



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOÃO VITOR XAVIER DOS ANJOS

REVISÃO TAXONÔMICA DE *LEPORINUS AMBLYRHYNCHUS*
(CHARACIFORMES, ANOSTOMIDAE)

Londrina
2024

JOÃO VITOR XAVIER DOS ANJOS

REVISÃO TAXONÔMICA DE *LEPORINUS AMBLYRHYNCHUS*
(CHARACIFORMES, ANOSTOMIDAE)

Manuscrito de defesa apresentado 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. José Luís Olivan Birindelli

Londrina
2024

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

J62r dos Anjos, João Vitor.
REVISÃO TAXONÔMICA DE LEPORINUS AMBLYRHYNCHUS :
(CHARACIFORMES, ANOSTOMIDAE) / João Vitor dos Anjos. - Londrina,
2024.
48 f.

Orientador: José Luiz Olivan Birindelli.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Taxonomia - Tese. 2. Filogenia - Tese. 3. Evolução - Tese. 4.
Biodiversidade - Tese. I. Olivan Birindelli, José Luiz. II. Universidade Estadual de
Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 574

REVISÃO TAXONÔMICA DE *LEPORINUS AMBLYRHYNCHUS*
(CHARACIFORMES, ANOSTOMIDAE)

BANCA EXAMINADORA

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

Titular: Prof. Dr. Brian Lee Sidlauskas
Oregon State University

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

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

Suplente: Prof^a.Dra. Lenice Souza Shibatta
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de 05 de 2024 .

Agradecimentos

Em primeiro lugar, expresso meu profundo agradecimento, dedicando este trabalho à memória do meu amado pai, José Cláudio dos Anjos, cuja partida ocorreu em 2021. Ele foi um pai excepcional, desempenhando um papel fundamental na construção da pessoa que sou hoje.

Quero estender meus agradecimentos à minha mãe, Maria do Carmo Xavier, cujo apoio ao longo da minha vida, especialmente na minha jornada educacional, foi inestimável. Agradeço também à minha namorada, Andrielle Bezerra, por seu constante suporte e presença constante ao meu lado.

Um agradecimento especial ao meu orientador, José Luís Birindelli, pela partilha de conhecimento e pela contínua confiança em meu potencial. Expresso minha gratidão a Lenice Souza-Shibatta por compartilhar seu conhecimento em técnicas de sequenciamento genético. Reconheço, igualmente, os professores do Laboratório de Ictiologia, Oscar Akio Shibatta e Fernando Jerep, por sua disposição constante em oferecer auxílio e apoio.

Quero estender meus agradecimentos a todos os colegas de laboratório, cuja colaboração mútua contribuiu para nosso crescimento ao longo do tempo. Não posso deixar de reconhecer a dedicação dos técnicos do laboratório, Aparecido Souza e Edson Santana da Silva, cujo trabalho foi fundamental para o desenvolvimento deste projeto.

Expresso minha gratidão à Universidade Estadual de Londrina pelo espaço cedido no Departamento de Biologia Vegetal e Animal, que foi fundamental para a realização deste trabalho. Ao Museu de Zoologia UEL (MZUEL), estendo meus agradecimentos pela disponibilidade dos animais de sua coleção, pelo espaço e todos materiais necessários para a realização desta pesquisa.

Quero reconhecer e agradecer ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá (NUPELIA) e ao Museu de História Natural do Capão da Imbuia (MHNCI) pela generosa concessão de espaço e material essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Expresso minha sincera gratidão também ao Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) e ao Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas (ZUEC, Unicamp) pelo empréstimo de materiais. A colaboração e suporte dessas instituições foram fundamentais para a realização deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A fauna de peixes de água doce da América do Sul é a mais diversa do planeta e ainda estamos longe de conhecermos toda a sua complexidade. Uma das mais diversas famílias de peixes sulamericanos é Anostomidae, que abriga aproximadamente 150 espécies. Dentre elas, *Leporinus amblyrhynchus* foi descrita em 1987 e ocorre amplamente na bacia do Alto Paraná. Exemplares recentemente coletados na bacia do rio São Francisco foram tentativamente identificados como pertencentes a *L. amblyrhynchus*. O objetivo dessa dissertação foi verificar a identificação desses exemplares e, conseqüentemente, desenvolver uma revisão da espécie *L. amblyrhynchus*. Para isso, análises foram feitas através do uso integrado de DNA Barcode e dados morfológicos, a fim de se reconhecer, diagnosticar e descrever as espécies reconhecidas. Como resultado, os exemplares da bacia do rio São Francisco são reconhecidos como pertencentes a uma espécie nova. *Leporinus amblyrhynchus* e a espécie nova são diagnosticadas, descritas e ilustradas. Além disso, dados sobre a distribuição geográfica das espécies e de seus estados de conservação são fornecidos e discutidos. As duas espécies são consideradas como grupos irmãos e próximas à *Leporinus microphthalmus*.

Palavras-chave: Taxonomia, Filogenia, Evolução, Biodiversidade.

Taxonomic Review of *Leporinus Amblyrhynchus* (Characiformes, Anostomidae)

ABSTRACT

The freshwater fish fauna of South America is the most diverse on the planet, and we are far from knowing its full complexity. One of the most diverse families of South American fish is Anostomidae, which harbors approximately 150 species. Among them, *Leporinus amblyrhynchus* was described in 1987 and occurs widely in the Upper Paraná basin. Recent specimens collected in the São Francisco River basin were tentatively identified as *L. amblyrhynchus*. This thesis aims to test the identification of these new specimens by integrating DNA Barcode and morphological data to recognize, diagnose, and (re)describe the identified species. As a result, the specimens from the São Francisco River basin were recognized as belonging to a new (undescribed) species. *Leporinus amblyrhynchus* and the new species were diagnosed, (re)described, and illustrated. In addition, data on their geographic distribution and conservation status were provided and discussed. The two species were recovered as sister taxa and closely related to *L. microphthalmos*.

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

Key words: Taxonomy, Phylogeny, Evolution, Biodiversity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Mapa de distribuição das amostras dos tecidos utilizadas no presente estudo. O ponto vermelho representa os *Leporinus* sp. da bacia do São Francisco em Minas Gerais (MZUEL 16433). O ponto amarelo representa os *Leporinus amblyrhynchus* da bacia do Alto Paraná no Estado do Paraná (MZUEL 17075, MZUEL 22585, PDtaq27, PDtaq28 e PDtaq29). -----5
- Figura 2.** Gráfico de dispersão resultado da Análise dos Componentes Principais (PCA) com base em 15 variáveis morfométricas. -----11
- Figura 3.** Fotografias das principais estruturas ósseas de um espécime de *L. amblyrhynchus* do alto Paraná. -----14
- Figura 4.** Fotografias das principais estruturas ósseas de um espécime de *Leporinus* sp. ----15
- Figura 5** - Árvore filogenética com base na sequência do gene COI (DNA Barcode) e análise de Máxima Verossimilhança. -----10
- Figura 6.** *Leporinus amblyrhynchus*: (A) holótipo, MZUSP 14411. -----17
- Figura 7.** Cabeça de *Leporinus amblyrhynchus*, mostrando em detalhe o focinho proeminente, com boca subinferior e lábio dorsal intumescido em (A) MZUSP. -----17
- Figura 8.** *Leporinus amblyrhynchus*: MZUEL 22585, rio Pardo, fotografado em vida. --
-----19
- Figura 9.** Mapa da distribuição geográfica de *Leporinus amblyrhynchus* (Amarelo) e da espécie nova (vermelho) na América do Sul.----- 19
- Figura 10.** *Leporinus* sp. (São Francisco): MZUEL 16433, rio São Francisco, fotografado em vida. -----21
- Figura 11.** *Leporinus* sp: (A) MZUEL 16433, 160,01 mm CP; (B) MZUEL 16433, 126,67 mm CP; (C) MZUEL 16433, 94,97 mm CP; fotografia em álcool. -----
-21
- Figura 13.** Fotografia da Localidade tipo de *Leporinus* sp. (São Francisco), no rio Riachão; rio Itapeccerica; rio Cipó. -----24

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Informações sobre as sequências utilizados nas análises, incluindo dados sobre os vouchers e número de acesso no GenBank e/ou Bold System. -----6

Tabela 2. Distância genética entre as amostras de *Leporinus* estudadas, baseada no DNA *Barcode* e no modelo K2+G. -----9

Tabela 3. Dados morfométricos de *Leporinus amblyrhynchus* e de uma espécie nova de *Leporinus*. -----12

Tabela 4. Dados merísticos (i.e., contagens de escamas, raios e dentes) de *Leporinus amblyrhynchus* e de uma espécie nova de *Leporinus*. -----13

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
MZUEL	Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina
MZUSP	Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo
COI	Citocromo C Oxidase
MOTUs	Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares
PCA	Análise dos Componentes Principais
PTP	<i>Poisson Tree Processes</i>
SD	Desvio Padrão
UEL	Universidade Estadual de Londrina

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
2	MATERIAL E MÉTODOS	3
2.1	Exemplares estudados.....	3
2.2	Dados morfológicos.....	3
2.3	Análises morfométricas	4
2.4	Dados moleculares.....	4
2.5	Análises moleculares	7
3	RESULTADOS	9
3.1	Análises morfológicas	9
3.2	Análises moleculares	15
3.3	Revisão taxonômica.....	17
3.3.1	<i>Leporinus amblyrhynchus</i> Britski & Garavello, 1987.....	17
3.3.2	<i>Leporinus</i> sp. (São Francisco)	23
4	DISCUSSÃO	28
5	REFERÊNCIAS	32

APRESENTAÇÃO

O presente estudo está configurado conforme as normas exigidas pela revista NI (*Neotropical Ichthyology*), às quais podem ser encontradas em <https://www.ni.bio.br/>, exceto por estar escrito em Português.

Declaramos que todo o material utilizado neste estudo foi oriundo de coleções científicas, não tendo sido, portanto, fruto de coletas realizadas durante este projeto. Além disso, o material estudado é considerado isento de cadastros de acesso ao material genético na base de dados do SISGEN por possuir finalidade exclusiva de estudo Taxonômico, Filogenético, Sistemática e Ecologia, conforme estabelecido na resolução CGEN 26/2021, que diz que as informações dos acessos devem estar disponíveis nos bancos de dados das coleções depositárias do material examinado (SIBBr, SpeciesLink, GenBank, BoldSystem), o que é o caso do nosso estudo.

1 INTRODUÇÃO

A fauna de peixes dulcícolas da América do Sul é a mais diversa do planeta (Reis et al., 2016), com uma diversidade estimada em mais de 9.000 espécies, das quais quase um terço permanece não reconhecida pela Ciência (Birindelli & Sidlauskas, 2018). Diversas técnicas contribuem para o reconhecimento destas espécies, sendo as mais tradicionais baseadas em morfologia externa e incluem os padrões de colorido, contagens de raios, escamas e dentes (Garavello & Britski, 1987; Britski & Birindelli, 2008). Mais recentemente, técnicas baseadas no sequenciamento genético têm sido propostas para ajudar no reconhecimento e descrição das espécies. Uma região do gene mitocondrial Citocromo C oxidase 1 (Herbert et al., 2003), chamada DNA *Barcode*, mostrou-se extremamente eficiente para diferenciar espécies de peixes de água doce da América do Sul (Pugedo et al., 2016; García-Melo et al., 2019), atingindo taxas de mais de 95% de sucesso na identificação de exemplares de qualquer espécie. Estes artigos sugerem que exemplares de uma mesma espécie compartilham, no geral, cerca de 98% do DNA *Barcode*.

Anostomidae é uma das famílias de peixes mais diversas e amplamente distribuídas da América do Sul, com cerca de 150 espécies que ocorrem desde o norte da Colômbia à Argentina (Sidlauskas & Birindelli, 2017; Toledo-Piza et al., 2024). As espécies de Anostomidae são conhecidas popularmente no Brasil como pias, aracús e piavas, e são prontamente reconhecidas pelo corpo cilíndrico, nadadeira anal curta (com 12 raios ou menos), e pela presença de três ou quatro grandes dentes incisivos em cada lado das maxilas (Garavello & Britski, 2003). Cerca de metade da diversidade do grupo está em *Leporinus*, gênero que abriga espécies que têm sido descobertas e descritas quase todos os anos das últimas décadas (Burns et al., 2017; Birindelli et al., 2020).

