a variação intraespecífica e a divergência interespecífica no marcador selecionado. Neste sentido, apesar das distâncias de 1,4%, entre *P. meeki* e os indivíduos coletados nos rios Iguaçu e Tibagi, serem abaixo de 2,0%, ainda observa-se um “*barcoding gap*” considerável, uma vez que não há divergências intrapopulacionais observadas.

Há casos semelhantes com o observado em *P. gracilis* e *P. meeki* do Tietê na literatura, para os gêneros *Brachyplatystoma* e *Hypophthalmus*, que também possuem características morfológicas distintas, porém os valores de divergência genética interespecífica ficam próximos e abaixo de 2,0% (Batista, 2017).

Embora as análises filogenéticas indiquem a existência de duas ou três linhagens de *P. meeki*, as semelhanças morfológicas e genéticas não são suficientes para considerá-las como espécies distintas. Primeiramente, as diferenças morfológicas que separam estas linhagens são sutis, e as diferenças intraespecíficas no número vertebral estão dentro do limite de até três vértebras para o gênero conforme definido por Slobodian (2017). E não houve consenso no resultado das diferentes análises de delimitação de espécies, desenvolvidas a partir do uso de um único marcador.

Além disso, a datação realizada neste estudo para a formação das linhagens, de aproximadamente 600 mil anos, não suporta a hipótese de especiação plena, sendo respaldado por Rull (2008) e Albert & Reis (2011), que afirmam que a maior parte da ictiofauna neotropical divergiu entre 3,0 e 10 milhões de anos atrás.

A separação das populações de *Pimelodella meeki* provavelmente resulta de capturas recentes de riachos, que podem ocorrer com maior frequência nas cabeceiras do que ao longo dos corpos dos rios principais (Carvalho, 2011). A hipótese mais plausível para a presença da espécie na bacia do alto rio Iguaçu é a ocorrência de uma captura da bacia do alto rio Tibagi. Assim, essa separação geográfica recente pode ter contribuído para as pequenas diferenças morfológicas e diferenças moleculares observadas entre as populações analisadas, e corrobora com a hipótese da ausência de fluxo gênico que pode permitir o aparecimento e estabelecimento de características distintas e desencadear o processo de especiação (Johnson & Black, 1998; Pogson, 2001; Planes & Fauvelot, 2002). Do ponto de vista genético a especiação causada pelo isolamento reprodutivo é uma propriedade de poucos locos individuais ou regiões genômicas, e não do genoma como um todo (Lexer & Widmer, 2008; Qvarnström & Bailey, 2009).

CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo ressalta a complexidade da taxonomia e sistemática dos peixes neotropicais, com foco especial no desafio da delimitação das espécies dentro do gênero *Pimelodella*. Apesar dos esforços de diversos pesquisadores ao longo do tempo, lacunas persistentes ainda desafiam a compreensão da distribuição e diferenciação das espécies, como evidenciado pela análise morfológica, merística e molecular realizada. A variação observada nas características morfológicas e

genéticas entre populações de *P. meeki* das bacias dos rios Iguaçu, Tibagi e Tietê sugere um possível processo de especiação em andamento. Além disso, a contagem de vértebras e as análises genéticas revelaram padrões complexos de divergência entre as populações, indicando a necessidade de uma abordagem integrada que considere não apenas a genética, mas também a morfologia e o contexto geográfico. Em última análise, este estudo enfatiza a necessidade de abordagens integradas e multidisciplinares para entender a evolução e a diversidade biológica, especialmente em grupos taxonômicos complexos como *Pimelodella*. Finalmente, o presente estudo, por meio da análise morfológica, merística e da técnica de *DNA barcode*, identificou os espécimes de peixes coletados nas bacias dos rios Iguaçu e Tibagi como *Pimelodella meeki* em especiação incipiente. São populações diferenciadas sutilmente, e com um histórico de evolução recente e independente.

REFERÊNCIAS

Albert JS, Reis RE. Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes. Berkeley, CA. University of California Press. 2011; 51: 27-53. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-011620-031032>

Aleixo A. Conceitos de espécie e o eterno conflito entre continuidade e operacionalidade: uma proposta de normatização de critérios para o reconhecimento de espécies pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. Revista Brasileira de Ornitologia. 2007; 15: 229-242.

Arratia G. Catfish head skeleton - an overview. In: G. Arratia, BG. Kapoor, M. Chardon & R. Diogo, editors. Catfishes. Vol. 1. Enfield, NH: Science Publishers. 2003a; 3–46.