A espécie foco deste trabalho, *Leporinus amblyrhynchus*, foi descrita por Garavello e Britski (1987) com base em exemplares de locais diferentes da bacia do Alto Paraná, não ocorrendo na bacia do rio Paraná abaixo de Itaipu, ou no rio Paraguai. A espécie possui um padrão de coloração composto por uma faixa longitudinal escura acompanhada de barras transversais escuras no dorso, e apresenta um focinho longo com lábios grossos. A espécie é considerada autóctone e nativa do Alto Paraná (Langeani et al., 2007), ocorrendo amplamente na bacia, desde os tributários do rio Tibagi no sul do estado do Paraná (Frantine-Silva et al., 2015, Shibatta et al., 2007) até tributários do rio Paranaíba, no estado de Goiás (Mendonça et al., 2007). Recentemente, a espécie foi registrada para o rio das Velhas, um tributário do rio São Francisco (Alves & Pompeu, 2001; 2005).

Ao testar a eficiência do uso de DNA *Barcode* para identificação de espécies de peixes do Alto Paraná, Pereira et al. (2013) verificou uma grande variação intra-específica para sua amostra de quatro indivíduos de *Leporinus amblyrhynchus*. Esta alta variação foi corroborada no meu Trabalho de Conclusão de Curso, apesar da quantidade também baixa de amostras do Alto Paraná (apenas duas sequências inéditas). Os meus resultados do TCC, baseados em DNA Barcode, indicaram que os exemplares do rio São Francisco, que eram identificados previamente como *Leporinus amblyrhynchus*, provavelmente pertencem a uma espécie diferente da que ocorre no Alto Paraná.

Desta forma, os objetivos do presente trabalho foram: 1. investigar as diferenças moleculares e morfológicas entre a espécie nova de *Leporinus* do rio São Francisco e *L. amblyrhynchus*, e 2. Descrever a espécie nova de *Leporinus* do rio São Francisco e re-descrever *Leporinus amblyrhynchus* com base em novas informações morfológicas, principalmente com a osteologia que até então era desconhecida para a espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 EXEMPLARES ESTUDADOS

Foram analisados os exemplares de *L. amblyrhynchus* que estão tombados no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), no Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá (NUPELIA) e no Museu de História Natural do Capão da Imbuia (MHNCI). Além disso, foram examinados exemplares obtidos através de empréstimos do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), e do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas (ZUEC, Unicamp).

2.2 DADOS MORFOLÓGICOS

Para obtenção dos dados morfométricos, foi utilizado um paquímetro digital com auxílio de um estereomicroscópio. Foram analisados 189 exemplares de *L. amblyrhynchus* coletados na bacia do alto rio Paraná, e 16 exemplares da espécie nova amostrados na bacia do rio São Francisco. As medidas e as contagens utilizadas foram baseadas em trabalhos taxonômicos anteriores, incluindo os de Britski & Garavello (1978), Winterbottom (1980), Sidlauskas et al. (2007), Sidlauskas et al. (2011) e Birindelli & Britski (2013). Todas as contagens foram realizadas preferencialmente no lado esquerdo dos exemplares.

As contagens realizadas incluíram: escamas da linha lateral; escamas entre a nadadeira dorsal e a linha lateral; escamas entre a linha lateral e nadadeira pélvica; escamas ao redor do pedúnculo caudal; escamas pré-dorsais; raios não ramificados da nadadeira dorsal; raios ramificados da nadadeira dorsal; raios ramificados da nadadeira peitoral; raios ramificados da nadadeira pélvica; raios ramificados da nadadeira anal; raios não ramificados da nadadeira anal; raios ramificados do lobo dorsal da nadadeira caudal; raios ramificados do lobo ventral da nadadeira caudal; dentes do pré-maxilar e dentes do dentário.

Já as medias realizadas foram: comprimento padrão; distancia pré-dorsal; origem da nadadeira dorsal à origem da nadadeira adiposa; distancia prépelvica; comprimento do corpo da origem da nadadeira dorsal; largura do corpo na origem da nadadeira dorsal; largura do pedúnculo caudal; comprimento do pedúnculo caudal; distância entre a origem da nadadeira anal e a parte maior do lobo da nadadeira anal; comprimento da cabeça; comprimento do

préoperculo; comprimento do focinho; largura da cabeça; diâmetro do olho; distancia interorbital.

As diagnoses comparativas e as descrições das espécies, foram baseadas na descrição original de *L. amblyrhynchus* de Garavello e Britski (1987) e nos trabalhos mais recentes sobre taxonomia de Anostomidae (e.g., Britski & Birindelli, 2013). As fotografias foram realizadas com auxílio de uma câmera Canon G15 de 12,1 megapixels seguindo a metodologia de Sabaj Pérez (2009), ou com uma câmera digital Leica DCF295 de 3 megapixels ligada a um estereomicroscópio Leica M205A com software de montagem de imagem por empilhamento de foco.

Exemplares para estudos de osteologia foram preparados de acordo com os procedimentos de diafanização descritos por Taylor & van Dyke (1985). A terminologia dos ossos seguiu a proposta por Weitzman (1962). As contagens de vértebras e costelas foram feitas através de imagens de raio X obtidas no equipamento digital da Kubtec Scientific modelo XPERT 40.

2.3 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

Os dados morfométricos e merísticos foram tabulados e, para cada variável morfométrica, foi calculada a média, o desvio padrão, e os valores mínimo e máximo. Os valores das variáveis merísticas foram incluídos no texto da descrição de cada espécie. Os dados morfométricos brutos foram transferidos para o programa PAST, v. 4.13 (Hammer et al., 2001), onde foram logaritimizados e utilizados numa Análise de Componentes Principais (PCA). Para a representação gráfica foram utilizados os eixos PC2 versus PC3, que são reconhecidos como os componentes principais que melhor representam a variação na forma do corpo dos exemplares, conforme discutido por Jolicouer & Mosimann (1960).

2.4 DADOS MOLECULARES

Foram utilizadas 8 amostras de tecidos, sendo 4 delas de indivíduos coletados na bacia do Alto Paraná (MZUEL 17075, 22585 e 18060) e 4 de indivíduos coletados na bacia do rio São Francisco (MZUEL 16433) (Figura 1).

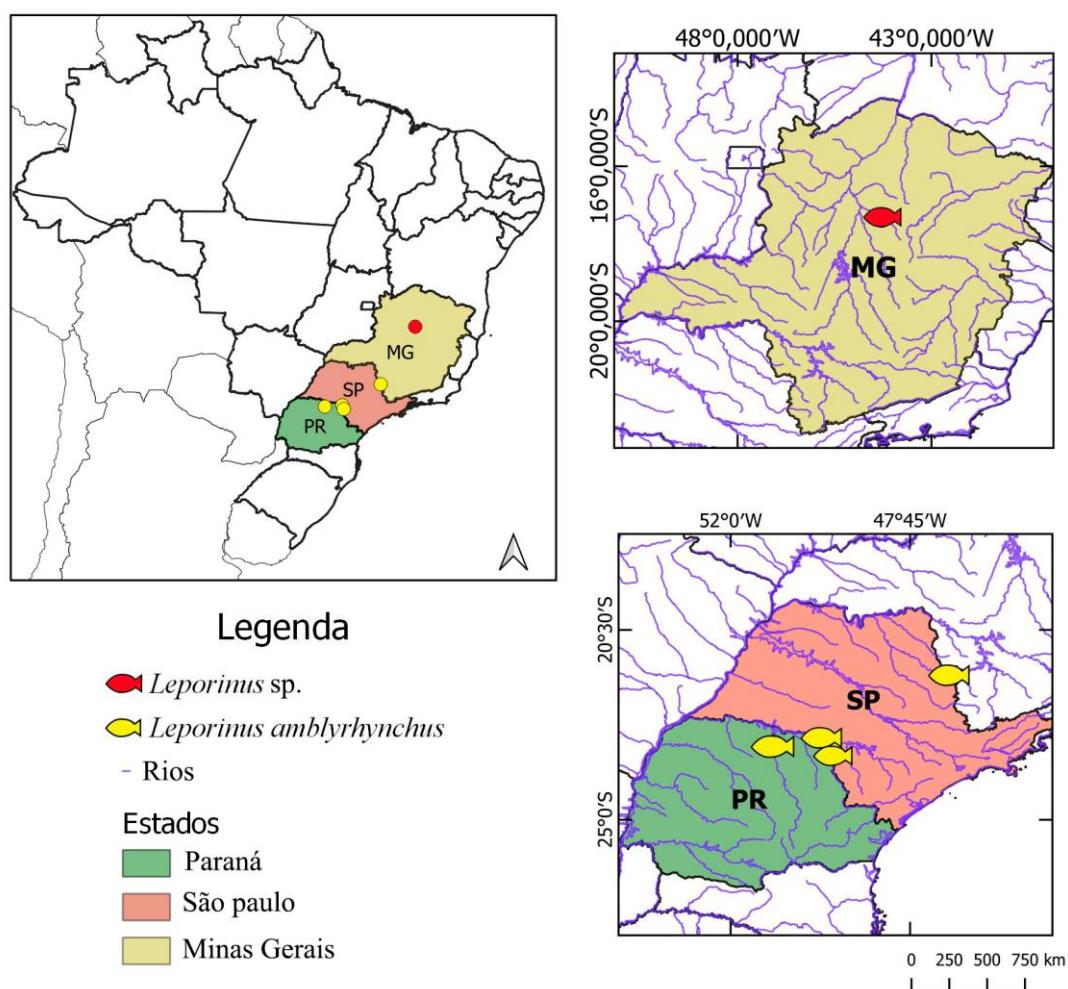


Figura 1. Mapa de distribuição das amostras dos tecidos utilizadas no presente estudo. O ponto vermelho representa os *Leporinus* sp. da bacia do São Francisco em Minas Gerais (MZUEL 16433). O ponto amarelo representa os *Leporinus amblyrhynchus* da bacia do Alto Paraná no Paraná (MZUEL 17075, MZUEL 22585, PDtaq27, PDtaq28 e PDtaq29).

Além disso, foram obtidas mais seis sequências de *L. amblyrhynchus* no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e/ou Bold System (http://boldsystems.org/index.php/Public_BINSearch?searchtype=records). Para fins comparativos, foram ainda obtidas no Bold System e/ou GenBank três sequências de *L. microphthalmus*, seis de *L. paranensis*, 16 de *L. friderici* e 20 de *L. taeniatus*. Entre estas, *L. microphthalmus* e *L. paranaensis* são congêneres que ocorrem também na bacia do rio Alto Paraná e que são superficialmente similares à *L. amblyrhynchus*. *Leporinus taeniatus* é uma espécie congênere também superficialmente similar à *L. amblyrhynchus*, que ocorre na bacia do rio São Francisco. *Leporinus friderici* é talvez a espécie mais bem conhecida e amplamente distribuída dentro do gênero e foi utilizada como grupo externo. Detalhes sobre as sequências

utilizadas no presente estudo estão disponibilizadas na tabela 1. O DNA foi obtido e isolado a partir de tecido muscular. Para a extração foi usado o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Integridade do DNA foi verificada realizando eletroforese em gel de agarose 0,8%, 100 V por 30-40 min, em um tampão TEB 0,5. O gel foi corado com SYBR Safe DNA gel stain (1 µL). A quantificação do DNA foi determinada por Quantus™ Fluorometer (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Para o nosso estudo foi amplificado o gene mitocondrial Citocromo C Oxidase subunidade I (COI), com aproximadamente 698 pares de bases, o gene foi amplificado por reação de PCR utilizando os primers FishF1 e FishR1, descritos por Ward et al. (2005). As moléculas de DNA amplificadas foram sequenciadas e analisadas no sequenciador automático.

Tabela 1: Informações sobre as sequências utilizadas nas análises, incluindo dados sobre os vouchers e número de acesso no GenBank e/ou Bold System. As sequências originais (i.e., obtidas no presente estudo) estão destacadas em vermelho.

Espécie	Número de catálogo	Número do tecido	Localidade (drenagem)	GenBank (accession number)	Bold (id number)
<i>L. amblyrhynchus</i>	MZUEL 22585	219	Rio Grande (Alto Paraná)		
<i>L. amblyrhynchus</i>	LBP 3505	20121	Rio Paranapanema (Alto Paraná)	EU185541.1	
<i>L. amblyrhynchus</i>	LBP 3917	21830	Rio Paranapanema (Alto Paraná)	EU185544.1	
<i>L. amblyrhynchus</i>	MZUEL 17075	90	Rio Paranapanema (Alto Paraná)		
<i>L. amblyrhynchus</i>	MZUEL 17075	109	Rio Paranapanema (Alto Paraná)		
<i>L. amblyrhynchus</i>	MZUEL 18060	2101	Rio Paranapanema (Alto Paraná)		
<i>L. amblyrhynchus</i>		PDtaq27	Rio Paranapanema (Alto Paraná)	KM897637.1	
<i>L. amblyrhynchus</i>		PDtaq28	Rio Paranapanema (Alto Paraná)	KM897504.1	
<i>L. amblyrhynchus</i>		PDtaq29	Rio Paranapanema (Alto Paraná)	KM897188.1	
<i>L. amblyrhynchus</i>	LBP 3917	21829		EU185543.1	
<i>L. friderici</i>	MHNG	GF15-012	Maroni River (French Guiana)	MZ051078	GBOL1569-17
<i>L. friderici</i>	MHNG	GF15-013	Maroni River (French Guiana)	MZ051963	GBOL1570-17
<i>L. friderici</i>	MHNG	GF15-280	Maroni River (French Guiana)	MZ051019	GBOL1671-17
<i>L. friderici</i>	MHNG	PAG-0082	Maroni River (French Guiana)	MZ051463	GBOL2314-17
<i>L. friderici</i>	MHNG	PAG-0094	Maroni River (French Guiana)	MZ050836	GBOL2315-17
<i>L. friderici</i>	MHNG	PAG-0480	Maroni River (French Guiana)	MZ051659	GBOL2317-17
<i>L. friderici</i>	MHNG	PAG-0670	Maroni River (French Guiana)	MZ051421	GBOL2318-17
<i>L. friderici</i>	MHNG	PAG-0671	Maroni River (French Guiana)	MZ051423	GBOL2319-17
<i>L. friderici</i>	MHNG	PAG-3639	Maroni River (French Guiana)	MZ051168	GBOL2320-17
<i>L. friderici</i>	MHNG	GFSU14-007	Marouini River (French Guiana)	MZ051774	GBOL1238-16
<i>L. friderici</i>	MHNG	GFSU14-008	Marouini River (French Guiana)	MZ051433	GBOL1239-16
<i>L. friderici</i>	MHNG	GFSU14-083	Marouini River (French Guiana)	MZ051153	GBOL1255-16
<i>L. friderici</i>	MHNG	GFSU14-084	Marouini River (French Guiana)	MZ050815	GBOL1256-16
<i>L. friderici</i>	MHNG 2718.020	SU08-655	Marowijne River (Suriname)	MZ051034	GBOL100-13
<i>L. friderici</i>	MHNG	SU08-202	Paloemeu River (Suriname)	MZ051564	GBOL3658-18
<i>L. friderici</i>	MHNG 2718.022	SU08-656	Paloemeu River (Suriname)	MZ051752	GBOL3657-18
<i>L. microphthalmus</i>	LBP 35830	35830	Rio Paraná (Alto Paraná)	JN989000.1	
<i>L. microphthalmus</i>	LBP 35831	35831	Rio Paranapanema (Alto Paraná)	JN989001.1	
<i>L. microphthalmus</i>	LBP 35832	35832	Rio Paranapanema (Alto Paraná)	JN989002.1	
<i>L. paranensis</i>		174C.a	Rio Paranapanema (Alto Paraná)		PRP292-16
<i>L. paranensis</i>		462J	Rio Paranapanema (Alto Paraná)		PRP290-16

<i>L. paranensis</i>		473j	Rio Paranapanema (Alto Paraná)	PRP287-16
<i>L. paranensis</i>		484j	Rio Paranapanema (Alto Paraná)	PRP291-16
<i>L. paranensis</i>		616j	Rio Paranapanema (Alto Paraná)	PRP288-16
<i>L. paranensis</i>		633j	Rio Paranapanema (Alto Paraná)	PRP289-16
<i>L. taeniatus</i>	UFRN1806	TIUFRN2028	Rio Apodi (Rio Grande do Norte)	MNCE011-17
<i>L. taeniatus</i>	UFRN1806	TIUFRN2029	Rio Apodi (Rio Grande do Norte)	MNCE012-17
<i>L. taeniatus</i>	UFRN1806	TIUFRN2030	Rio Apodi (Rio Grande do Norte)	MNCE013-17
<i>L. taeniatus</i>	UFRN1806	TIUFRN2031	Rio Apodi (Rio Grande do Norte)	MNCE014-17
<i>L. taeniatus</i>	UFRN1826	TIUFRN2024	Rio Apodi (Rio Grande do Norte)	MNCE017-17
<i>L. taeniatus</i>	UFRN1826	TIUFRN2025	Rio Apodi (Rio Grande do Norte)	MNCE018-17
<i>L. taeniatus</i>	UFRN1826	TIUFRN2026	Rio Apodi (Rio Grande do Norte)	MNCE015-17
<i>L. taeniatus</i>	UFRN1826	TIUFRN2027	Rio Apodi (Rio Grande do Norte)	MNCE019-17
<i>L. taeniatus</i>	MCP 44772	DCC01129	Rio Curimataí (São Francisco)	BSB327-10
<i>L. taeniatus</i>	UFRN1273	TIUFRN1815	Rio Jaguaribe (Ceará)	MNCE020-17
<i>L. taeniatus</i>	UFRN1828	TIUFRN2005	Rio Jaguaribe (Ceará)	MNCE022-17
<i>L. taeniatus</i>	UFRN1836	TIUFRN1869	Rio Jaguaribe (Ceará)	MNCE023-17
<i>L. taeniatus</i>	UFRN1840	TIUFRN1853	Rio Jaguaribe (Ceará)	MNCE024-17
<i>L. taeniatus</i>	UFRN598	TIUFRN1179	Rio Jaguaribe (Ceará)	MNCE021-17
<i>L. taeniatus</i>	JEQUI_LGC1549	JEQUI_6605	Rio Jequitinhonha (Jequitinhonha)	JEQUI160-13
<i>L. taeniatus</i>	JEQUI_LGC1553	JEQUI_6606	Rio Jequitinhonha (Jequitinhonha)	JEQUI164-13
<i>L. taeniatus</i>	JEQUI_LGC1554	JEQUI_6606	Rio Jequitinhonha (Jequitinhonha)	JEQUI165-13
<i>L. taeniatus</i>	DCC00569	569	Rio Pandeiros (São Francisco)	BSB326-10
<i>L. taeniatus</i>	MCP45201	DCC00568	Rio Pandeiros (São Francisco)	BSB325-10
<i>L. taeniatus</i>	MCP44097	DCC00184	Rio Urucuia (São Francisco)	BSB458-10
<i>Leporinus</i> sp.	MZUEL 16433	187	Rio Jequitai (São Francisco)	
<i>Leporinus</i> sp.	MZUEL 16433	188	Rio Jequitai (São Francisco)	
<i>Leporinus</i> sp.	MZUEL 16433	189	Rio Jequitai (São Francisco)	
<i>Leporinus</i> sp.	MZUEL 16433	190	Rio Jequitai (São Francisco)	

2.5 ANÁLISES MOLECULARES

As sequências de nucleotídeos foram alinhadas e editadas no Mega v.11 (Stecher et al., 2020) usando o algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). A matriz de sequências alinhadas foi utilizada para cálculo das distâncias genéticas média entre as amostras e dentro de cada amostra (i.e., espécie) através do modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980; Tamura et al., 2011), no Mega v.11. Uma análise filogenética de Máxima Verossimilhança foi realizada no Mega v.11 a partir da matriz das sequências alinhadas para realização de análises de delimitação de espécie; além disso foi realizado uma análise de Inferência Bayesiana no BEAST V.2.6.6 (Drummon, 2015). Para isso, a matriz de sequências alinhadas foi salva no Mega v.11 no formato Nexus, e aberta no Beauti, onde um arquivo foi gerado com as opções de relógio estrito, que assume que cada ramo de uma árvore filogenética evolui de acordo com a mesma taxa evolutiva (Ferreira e Suchard, 2008); a taxa do relógio foi calibrado a 0.01 para observação do tempo de divergência na topologia da árvore ; foi utilizado 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 utilizado foi TPM2uf+G que foi calculado através do pacote bModelTest (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 25% das árvores (Drummond e Rambaut 2007). A árvore final foi editada no FigTree.

Foram realizadas três análises diferentes de delimitação de espécies. A análise com o modelo Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo (mPTP), foi feita no servidor virtual <https://mptp.hits.org/#/tree> (Kapli et al., 2017) onde foi incluída a árvore de Máxima Verossimilhança, previamente calculada no Mega. A análise *Assemble Species by Automatic Partitioning* (ASAP) no servidor virtual <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/asapweb.html>, através do modelo Kimura - K80 ts/tv 2.0 foi feita com base na matriz com as sequências alinhadas (Puillandre et al., 2020)

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISES MORFOLÓGICAS

O formato do corpo dos exemplares de *Leporinus amblyrhynchus* foi comparado ao da espécie nova através de uma Análise de Componentes Principais baseada em 15 variáveis morfométricas obtidas a partir de 120 exemplares de *L. amblyrhynchus* (Alto Paraná) e 16 exemplares de *Leporinus* sp. (São Francisco) (Figura 2). Os resultados mostram uma grande sobreposição dos dados morfométricos nas duas espécies.

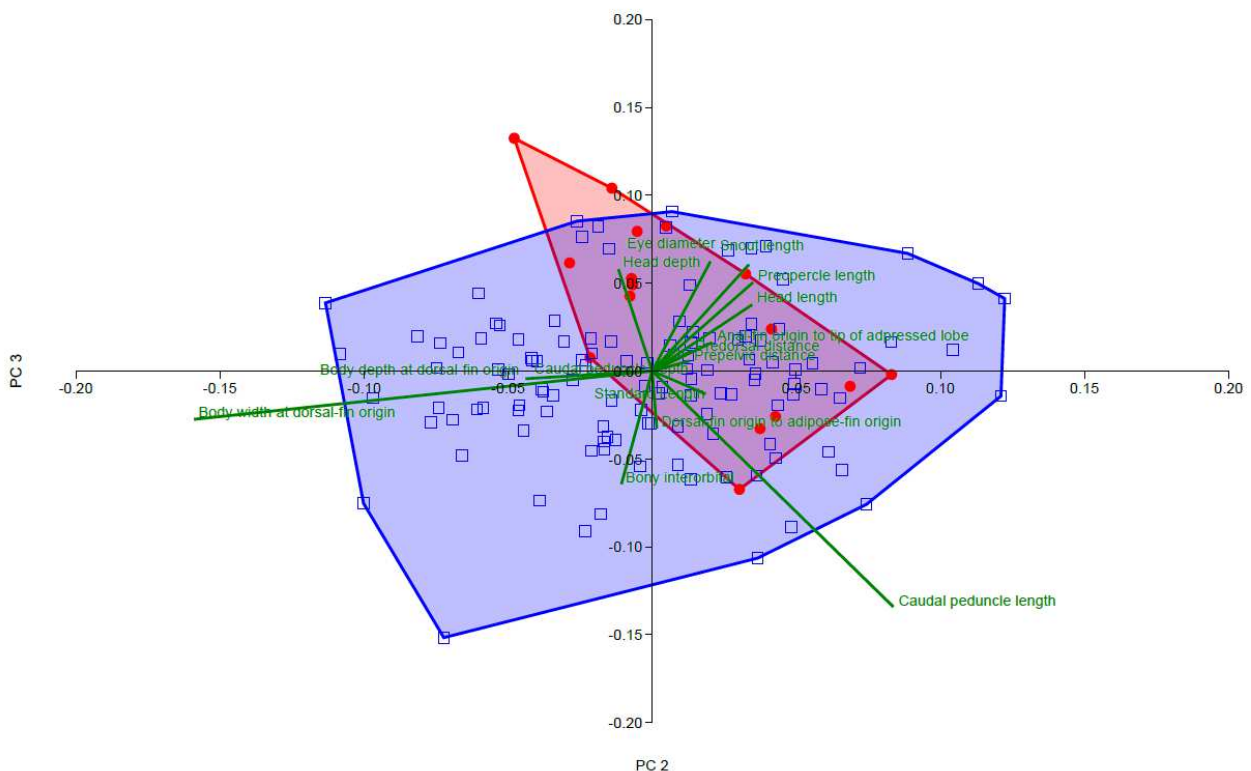


Figura 2. Gráfico de dispersão resultado da Análise dos Componentes Principais (PCA) com base nas 15 variáveis morfométricas. Em azul os indivíduos de *L. amblyrhynchus* (do Alto Paraná) e em vermelho os indivíduos da espécie nova do rio São Francisco. Em verde a contribuição de cada uma das variáveis morfométricas.