Arratia G. The siluriform postcranial skeleton – an overview. In G. Arratia BG. Kapoor M Chardon & R Diogo, editors. Catfishes. Vol. 1. Enfield, NH: Science Publishers. 2003b; 121-157.

Batista ET. Código de barras de DNA (DNA Barcode) de espécies de bagres (Ordem Siluriformes) de valor comercial da Amazônia brasileira. Dissertação de Mestrado.

Universidade do Estado do Amazonas, Manaus. 2017. Disponível em: <http://repositorioinstitucional.uea.edu.br//handle/riuea/2349>

Bockmann FA, Slobodian V. Heptapteridae. In: Queiroz, L.J., Torrente-Vilara G., Ohara WM., Silva THP, Zuanon J., Doria CRC. (Eds.) Peixes do rio Madeira. 2013; Vol. 3. Dialetto, São Paulo, 12–71.

Bockmann FA, Castro RMC. The blind catfish from the caves of Chapada Diamantina, Bahia, Brazil (Siluriformes: Heptapteridae): description, anatomy, phylogenetic relationships, natural history, and biogeography. *Neotropical Ichthyology*. 2010; 8 (4), 673–706. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252010000400001>

Bockmann FA, Miquelarena AM. Anatomy and phylogenetic relationships of a new catfish species from northeastern Argentina with comments on the phylogenetic relationships of the genus *Rhamdella* Eigenmann and Eigenmann 1888 (Siluriformes, Heptapteridae). *Zootaxa*. 2008; 1780:1–54. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1780.1.1>

Bortolus, A. Error cascades in the biological sciences: the unwanted consequences of using bad taxonomy in ecology. *AMBIO: A journal of the human environment*, 2008; 37(2): 114-118. [https://doi.org/10.1579/0044-7447\(2008\)37\[114:ECITBS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1579/0044-7447(2008)37[114:ECITBS]2.0.CO;2)

Bosley TR, Conner JV. Geographic and temporal variation in numbers of myomeres in fish larvae from the lower Mississippi river. *Am. Fisher. Soc.* 1984; 113:23 8-242. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1984\)113<238:GATVIN>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1984)113<238:GATVIN>2.0.CO;2)

Bouckaert RR, Drummond AJ. bModelTest: Bayesian phylogenetic site model averaging and model comparison. *BMC evolutionary biology*. 2017; 17(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0890-6>

Carvalho PH. Análises filogenéticas e filogeográficas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2011. <https://doi.org/10.11606/T.41.2011.tde-23092011-112658>

Dagosta FCP, Monção MS, Nagamatsu BA, Pavanelli CS, Carvalho FR, Lima FC, Pinna MD. Fishes of the upper rio Paraná basin: diversity, biogeography and conservation. *Neotropical Ichthyology*. 2024; 22, e230066. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2023-0066>

Dentry W, Lindsey CC. Vertebral variation in zebrafish (*Brachydanio rerio*) related to the prefertilization temperature history of their parents. *Can. J. Zool.* 1977; 56:28 0-283. <https://doi.org/10.1139/z78-037>.

Durand JD, Hubert N, Shen KN, Borsa, P. DNA barcoding grey mullets. *Reviews in fish biology and fisheries*. 2017; 27, 233-243.

Edgar RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*. 2004; 5:113. 32(5):1792–1797. 10.1093/nar/gkh340.

Eigenmann CH. *Pimelodella* and *Typhlobagrus*. Memoirs of the Carnegie Museum. 1917; 229–258 56: 690–703.

Frank KT. Predictiment variation from year class specific vertebral counts: an analysis of the potencial and a plan for verification. Can. J. Fish. 1991; Aquat. Sci., 48:1350-1357. <https://doi.org/10.1139/f91-161>

Guazzelli GM. Revisão das Espécies de *Pimelodella* Eigenmann & Eigenmann, 1888 (Teleostei: Siluriformes: *Pimelodidae*) dos Sistemas Costeiros do Sul e Sudeste Brasileiro. Unpublished Master Dissertation, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 150 pp. 1997.

Hajibabaei M, Dewaard JR, Ivanova NV, Ratnasingham S, Dooh RT, Kirk SL, Hebert PD. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2005; 360 (1462), 1959-1967. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1727>.

Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica. 2001; 4, (1): 1.

Hey J, RS Waples, ML Arnold, RK Butlin, RG Harrison. Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation. Trends in Ecology and Evolution. 2003; 18: 597-603. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.08.014>

Hubert N, Duponchelle F, Nuñez J, Garcia-Davila C, Paugy DE, Renno JF. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. Molecular Ecology. 2007; 16(10): 2115–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03267.x>.