No resultado da PCA observou-se que o primeiro componente principal (PC1), explica 94,2% da variabilidade dos dados. No entanto, é reconhecido que o PC1 está associado ao comprimento padrão, uma medida potencialmente suscetível a consideráveis variações devido

a fatores como a idade do indivíduo, seu padrão alimentar e outras características relevantes. Considerando a notória variabilidade do comprimento padrão e seus vínculos com fatores múltiplos e complexos, optou-se por empregar, na construção do Gráfico 1, os componentes PC2 e PC3, os quais explicam, respectivamente, 1,4% e 1,18% da variância dos dados. Esta escolha foi feita a fim de mitigar possíveis influências desproporcionais do comprimento padrão e permitir uma representação mais equilibrada e informativa das relações morfométricas. As variáveis que se mostraram mais relevantes foi o comprimento do pedúnculo caudal no PC2, e a largura do corpo no PC3.

De forma similar, a comparação de médias e dos valores mínimos e máximos para cada uma das 15 variáveis (Tabela 3) mostrou que uma grande sobreposição nos dados das duas espécies, o que é condizente com um formato corporal similar.

Tabela 3. Dados morfométricos de *Leporinus amblyrhynchus* e da espécie nova. DP = desvio padrão.

	<i>Leporinus amblyrhynchus</i>				<i>Leporinus</i> sp. (São Francisco)			
	n	Média	Min-Max	DP	n	Média	Min-Max	DP
Comprimento padrão (mm)	189	119,05	45,01 - 197,00		16	116,65	94,97 - 160,01	
Porcentagens do comprimento padrão								
Distância pré-dorsal	120	47,88	44,51 - 50,93	1,31	16	48,29	46,55 - 50,40	0,83
Distâncias entre as origens da dorsal e adiposa	120	39,16	35,95 - 42,77	3,89	16	37,17	31,12 - 39,09	1,88
Distância pré-pélvica	120	50,07	44,07 - 54,05	4,85	16	49,83	46,28 - 52,17	1,40
Altura do corpo na origem da dorsal	119	24,75	20,50 - 29,61	1,67	16	23,86	22,65 - 24,90	0,69
Largura do corpo na origem da dorsal	120	13,86	8,86 - 19,05	1,69	16	13,73	12,14 - 15,96	0,97
Comprimento do pedúnculo caudal	120	12,68	10,54 - 16,01	1,04	16	12,24	9,56 - 14,45	1,36
Altura do pedúnculo caudal	120	10,13	9,09 - 11,14	0,41	16	10,05	9,59 - 10,48	0,24
Altura do lobo da anal	118	16,81	13,75 - 19,06	0,97	16	16,09	14,91 - 17,45	0,68
Comprimento da cabeça	120	24,69	22,36 - 31,68	1,34	16	26,75	25,78 - 27,84	0,62
Porcentagens do comprimento da cabeça								
Comprimento do pré-opérculo	120	77,72	61,97 - 81,66	2,03	16	77,12	74,85 - 79,43	1,59
Comprimento do focinho	120	40,40	32,35 - 46,19	2,41	16	40,40	37,28 - 43,40	1,46
Altura da cabeça	120	60,12	44,30 - 68,78	4,56	16	56,08	46,55 - 60,61	3,56
Diâmetro do olho	120	24,69	17,69 - 29,45	1,78	16	24,47	21,00 - 27,38	1,84
Distância interorbital	120	30,02	23,21 - 39,39	2,60	16	30,59	22,48 - 52,03	6,05

As variáveis merísticas também se apresentaram sobrepostas quando as duas espécies foram comparadas (Tabela 4). A única diferença entre as duas espécies refere-se ao número de dentes no dentário. Todos os 16 exemplares da espécie nova apresentaram quatro dentes no dentário. Já todos os 189 exemplares examinados de *L. amblyrhynchus* apresentaram três dentes

no dentário. Por outro lado 4 exemplares (7,56% dos 189) de *L. amblyrhynchus* apresentaram 4 dentes no pré-maxilar de apenas um dos lados da boca, o que consideramos como uma anomalia para a espécie.

Tabela 4. Dados merísticos (i.e., contagens de escamas, raios e dentes) de *Leporinus amblyrhynchus* e de *Leporinus* sp.

	<i>Leporinus amblyrhynchus</i>			<i>Leporinus</i> sp. (São Francisco)		
	n	Moda	Min-Max	n	Moda	Min-Max
Escamas na linha lateral (LL)	126	39	38 - 41	16	40	38 - 40
Séries de escamas entre LL e dorsal	131	5	5 - 5	16	5	5 - 5
Séries de escamas entre LL e pélvica	131	4	4 - 4	16	4	4 - 4
Séries de escamas ao redor do pedúnculo	131	12	12 - 12	16	12	12 - 12
Escamas pré-dorsais	109	12	11 - 13	16	12	11 - 12
Raios não ramificados na dorsal	132	2	2 - 3	16	2	2 - 3
Raios ramificados na dorsal	132	10	7 - 10	16	10	10 - 10
Raios ramificados na peitoral	131	15	13 - 17	16	16	15 - 16
Raios ramificados na pélvica	130	8	7 - 9	16	8	8 - 9
Raios não ramificados na anal	132	2	2 - 3	16	2	2 - 2
Raios ramificados na anal	132	8	7 - 9	16	9	8 - 9
Raios ramificados dorsais da caudal	129	9	9 - 9	16	9	9 - 9
Raios ramificados ventrais da caudal	129	8	8 - 8	16	8	8 - 8
Dentes no pré-maxilar	189	3	3 - 4	16	3	3 - 3
Dente no dentário	189	3	3 - 3	16	4	4 - 4

O estudo dos ossos e cartilagens dos espécimes de *L. amblyrhynchus* e da espécie nova revelou também uma notável semelhança entre as duas espécies. Apesar disso, algumas diferenças pontuais foram observadas. No exemplar de *L. amblyrhynchus*, o urohial exibiu dois pequenos processos posteriores (Figura 3), enquanto no exemplar da espécie nova, o urohial apresentou um grande processo posterior (Figura 4).

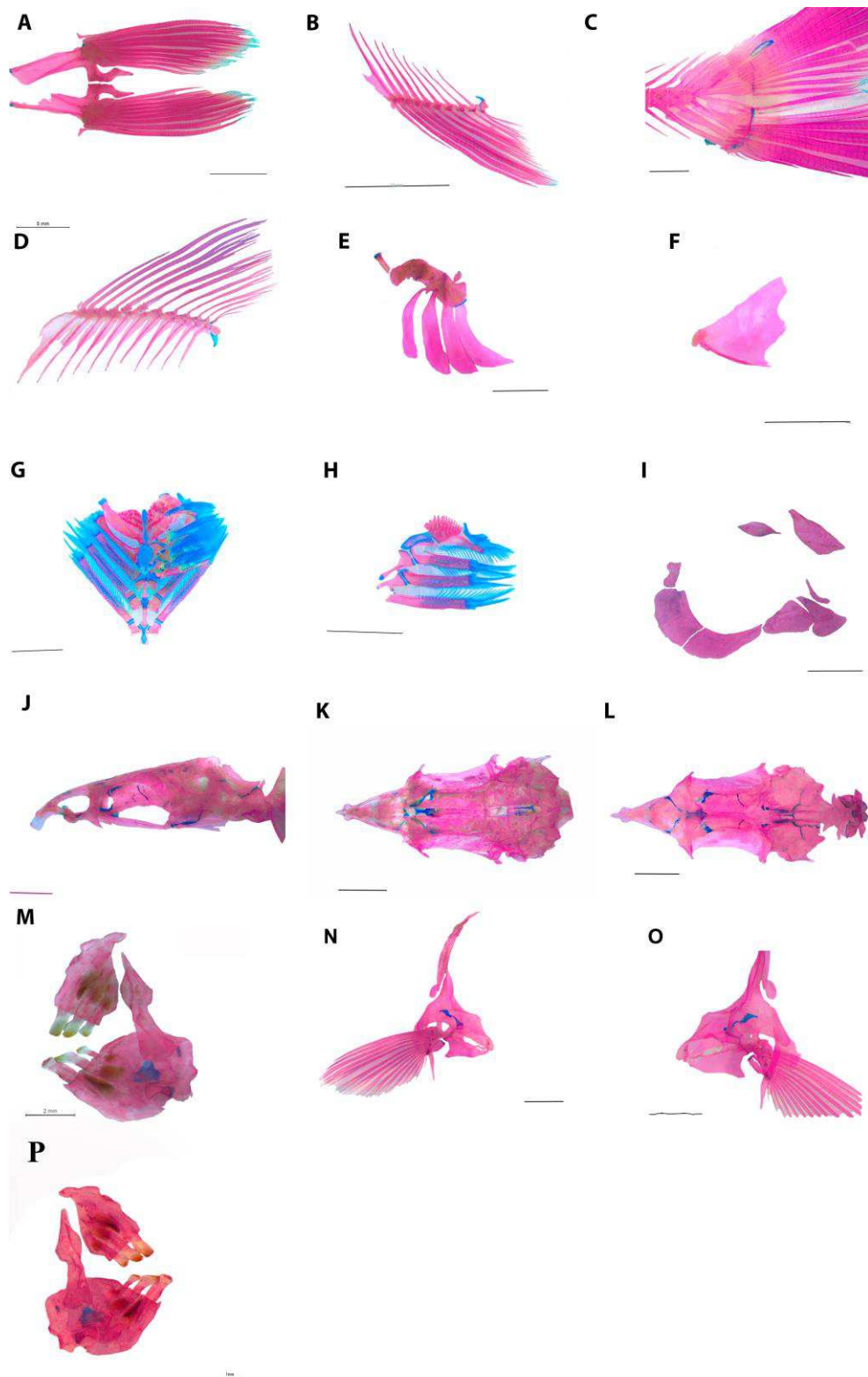


Figura 3. Fotografias das principais estruturas ósseas de um espécime de *L. amblyrhynchus* do alto Paraná. **A:** Nadadeira pélvica; **B:** Nadadeira anal; **C:** Nadadeira caudal; **D:** Nadadeira Dorsal; **E:** Ceratohial; **F:** Urohial; **G:** Arco branquial; **H:** **I:** Serie infra-orbital; **J:** Visão lateral do crânio; **K:** Visão dorsal do crânio; **L:** Visão ventral

do crânio; **M**: Pré-maxilar, dentário e maxilar; **N**: Nadadeira peitoral; **O**: Vista posterior nadadeira peitoral; **P**: vista posterior, pré-maxilar, dentário e maxilar.