Johnson, MS, Black R. Effect of isolation by distance and geographical discontinuity on genetic subdivision of *Littorina cingulata*. Mar. Biol. 1998; 132: 295-303.

Jolicouer P, Mosimann JE. Size and shape variation in the painted turtle. A principal component analysis. Growth. 1960; 24(4): 339-354.

Junier T, Zdobnov E. M. The Newick utilities: high-throughput phylogenetic tree processing in the UNIX shell. Bioinformatics. 2010; 26(13), 1669-1670. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq243>.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol. 1980; 16:111–20. <https://doi.org/10.1007/bf01731581>

Kozhara AV, Izyumov YG, Kas'yanov AN. General and geographic variation of the vertebral numbers in some freshwater fish. J. Ichthyol. 1996; 36(3):223-237.

Lexer C, Widmer A. The genic view of plant speciation: recente progress and emerging questions. Philosophical Transactions of the Royal Society B. 2008; United Kingdom 363: 3023-3036. <http://dx.doi.org/doi:10.1098/rstb.2008.0078>

Lindsey CC. A model for responses of vertebral numbers in fish to environmental influences during development. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1981; 38:3 34-347.

Lucinda PHF. Systematics and biogeography of the genus *Phalloceros* Eigenmann, 1907 (Cyprinodontiformes: *Poeciliidae*: *Poeciliinae*), with the description of twenty-one new species. *Neotropical Ichthyology*. 2008; 6(2):113-158.

Mayr E. *Systematics and the Origin of Species*. New York: Columbia University Press. 1942.

Mayr E. *Animal species and evolution*. Cambridge: Harvard University. 1963.

Mees GF. Naked catfishes from French Guiana (Pisces, Nematognathi). *Zoologische Mededelingen*. 1983; 57: 43- 58.

Meyer CP, Paulay G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS biology*. 2005; 3(12): e422. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030422>

Moritz C, Cicero C. 2004. DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS biology*. 2004; 2(10): e354. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020354>

Nirchio M, Paim FG, Milana V, Rossi AR, Oliveira C. Identification of a new mullet species complex based on an integrative molecular and cytogenetic investigation of *Mugil hospes* (Mugilidae: Mugiliformes). *Frontiers in Genetics*. 2018 5; 9: 17. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00017>

Padial JM, Miralles A, De La Riva I, Vences M. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in zoology*. 2010; 7(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-7-16>

Pereira LHG, Maia GMG, Hanner R, Foresti F, Oliveira, C. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA*. 2011; 22, 71–79. doi:10.3109/19401736.2010.532213.

Pereira LHG, Hanner R, Foresti F, Oliveira C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genet*. 2013; 14(20). <https://doi.org/10.1186/1471-215614-20>

Peres-Neto PR. Introdução a análises morfométricas. In: Peres-Neto, P.R., Valentin, J.L. & Fernandez, F. (Eds.), *Tópicos em Tratamento de Dados Biológicos*. 1995; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 57–89. <https://doi.org/10.4257/oeco.1995.0201.03>

Planes S, Fauvelot C. Isolation by distance and vicariance drive genetic structure of a coral reef fish in the Pacific Ocean. *Evolution*. 2002; Feb;56(2):378-99. doi: 10.1111/j.0014-3820.2002.tb01348.x. PMID: 11926506.

Pogson GH. 2001. Isolation by distance in the Atlantic cod, *Gadus morhua*, at large and small geographical scales. *Genetics*. 2001; Jan;157(1):317-30. doi: 10.1093/genetics/157.1.317. PMID: 11139512; PMCID: PMC1461473

Queiroz K. The General Lineage Concept of Species and the Defining Properties of the Species Category. In: Species, New Interdisciplinary Essays (ed Wilson R. A.). 1999; 49–89. Bradford/MIT Press, Palatino/Hong Kong.

Queiroz K. Ernst Mayr and the modern concept of species. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005; 102: 6600-6607. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502030102>

Qvarnström A, Bailey RI. Speciation through evolution of sex-linked genes. Heredity. 2009; 102: 4-15. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.93>

Reis SF. Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva. Revista Brasileira de Zoologia. 1988; 5, 571-580.