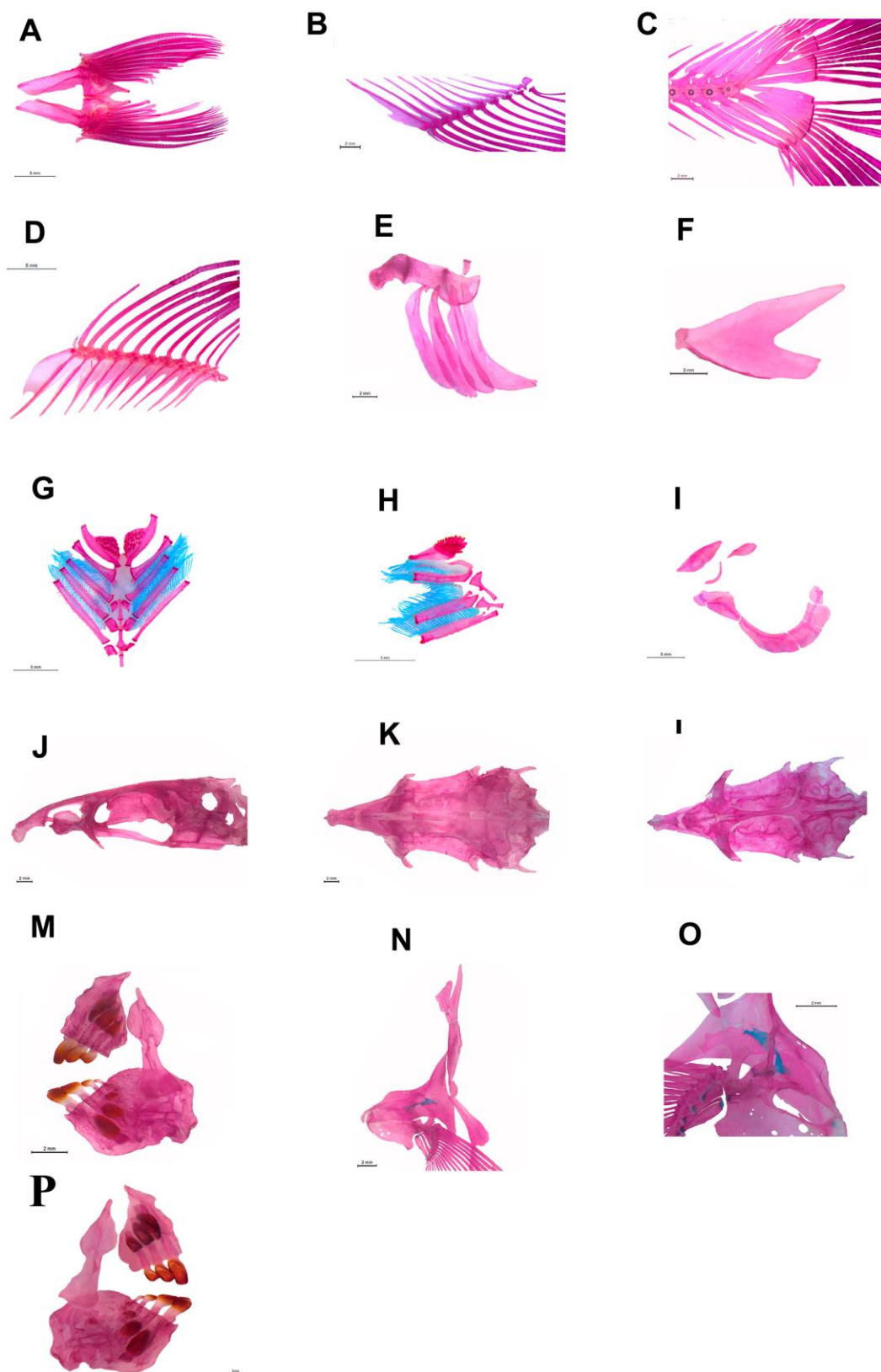


Figura 4. Fotografias das principais estruturas ósseas de um espécime da espécie nova do São Francisco. **A:** Nadadeira pélvica; **B:** Nadadeira anal; **C:** Nadadeira caudal; **D:** Nadadeira Dorsal; **E:** Ceratohial; **F:** Urohial; **G:** Arco branquial; **H: I:** Serie infra-orbital; **J:** Visão lateral do crânio; **K:** Visão dorsal do crânio; **L:** Visão ventral do crânio; **M:** Pré-maxilar, dentário e maxilar; **N:** Nadadeira peitoral; **O:** Vista posterior nadadeira peitoral; **P:** vista posterior, pré-maxilar, dentário e maxilar.

3.2 ANÁLISES MOLECULARES

O alinhamento final do gene COI recuperou 547 pares de bases para 64 espécimes, dos quais 122 são variáveis e 111 são *parsimony-informative*. A distância genética média entre as amostras (i.e., espécies) estudadas variou de 4,83 a 17,33% (Tabela 2). Por outro lado, as distâncias dentro de cada amostra foram bem menores, variando de 0,07 a 1,76%. A menor distância genética entre as amostras analisadas foi obtida entre *Leporinus paranensis* e *L. taeniatus*, enquanto a maior foi obtida entre *L. amblyrhynchus* e *L. taeniatus*. A distância genética entre *L. amblyrhynchus* e o espécime do rio São Francisco foi de 7.09% (+-1,25%), enquanto a distância intra-amostra foi de 1,76% e 0,12, respectivamente.

Tabela 2. Distância genética em porcentagem, entre as amostras de *Leporinus* estudadas, baseada no DNA *Barcode* e no modelo K2+G. 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>Leporinus</i> sp. (n=4)	0,12	1,25	1,81	1,49	2,34	2,38
2. <i>Leporinus amblyrhynchus</i> (n=10)	7,09	1,76	2,05	1,66	2,44	2,48
3. <i>Leporinus friderici</i> (n=16)	11,70	14,81	0,07	1,80	1,47	1,69
4. <i>Leporinus microphthalmus</i> (n=3)	8,48	11,19	11,71	0,13	2,14	2,24
5. <i>Leporinus paranensis</i> (n=11)	15,08	16,81	7,88	13,57	0,14	1,09
6. <i>Leporinus taeniatus</i> (n=20)	15,57	17,33	10,01	14,41	4,83	1,09

A árvore filogenética construída a partir das sequências do gene COI (DNA Barcode) recuperou *Leporinus amblyrhynchus* proximamente relacionada à espécie nova, num clado por sua vez próximo à *L. microphthalmus*. Por outro lado, *L. paranensis* foi recuperada como grupo irmão de *L. taeniatus* (Figura 5).

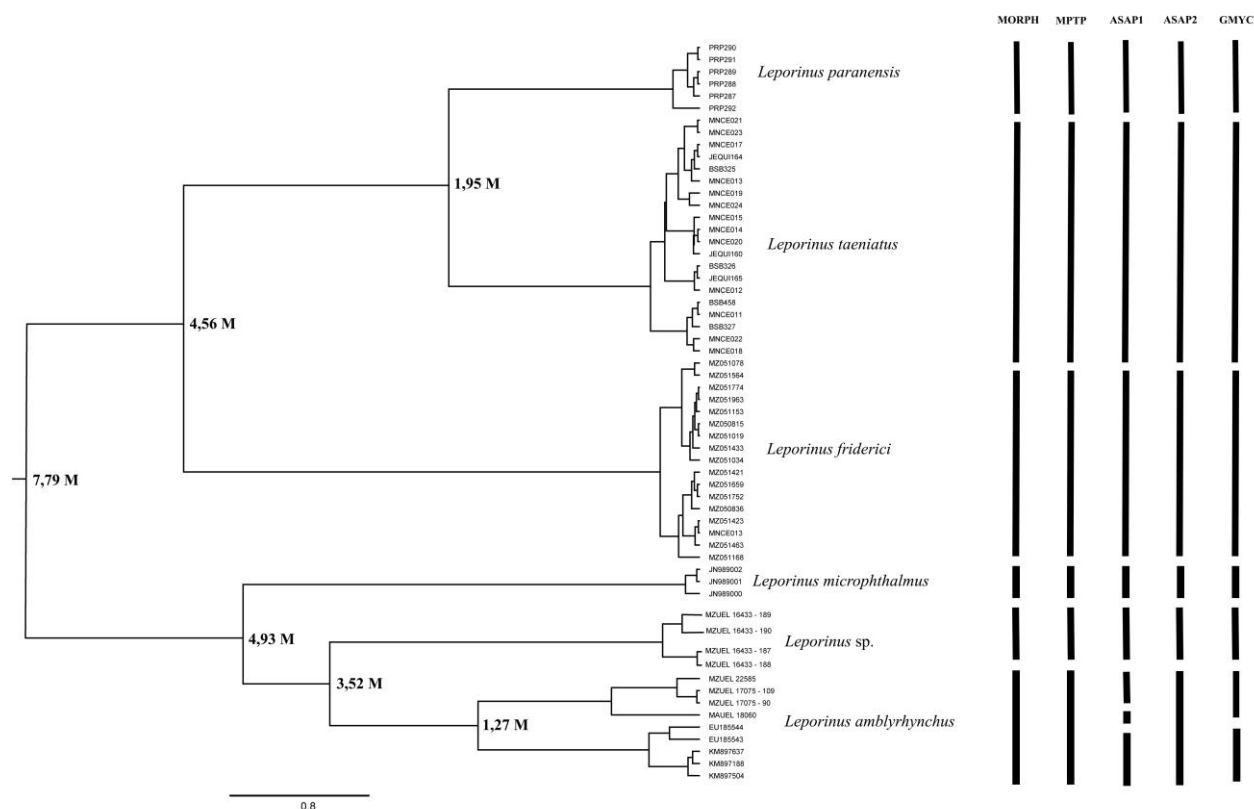


Figura 5. Árvore filogenética através de Inferência Bayesiana com base na sequência do gene COI (DNA Barcode). À direita da figura, os resultados das análises de delimitação de espécies. Morph refere-se ao resultado obtido nas análises morfológicas. ASAP1 refere-se ao resultado obtido na Partição 1, que teve ASAP-score de 3,0; ASAP2 refere ao resultado obtido na Partição 2, que teve ASAP-score de 4,0. Os números em cada clado referem-se às idades em milhões de anos atrás.

Relógio molecular. O gene COI analisado neste estudo com a taxa de mutação de 1% a cada milhão de anos, aponta uma separação de 1,27 milhões de anos entre *L. amblyrhynchus* do alto rio Paraná; entre *Leporinus sp.* e *L. amblyrhynchus* uma separação de 3,52 milhões de anos e uma separação entre *L. microphthalmus* e *Leporinus sp.* junto com *L. amblyrhynchus* de 4,93 milhões de anos.

Foram realizadas três análises de delimitação de espécies com base nos dados moleculares. A mPTP, que se baseia na topologia da árvore, recuperou seis MOTUs (*Molecular Taxonomic Units*), corroborando os achados com base na morfologia (Figura 5). Por outro lado, a ASAP recuperou oito MOTUs na sua primeira partição, que teve como ASAP-score 3,0, e seis MOTUs na sua segunda partição, que teve como ASAP-score 4,0. Já o GMYC recuperou 7 MOTUs.

3.3 REVISÃO TAXONÔMICA

3.3.1 *Leporinus amblyrhynchus* Britski & Garavello, 1987

Figuras 3, 6 e 7

Leporinus amblyrhynchus Britski & Garavello, 1987: 154, fig. 1a (localidade tipo: Fazenda Pau D'Alho, Rio Tietê, Itu, SP, holótipo MZUSP 14411).— Durães, Pompeu & Godinho, 2001: 183 (Ecologia alimentar de espécies de peixes). — Chiari e Sodré. 2001: 445 (análise molecular). — Vono, et al., 2002: 819-826 (Estudo de biologia reprodutiva). — Callisto, et al., 2002: 67-73 (a importância de larvas de quironomídeos como recurso alimentar para *Leporinus*). — Mendonça, Hahn & Loureiro-Crippa, 2004: 145 (dieta e atividade alimentar). — Shibatta, Gealh & Bennemann, 2007: 125 (levantamento de ictiofauna, Paranapanema). Gealh, 2007: 16 (check list, Paranapanema). — Brandão, et al., 2009: 451 (riqueza e a distribuição da fauna de peixes). — Maroneze, et al. 2011: 221 (análises do conteúdo estomacal de peixes). — Ramos, et al. 2013: 511 (checklist de peixes infectados por metacercárias). — AES Brasil. 2014. (Programa de Monitoramento e Conservação da Ictiofauna). — Tupinambás, et al., 2015: 157 (análise de conteúdo estomacal). — Brandão, et al. 2021: 18 (alteração da dieta devido a piscicultura). — Garcia et al., 2023: 95 (ecologia trófica). — Toledo-Piza et al., 2024: 52 (catálogo de espécies de Characiformes).

Diagnose. *Leporinus amblyrhynchus* diferencia-se de todos os anostomídeos, exceto as espécies de *Megaleporinus* e *Leporinus venerei*, por apresentar três dentes três no dentário (vs. quatro). *Leporinus amblyrhynchus* diferencia-se de todas as espécies de *Megaleporinus* e de *Leporinus venerei* por ter uma faixa longitudinal escura e barras verticais escuras no dorso (Figura 6; vs. uma a quatro máculas escuras médio-laterais arredondadas ou verticalmente alongadas). A espécie ainda é diagnosticada, juntamente com a espécie nova da bacia do rio São Francisco, pela boca subinferior com lábio dorsal intumescido (Figura 7); *Leporinus amblyrhynchus* diferencia-se de *Leporinus* sp. por apresentar três dentes no dentário (vs. quatro).