Ribeiro AC. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. Neotropical ichthyology. 2006; 4, 225-246. DOI: 10.1590/1982-0224-20180033

Ribolli J, Zaniboni FE, Scaranto BMS, Shibatta OA, Machado CB. Cryptic diversity and diversification processes in three cis-Andean *Rhamdia* species (Siluriformes: Heptapteridae) revealed by DNA barcoding. 2021; 44(3):e20200470. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2020-0470>

Rull V. Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. Trends in Ecology & Evolution. 2011; 26(10), 508–513. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.05.011>

Sabaj MH. Standard symbolic codes for institutional resource collections in herpetology and ichthyology. Version 6.5 [Internet]. 2016; Washington, D. C.: American Society of Ichthyologists and Herpetologists; Available from: <http://www.asih.org>.

Shibatta OA, Orsi ML, Bennemann ST, Silva-Souza, AT. Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. A bacia do rio Tibagi. 2002; 1, 403–424.

Sites Jr, Jack W, Marshall J. C. Operational criteria for delimiting species. Annual Review of Ecology. 2004; Evolution, and Systematics, 35(1), 199–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.35.1>

Slobodian V, Bockmann FA. A new *Brachyrhamdia* (Siluriformes: Heptapteridae) from Rio Japurá basin, Brazil, with comments on its phylogenetic affinities, biogeography and mimicry in the genus. Zootaxa. 2013; 3717(1):1-22

Slobodian V, Akama A, Dutra GM. A new species of *Pimelodella* (Siluriformes: Heptapteridae) from the Guiana Shield, Brazil. Zootaxa. 2017; 4338(1):85–100. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4338.1.4>

Slobodian V. Taxonomic revision of *Pimelodella* Eigenmann & Eigenmann, 1888 (Siluriformes: Heptapteridae): an integrative proposal to delimit species using a multidisciplinary strategy. [PhD Thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2017.

Slobodian V, Pastana MNL. Description of a new *Pimelodella* (Siluriformes: Heptapteridae) species with a discussion on the upper pectoral girdle homology of Siluriformes. *J Fish Biol.* 2018; 93(5):901–16. <https://doi.org/10.1111/jfb.13795>

Souza-Shibatta L, Pezenti LF, Ferreira DG, Almeida FS, Sofia SH, Shibatta OA. Cryptic species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes: Heptapteridae) from the Miranda River, Paraguay River basin, Pantanal of Mato Grosso do Sul, Central Brazil. *Neotrop Ichthyol.* 2013; 11(1):101–09. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252013000100012>

Takako AK, C Oliveira, OT Oyakawa. Revision of the genus *Pseudotocinclus* (Siluriformes: Loricariidae: *Hypoptopomatinae*), with descriptions of two new species. *Neotropical Ichthyology.* 2005; 3(4):499-508. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252005000400007>

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution.* 2011; 28(10), 2731-2739. DOI: 10.1093/molbev/msr121

Thomaz AT, Malabarba LR, Bonatto SL, Knowles LL. Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: study of a Neotropical fish of the Brazilian coastal Atlantic Forest. *Journal of Biogeography.* 2015; 42(12), 2389-2401. <https://doi.org/10.1111/jbi.12597>

Torres RA, Ribeiro J. The remarkable species complex *Mimagoniates microlepis* (Characiformes: Glandulocaudinae) from the Southern Atlantic Rain forest (Brazil) as revealed by molecular systematic and population genetic analyses. *Hydrobiologia,* 2008; 617(1):157-70.

Vanscoy T, Lundberg JG, Luckenbill, K. Bony ornamentation of the catfish pectoral-fin spine: comparative and developmental anatomy, with an example of fin-spine diversity using the Tribe *Brachyplatystomini* (Siluriformes, *Pimelodidae*). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia.* 2015; 164 (1), 177–212. <https://doi.org/10.1635/053.164.0107>.

Vasconcellos AV, Vianna P, Paiva PC, Schama R, Solé-Cava, A. Genetic and morphometric differences between yellowtail snapper (*Ocyurus chrysurus*, Lutjanidae) populations of the tropical West Atlantic. *Genetics and Molecular Biology.* 2008; 31, 308-316.

Vianna FCA, Felipin AR, Rodrigues MD, Carvalho OT, Aparecido BMA, Pereira SV, Renesto E. 2023. Enzymatic distance in two species of the genus *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae) from the Upper Paraná River basin, Paraná State, Brazil. *Acta Scientiarum: Biological Sciences.* 2023; 45. Doi: 10.4025/actascibiolsci.v45i1.66339

Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005; 360(1462):1847–57. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>.

Yeates DK, Seago A, Nelson L, Cameron, SL, Joseph L, Trueman JWH. Integrative taxonomy, or iterative taxonomy? *Systematic Entomology*. 2011; 36, 209–217. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2010.00558.x>