Figura 6. *Leporinus amblyrhynchus*: (A) holótipo, MZUSP 14411, 125.0 mm CP; (B) MZUSP 73653, 150 mm CP; (C) MZUSP 47832 43.0 mm CP.

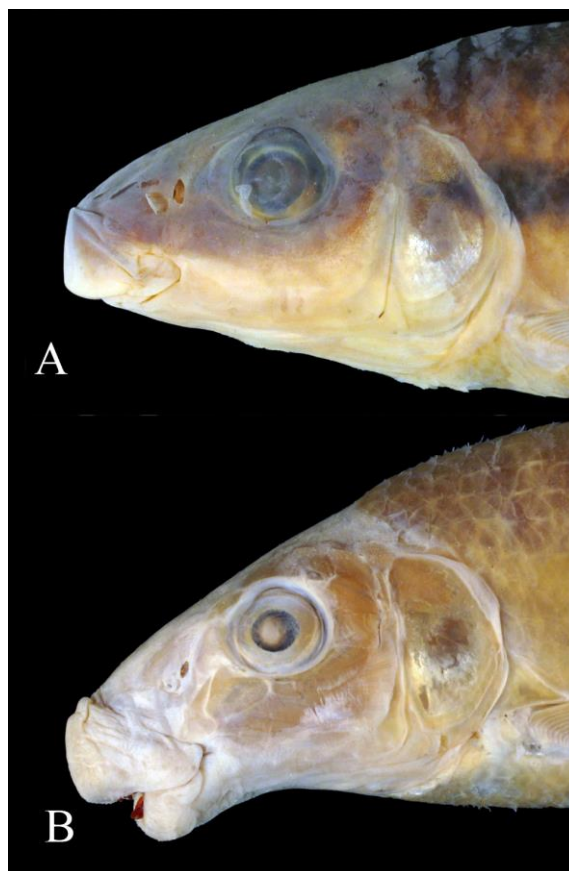


Figura 7. Cabeça de *Leporinus amblyrhynchus*, mostrando em detalhe o focinho proeminente, com boca subinferior e lábio dorsal intumescido em (A) MZUSP 73653, 150 mm CP; (B) MZUSP 2006, 181.0 mm SL.

Descrição. Espécie de médio porte, comparada aos congêneres, maior exemplar examinado medindo 197 mm CP; corpo relativamente baixo, maior altura do corpo 47,48 mm. Perfil dorsal da cabeça e do corpo suavemente convexo da ponta do focinho à origem da nadadeira dorsal, reto ao longo da base da nadadeira dorsal, reto da terminação da base da nadadeira dorsal à origem da nadadeira adiposa, e distintamente côncavo da origem da nadadeira adiposa à base do raio procurrente anterior da nadadeira caudal. Perfil ventral da cabeça e do corpo reto, ligeiramente côncavo da mandíbula inferior através da margem posterior do opérculo, suavemente convexo a partir desse ponto até a origem da nadadeira pélvica, reto da origem da nadadeira pélvica à origem da nadadeira anal, um tanto reto ao longo da base da nadadeira anal, e côncavo da terminação da base da nadadeira anal à base do raio procurrente anterior da nadadeira caudal. Maior profundidade do corpo na origem da nadadeira dorsal. Boca subinferior, abaixo do nível da orla da órbita; focinho arredondado, proeminente e longo sendo maior que o espaço interorbital; com lábio dorsal intumescidos (Figura 7); abertura bucal alinhada horizontalmente à margem ventral da série infraorbital. Pré-maxilar com três dentes incisiformes com borda reta e sem quilha lateral. Dentário com três dentes incisiformes com borda reta e sem quilha lateral. Dentes do pré-maxilar e dentário diminuindo de tamanho gradualmente no sentido sínfise-lateral. Primeiro arco branquial com 20 a 24 rastros espessos. Linha lateral completa com 38 - 41 escamas perfuradas, estendendo-se do supracleitro à base dos raios medianos da nadadeira caudal. Fileiras longitudinais de escamas entre a origem da nadadeira dorsal e a linha lateral 5. Fileiras longitudinais de escamas entre a linha lateral e a origem da nadadeira pélvica 4. Fileiras longitudinais de escamas ao redor do pedúnculo caudal 12. Escamas pré-dorsais da ponta da espinha supraoccipital à origem da nadadeira dorsal 11-13; 10 – 12 Barras transversais castanho-escuro no dorso do corpo. Nadadeira dorsal ii, 10 raios; sua origem ligeiramente anterior à origem da nadadeira pélvica. Nadadeira adiposa pequena, em forma de gota, sua origem aproximadamente na vertical através da base do último raio da nadadeira anal. Nadadeira peitoral 13 - 17; sua ponta se estende ligeiramente além da metade da distância entre as origens das nadadeiras peitoral e pélvica, perto da origem da nadadeira dorsal. Nadadeira pélvica 7-9 rios. Nadadeira anal ii - iii, 7-9. Nadadeira caudal bifurcada, lobo dorsal com 9 raios; lobo ventral com 8 raios. Vértex 38 (18) ou 39 (1), com costelas nas vértebras 5 a 23 (2) ou 24 (17). Supraneurais 5 (2) ou 6 (12).

Colorido. Corpo bege a amarronzado, gradualmente mais escuro no dorso (Figura 6). Faixa longitudinal escura médio-lateral cobrindo as escamas da linha lateral, estendida do pré-opérculo ao término do pedúnculo caudal. 12 a 15 barras escuras no dorso, cobrindo a fileira de escama mediana dorsal do corpo e a fileira imediatamente ventral a esta; com duas escamas de largura (nunca atingindo a faixa longitudinal escura). Nadadeiras hialinas ou homogeneamente amarronzadas. Juvenis (em torno de 50 mm de CP) com faixa longitudinal fragmentada e barras escuras dorsais mais longas e estreitas do que nos adultos (Figura 6C).

Colorido em vida. Quando vivos, os indivíduos tendem a ter o colorido de fundo mais claro, menos amarronzado. As barras escuras dorsais são pouco conspícuas. Olhos escuros, fundo levemente castanho, com um halo dourado ao redor da pupila. Parte dorsal da cabeça escura. Ventre do corpo claro, quase esbranquiçado, se alongando da boca até o pedúnculo caudal. Nadadeiras hialinas; nadadeira adiposa com pigmentação escura na parte dorsal da nadadeira. (Figura 8).



Figura 8. *Leporinus amblyrhynchus*: MZUEL 22585, rio pardo, fotografado em vida.

Distribuição geográfica. *Leporinus amblyrhynchus* ocorre amplamente na bacia do Alto rio Paraná (Figura 9).

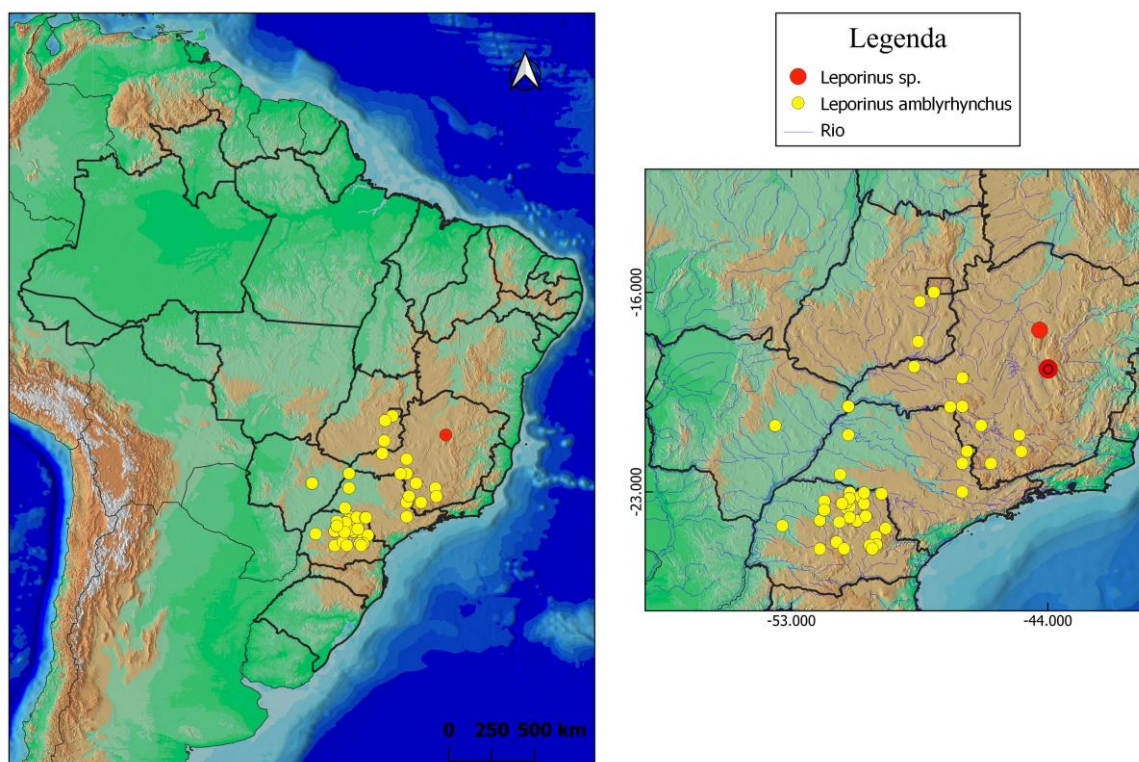


Figura 9. Mapa da América do Sul mostrando a ocorrência de *Leporinus amblyrhynchus* e de *Leporinus* sp.; em amarelo temos *L. amblyrhynchus* e em vermelho *Leporinus* Sp., o ponto vermelho com círculo preto dentro representam 2 pontos, que estão próximos.

Estado de conservação. *Leporinus amblyrhynchus* é considerada como Menos Preocupante (LC), segundo os critérios da IUCN por ser amplamente distribuída, presente em corpos d'água de menor porte (e.g., ribeirões) e comumente registrada e capturada em diversos locais na bacia do Alto Paraná.

Material Examinado. MZUEL 10868, 1, 146.52 mm CP; MZUEL 00938, 1, 63.96 mm CP; MZUEL 09349, 1, 76.53 mm CP; MZUEL 14553, 1, 174.09 mm CP; MZUEL 17786, 2, 167.57–167.73 mm CP; MZUEL 01594, 1, 143.5 mm CP; MZUEL 17075, 2, 173.11–175.93 mm CP; MZUEL 16949, 2, 152.23–178.84 mm CP; MZUEL 00366, 1, 110.13 mm CP; MZUEL 00351, 2, 102.07–111.9 mm CP; MZUEL 0046, 1, 105.82 mm CP; MZUEL 17786, 1, 135.2 mm CP; MZUEL 04479, 10, 116.2–157.67 mm CP; MZUEL 09430, 1, 110.01 mm CP; MZUEL 00363, 1, 105.85 mm CP; MZUEL 11628, 1, 148.4 mm CP; MZUEL 02860, 1, 115.26 mm CP; MZUEL 04985, 1, 112.04 mm CP; MZUEL 11629, 1, 136.19 mm CP; MZUEL 11297, 1, 179.53 mm CP; MZUEL 00459, 1, 156.43 mm CP; MZUEL 00219, 1, 162.34 mm CP;

MZUEL 11626, 2, 126.3-143.17 mm CP; MZUEL O1594, 1, 120.38 mm CP; MZUEL 00360, 5, 89.05-103.11 mm CP; MZUEL 04856, 3, 119.1-135,53 mm CP; MZUEL 04667, 2, 132.65-137.07 mm CP; MZUEL 00361, 1, 162.29 mm CP; MZUEL 11627, 2, 137.69-157.98 mm CP; MZUEL 18060, 3, 134.11-164.12 mm CP; MZUEL 22585, 1, 146.04 mm CP; MZUEL 02542, 3, 93.13-127.53 mm CP; MZUEL 00362, 4, 94.88-107.4 mm CP; ZUEC-PIS 17482, 7, 79.54-145.66 mm CP; MZUEL 04695, 7, 91.83-114.55 mm CP; MZUEL 02273, 1, 78.5 mm CP; MZUEL 09262, 1, 65.9 mm CP; MZUEL 02605, 1, 81.3 mm CP; MZUEL 00943, 1, 78.15 mm CP; MZUEL 1081, 1, 95.32 mm CP; MZUEL 00419, 1, 95.1 mm CP; MZUEL 16368, 1, 109.66 mm CP; MZUEL 19521, 19, 81.15-142.67 mm CP; NUP 7846, 2, 160.76-163.57 mm CP; NUP 3887, 1, 194.38 mm CP; NUP 14468, 3, 162.59-189.21 mm CP; NUP 7852, 2, 144.23-146.8 mm CP; NUP 10648, 4, 126.14-160.18 mm CP; NUP 18154, 1, 174.87 mm CP; NUP 14449, 4, 100.1-183.84 mm CP; NUP 8801, 127.6 mm CP; NUP 2677, 1, 94.22 mm CP; NUP 7828, 1, 129.2 mm CP; NUP 13858, 2, 98.39-113.87 mm CP; NUP 9230, 1, 86.33 mm CP; NUP 9075, 1, 81.16 mm CP; NUP 1898, 2, 105.02-114.54 mm CP; NUP 5554, 3, 97.94-136.79 mm CP; NUP 1510, 1, 118.66 mm CP; NUP 8802, 1, 140.24 mm CP; NUP 11537, 1, 105.15 mm CP; NUP 7827, 1, 137.14 mm CP; NUP 11671, 1, 116.4 mm CP; NUP 2937, 3, 45.01-93.46 mm CP; NUP 8610, 1, 108.47 mm CP; NUP 1486, 2, 91.1-119.4 mm CP; NUP 9188, 1, 53.66 mm CP; NUP 023212, 1, 60.38 mm CP; NUP 15975, 1, 84.56 mm CP; CP; NUP 1445, 1, 78.39 mm; NUP 2406, 5, 70.44-90.36 mm CP; NUP 13715, 1, 95 mm CP; NUP 9229, 1, 70.34 mm CP; NUP 11023, 1, 85.96 mm CP; NUP 2076, 5, 95.15-148.35 mm CP; NUP 1176, 18, 83.63-159.42 mm CP; MHNCIN 8827, 1, 136 mm CP; MHNCI 8058, 2, 125-156 mm CP; MHNCI 7993, 1, 135 mm CP.

3.3.2 *Leporinus* sp. (São Francisco)

Figuras 10 e 11

Leporinus amblyrhynchus.—Alves & Pompeu, 2001: 169 (rio Cipó, 18°41'4S 43°59'18''W).— Santos et al., 2013: 282. (check list do rio Itapecerica, afluente do alto São Francisco). — Dos Santos & de Britto, 2021: 25 (Check list dos peixes do alto rio Paraúna e alto rio Santo Antônio).

Diagnose. *Leporinus* sp. (São Francisco) difere de todas as congêneres, exceto *L. britskii*, *L. geminis*, *L. microphysus*, *L. parvulus*, *L. sidlauskasi*, *L. taeniatus*, *L. taeniofasciatus*, *L. unitaeniatus*, e *L. vanzoi* por apresentar uma faixa escura longitudinal médio-lateral e barras escuras no dorso (Figura 10, vs. máculas escuras arredondadas, barras escuras transversais, ou duas ou mais faixas escuras longitudinais). A espécie difere de *L. geminis*, *L. microphysus*, *L. parvulus*, *L. sidlauskasi*, *L. taeniatus*, *L. taeniofasciatus*, *L. unitaeniatus*, e *L. vanzoi* por apresentar 12 séries de escamas ao redor do pedúnculo caudal (vs. 16), e de *L. geminis*, *L. unitaeniatus*, e *L. vanzoi* por ter três dentes no pré-maxilar (vs. quatro). A espécie nova difere de *L. britskii* por possuir 38 a 40 escamas na linha lateral (vs. 37 a 39), e pelo focinho proeminente com lábio dorsal intumescido (vs. focinho relativamente curto, e lábio dorsal não intumescido); e *Leporinus* sp. se difere de *L. amblyrhynchus* por possuir quatro dentes no dentário (vs. três).



Figura 10. *Leporinus* sp: (A) MZUEL 16433, 160,01 mm CP; (B) MZUEL 16433, 126,67 mm CP; (C) MZUEL 16433, 94,97 mm CP; fotografia em álcool.

Descrição. Espécie de médio porte, comparada aos congêneres, maior exemplar examinado medindo 160,01 mm CP; corpo relativamente baixo, maior altura do corpo 37,72 mm. Perfil dorsal da cabeça e do corpo suavemente convexo da ponta do focinho à origem da nadadeira dorsal, reto ao longo da base da nadadeira dorsal, reto da terminação da base da nadadeira dorsal à origem da nadadeira adiposa, e distintamente côncavo da origem da nadadeira adiposa à base do raio procurrente anterior da nadadeira caudal. Perfil ventral da cabeça e do corpo reto, ligeiramente côncavo da mandíbula inferior através da margem posterior do opérculo, suavemente convexo a partir desse ponto até a origem da nadadeira pélvica, levemente convexo da origem da nadadeira pélvica à origem da nadadeira anal, um tanto reto ao longo da base da nadadeira anal, e côncavo da terminação da base da nadadeira anal à base do raio procurrente anterior da nadadeira caudal. Maior altura do corpo na origem da nadadeira dorsal. Boca sub-inferior, abaixo do nível da orla da órbita; focinho arredondado, proeminente e longo sendo maior que o espaço interorbital; com lábio dorsal intumescidos; abertura bucal alinhada horizontalmente à margem ventral da série infraorbital. Pré-maxilar com 4 dentes incisiformes com borda reta e sem quilha lateral. Dentário com 3 dentes incisiformes com borda reta e sem quilha lateral. Dentes do pré-maxilar e dentário diminuindo de tamanho gradualmente no sentido sínfise-lateral. Linha lateral completa com 38 - 40 escamas perfuradas, estendendo-se

do supracleitro à base dos raios medianos da nadadeira caudal. Fileiras longitudinais de escamas entre a origem da nadadeira dorsal e a linha lateral 5. Fileiras longitudinais de escamas entre a linha lateral e a origem da nadadeira pélvica 4. Fileiras longitudinais de escamas ao redor do pedúnculo caudal 12. Escamas pré-dorsais da ponta da espinha supraoccipital à origem da nadadeira dorsal 11-12. Nadadeira dorsal ii, 10 raios; sua origem ligeiramente anterior a origem da nadadeira pélvica. Nadadeira adiposa pequena, em forma de gota, sua origem aproximadamente na vertical através da base do último raio da nadadeira anal. Nadadeira peitoral 15 - 16; sua ponta se estende ligeiramente além da metade da distância entre as origens das nadadeiras peitoral e pélvica, perto da origem da nadadeira dorsal. Nadadeira pélvica 8-9 raios. Nadadeira anal ii, 8-9. Nadadeira caudal bifurcada, lobo dorsal com 9 raios; lobo ventral com 8 raios. Vértex 38, com costelas nas vértebras 5 a 24. Supraneurais 6.

COLORIDO. Corpo bege a amarronzado, gradualmente mais escuro no dorso (Figuras 10 e 11). Faixa longitudinal escura médio-lateral cobrindo as escamas da linha lateral, estendida do pré-opérculo ao término do pedúnculo caudal. 12 a 15 barras escuras no dorso, cobrindo a fileira de escama mediana dorsal do corpo e a fileira imediatamente ventral a esta; com duas escamas de largura (nunca atingindo a faixa longitudinal escura). Nadadeiras hialinas ou homogeneamente amarronzadas.

Colorido em vida. Quando vivos, os indivíduos tendem a ter o colorido de fundo mais claro, menos amarronzado puxando levemente para um amarelado; As barras escuras dorsais são pouco conspícuas; Olhos escuros, fundo levemente castanho, com um halo dourado ao redor da pupila. Parte dorsal da cabeça escura. Ventre do corpo claro, quase esbranquiçado puxando levemente para um amarelado, se alongando da boca até o pedúnculo caudal. Nadadeiras hialinas; nadadeira adiposa com pigmentação escura na parte dorsal da nadadeira; manchas em formato de pontos na abertura nasal ao final do opérculo.(Figura 11).



Figura 11. *Leporinus* sp. (São Francisco): MZUEL 16433, rio São Francisco, fotografia em vida.

Distribuição geográfica. *Leporinus* sp. ocorre na bacia do rio São Francisco, sendo registrado no rio Riachão; rio Itapecerica e rio Cipó (Figura 9).

Estado de conservação. *Leporinus* sp. (São Francisco) é conhecida de localidades diferentes na bacia do rio São Francisco, e aparentemente tem preferências por áreas com poções e corredeiras intercaladas (Alves & Pompeu, 2001; Obs. Pess.). Os recentes registros da espécie indicam que ela ocorre em ribeirões próximos à rodovias e alterados pela ação antrópica (Figura 12). Não há indícios de que a espécie esteja atualmente em risco de ameaça de extinção e, portanto, a espécie poderia ser considerada como uma espécie Menos Preocupante (LC), segundo os critérios da IUCN.



Figura 12. Fotografia da localidade tipo de *Leporinus* sp. (São Francisco), no rio Riachão, bacia do rio Cipó, drenagem do rio São Francisco, em .

Material Examinado. MZUSP 4873, 1, 132.33 mm CP; MZUSP 73672, 1, 120.4 mm CP; MZUSP 23514, 2, 124.06-126.5 mm CP; MZUEL 16433, 12, 96.35-160.01 mm CP.

4 DISCUSSÃO

A análises de distância genética corroborou que todas as espécies previamente identificadas através de dados morfológicos são distintas entre si, incluindo uma espécie nova (Tabela 2). Os dados também corroboraram a proximidade entre esta e *Leporinus amblyrhynchus*. A distância genética em torno de 7% entre a espécie nova e *L. amblyrhynchus* é similar à distância de espécies pouco relacionadas entre si de outros gêneros de Anostomidae, como *Hypomasticus* (Birindelli et al., 2020), *Schizodon* (Ramirez et al., 2020), *Laemolyta* (Ramirez & Galetti, 2015), e *Megaleporinus* (Ramirez et al., 2017). Por outro lado, espécies próximas de diversos gêneros de Anostomidae apresentam distância genética bem inferior ao obtidos para as espécies foco do presente estudo como, por exemplo, *Hypomasticus despaxi* e *H. lineomaculatus* (2.6%; Birindelli et al., 2020a), *Megaleporinus elongatus*, e *M. obtusidens* (2.74%; Birindelli et al., 2020b), *Laemolyta fernandezi* e *L. proxima* (0.92-1.7%, Ramirez & Galletti, 2015), e *Schizodon borelli* e *S. intermedius* (1,0%, Ramirez et al., 2021). O mesmo ocorre com algumas espécies de *Leporinus*, como *L. vanzoi* e *L. sidlauskasi* (1,5%; Ito et al., 2023) ou *L. vanzoi* e *L. unitaeniatus* (3%; Ito et al., 2023). Desta forma, a distância genética entre *L. amblyrhynchus* e a espécie nova é condizente com a hipóteses de que são espécies distintas.

A proximidade entre *L. amblyrhynchus* e a espécie nova também foi corroborada através da inferência bayesiana (Figura 5). Através da análise de Máxima-Verossimilhança realizamos a análise de delimitação de espécies mPTP, que corroborou a presença de seis espécies e, portanto, da validade da espécie nova. A outra análise de delimitação utilizada com base em dados moleculares foi a ASAP, que utiliza a matriz com as sequências alinhadas. A ASAP resulta em diferentes partições que são escolhidas através do ASAP-score. Segundo Puillandre et al. (2020), o ASAP-score leva em consideração dois critérios, o valor p e o Barcode gap, e os resultados com menores ASAP-score são geralmente os melhores. No entanto, de acordo com os mesmos autores, há alguns casos em que os interessados devem optar por partições que não apresentam os menores ASAP-score, o que deve ser avaliados pelos autores interessados na análise. No nosso caso, a segunda melhor partição tem uma melhor correspondência com os resultados baseados na morfologia, com base nos dados moleculares de distância genética (Tabela 2), e também no resultado da análise de delimitação de espécies com base no mPTP. A segunda partição teve ASAP-score de 4,0, e resultou no reconhecimento de seis espécies, enquanto a primeira partição teve ASAP-score de 3,0 e resultou em nove espécies, sendo 3

delas formada por amostras de *L. amblyrhynchus*. Ambas as partições corroboraram o reconhecimento da espécie nova como uma entidade específica distinta.

Além disso, a datação conduzida neste estudo por meio da inferência bayesiana para a origem das linhagens, estima uma divergência de aproximadamente 3,52 milhões de anos entre a espécie nova e *L. amblyrhynchus*, corroborando com a hipótese de especiação descrita por Albert & Reis (2011), que postularam que a maior parte da ictiofauna Neotropical divergiu entre 3,0 e 10 milhões de anos atrás, corroborando assim com as análises de delimitação de espécies no reconhecimento da espécie nova.

A distância genética entre os indivíduos estudados de *Leporinus amblyrhynchus* é relativamente grande (1,76%) quando comparada à distância das outras espécies (Tabela 2). Por exemplo, a distância entre exemplares de drenagens diferentes de *L. taeniatus* (São Francisco, Jequitinhonha e Apodi) foi de apenas 1,09%. Valores igualmente baixos foram encontrados para a maioria das espécies de Anostomidae analisadas até o momento (Ramirez et al., 2015, 2017, 2021; Birindelli et al., 2020a, b; Ito et al., 2023). Por outro lado, a distância entre os indivíduos de *L. amblyrhynchus* é bem mais baixa do que a distância com seu congêner mais próximo (7%, com a espécie nova). Além disso, essa distância ainda está abaixo dos 2%, que é o limite considerado por muitos autores como o limiar entre duas espécies distintas (Pereira, 2011).

Ao definir o limite de distância genética entre espécies, é fundamental considerar outras características do táxon em estudo (Pereira, 2013; Ward, 2009). Esse valor serve apenas como uma referência inicial para investigar a divergência entre as linhagens. Outro ponto crucial é a análise e comparação das variações intraespecíficas e da divergência interespecífica (Moritz & Cícero, 2004; Meyer & Paulay, 2005).

Portanto, embora a distância de 1,76% dentro de *Leporinus amblyrhynchus* seja uma alta diferenciação intraespecífica, ela permanece abaixo do limiar de 2,0%, frequentemente adotado por muitos pesquisadores como o ponto de corte entre duas espécies distintas (Pereira et al., 2015). Ainda se observa um “*barcoding gap*” considerável quando comparado com seu congêner mais próximo (7%, com a espécie nova).

Desta forma, consideramos que *L. amblyrhynchus* é uma única espécie que talvez apresente uma estruturação populacional mais significativa do que a maioria das espécies de Anostomidae, porém ainda condizente com as variações encontradas entre indivíduos da mesma espécie. No entanto, para uma compreensão mais aprofundada dessa variação intra-específica, são necessários estudos adicionais de genética de populações em *L. amblyrhynchus*.

A análise de morfometria em *L. amblyrhynchus* e *Leporinus* sp. (rio São Francisco) indicou uma similaridade grande entre as espécies. Além do formato do corpo, o colorido, o formato proeminente do focinho com o intumescimento do lábio superior são características compartilhadas entre as duas espécies. A grande maioria dos dados morfométricos e merísticos também apresentaram uma grande sobreposição. A única diferença morfológica observada entre as duas espécies foi o número de dentes no dentário. A espécie nova do rio São Francisco apresenta quatro dentes no dentário, enquanto que *L. amblyrhynchus* apresenta apenas três. Apesar deste caráter ser bastante conservado nas duas espécies, bem como nas demais espécies de Anostomidae (Britski & Birindelli, 2008), nós observamos uma pequena variação no número de dentes em 2% dos exemplares de *L. amblyrhynchus* que é aqui interpretada como uma variação intra-populacional, possivelmente associada à exemplares anômalos. Dentro dos Anostomidae, a evolução do número de dentes sugere que o padrão de quatro dentes é uma condição primitiva (Britski & Birindelli, 2008; Ramirez et al., 2016), enquanto a redução para três dentes é derivada e ocorre de forma convergente em várias espécies, como em *Megaleporinus* e *L. amblyrhynchus*. Considerando isso, nos exemplares anômalos onde foram encontrados quatro dentes no pré-maxilar, temos a hipótese de que essa anomalia pode ser uma expressão genética da característica mais primitiva. Assim, a grande maioria das espécies de Anostomidae e de *Leporinus* possui quatro dentes no dentário (Britski & Birindelli, 2008). As únicas espécies de Anostomidae que apresentam apenas três dentes no dentário são as dez incluídas em *Megaleporinus* (Ramirez et al., 2016) e *Leporinus venerei* (Britski & Birindelli, 2008). As espécies de *Megaleporinus* diferem de *L. amblyrhynchus* por apresentarem cromossomo sexual do sistema Z/W (Ramirez et al., 2016). Além disso, a distância genética no DNA Barcode entre *L. amblyrhynchus* e qualquer espécie de *Megaleporinus* é maior do que 14% (de acordo com os resultados de uma busca no BLAST-GenBank). Por outro lado, a presença de três dentes no pré-maxilar e quatro no dentário na espécie nova é uma combinação compartilhada com diversas espécies de Anostomidae, incluindo *Hypomasticus despaxi*, *H. lineomaculatus*, *H. megalepis*, *Megaleporinus garmani*, *Leporinus amae*, *L. bahiensis*, *L. britskii*, *L. guttatus*, *L. marcgravii*, *L. microphthalmus*, *L. melanopleura*, *L. melanopleurodes*, *L. microphysus*, *L. multimaculatus*, *L. octomaculatus*, *L. paranensis*, *L. reticulatus*, *L. sexstriatus*, *L. striatus*, *L. taeniatus*, *L. taeniofasciatus*, e *L. torrenticola*. Destas, *L. britskii*, *L. microphysus*, *L. taeniatus*, *L. taeniofasciatus* e *L. torrenticola* compartilham com a espécie nova o mesmo padrão de colorido (uma faixa longitudinal e barras transversais no dorso). Apesar disso, a espécie nova difere de *L. microphysus*, *L. taeniatus*, *L. taeniofasciatus*, e *L. torrenticola* pela presença de 16 séries de escamas ao redor do pedúnculo caudal, e de *L. britskii*

por possuir 38 a 40 escamas na linha lateral (vs. 37 a 39), e pelo focinho proeminente com lábio dorsal intumescido. A distância genética entre as duas espécies é de cerca de 10% no DNA Barcode (de acordo com uma busca no BLAST-GenBank).

A relação filogenética de espécies irmãs entre *L. amblyrhynchus* e a espécie nova parece bem corroborada tanto pela similaridade morfológica entre as duas espécies, especialmente com relação ao focinho proeminente com lábio dorsal intumescido, como pela similaridade no DNA Barcode. Apesar disso, as relações filogenéticas entre essas duas espécies e os demais Anostomidae ainda precisa ser melhor investigada. *Leporinus* é um gênero parafilético (Sidlauskas & Vari, 2008; Ramirez et al., 2015), com uma diversidade grande (cerca de 76 espécies válidas, de acordo com Toledo-Piza et al., 2024). Além do desconhecimento sobre a morfologia (em especial osteologia) da maioria das espécies do gênero, poucas espécies possuem dados moleculares disponíveis para comparações. Portanto, mais esforços precisam ser feitos visando ampliar nosso banco de dados moleculares e morfológicos das espécies de *Leporinus*. De qualquer forma, as relações filogenéticas entre *L. amblyrhynchus* (e a espécie nova) e os demais Anostomidae não parece ser trivial e, portanto, pode revelar a descoberta de uma linhagem relativamente antiga e distinta em *Leporinus*, ou talvez em Anostomidae.

5 REFERÊNCIAS

Albert JS, Petry P, Reis RE. Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. Berkeley: University of California Press; 2011.

AES Brasil. (2014). Programa de Monitoramento e Conservação da Ictiofauna. Subprograma de Ictiofauna dos Reservatórios com Espécies Nativas de Peixes (Licença de Operação No246/2003 (1aRenovação) Relatório Consolidado de Atendimento). AES Brasil.

Alves CBM, Pompeu PS. A fauna de peixes da bacia do rio das Velhas no final do século XX. Peixes do Rio das Velhas: passado e presente. 2001. p.165-187.

Birindelli JLO, Melo BF, Ribeiro-Silva LR, Diniz D, Oliveira C. A new species of *Hypomasticus* from Eastern Brazil based on morphological and molecular data (Characiformes, Anostomidae). *Copeia*. 2020; 108(2):416–25. <https://doi.org/10.1643/CI-19-335>

Birindelli JLO, Sidlauskas BLP. How far has Neotropical Ichthyology progressed in twenty years?. *Neotropical Ichthyology*. 2018; 16(03): e180128. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20180128>

Birindelli JLO, Britski HA. Two new species of *Leporinus* (Characiformes: Anostomidae) from the Brazilian Amazon, and redescription of *Leporinus striatus* Kner 1858. *J Fish Biol*. 2013; 83(5):1128–60. <https://doi.org/10.1111/jfb.12206>

Bouckaert R, Drummond A. bModelTest: Bayesian phylogenetic site model averaging and model comparison. *BMC Evol Biol*. 2017; 17: 1-11 <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0890-6>

Brandão H, Vidotto-Magnoni AP, Ramos IP, Carvalho ED. Assessment of the ichthyofauna in stretches under the influence of Salto Grande Reservoir (Middle Paranapanema River, SP/PR, Brazil). *Acta Limnol Bras*. 2009; 21(4):451-63.

Brandão H, Lange D, Blanco DR, Ramos IP, Sousa JQ, Nobile AB, Carvalho ED. Fish-food interaction network around cage fish farming in a neotropical reservoir. *Acta Limnologica Brasiliensia*. 2021; 33: e18. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X10919>

Britski HA, Birindelli JLO. Description of a new species of the genus *Leporinus* Spix (Characiformes: Anostomidae) from the rio Araguaia, Brazil, with comments on the taxonomy and distribution of *L. parae* and *L. lacustris*. *Neotrop Ichthyol*. 2008; 6(1):45-51. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252008000100005>

Burns MD, Chatfield M, Birindelli JLO, Sidlauskas BL. Systematic assessment of the *Leporinus desmotes* species complex, with a description of two new species. *Neotrop Ichthyol*. 2017; 15(2): e160166. <http://dx.doi.org/10.1590/1982-022420160166>

Callisto, Marco, et al. "Aplicação de um protocolo de avaliação rápida da diversidade de habitats em atividade de ensino e pesquisa (MG-RJ). *Acta Limnologica Brasileira*, v. 14, n. 1, p. 91-98, 2002. Disponível em: <http://jbb.ibict.br/handle/1/708>

Chiari L, Sodr e LMK. Study of eight species of the Anostomidae family (Pisces, Characiformes) by RAPD analysis. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 23, n. 2, p. 445-451, 2001.

Dos Santos SA, de Britto MR. The ichthyofauna of a poorly known area in the middle-southern Espinhaço mountain range, state of Minas Gerais, Brazil: diagnostics and identification keys. *Zookeys*. 2021 Aug 3; 1054:25-66. doi: 10.3897/zookeys.1054.67554. PMID: 34393562; PMCID: PMC8355004.

Durães R, Pompeu P dos S, Godinho AL. Alimenta o de quatro espécies de Leporinus (Characiformes, Anostomidae) durante a forma o de um reservat rio no sudeste do Brasil. *Iheringia. Série Zoologia*. 2001; (90), 183–191. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212001000100019>

Drummond AJ, Bouckaert RR. Bayesian evolutionary analysis with BEAST. Cambridge University Press, 2015.

Drummond, A.J., Rambaut, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol*. 2007; 7: 214. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-214>

Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32(5):1792–97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

Frantine-Silva W, Sofia SH, Orsi ML, Almeida FS. DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. *Mol Ecol Resour*. 2015; 15: 1226-1237. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12385>

Garavello JC, Britski HA. Duas novas especies de leporinus spix, 1829, da bacia do alto parana (teleostei , anostomidae). *Comunicacoes do Museu de Ciencias da Pucrs*. 1987 ;(44): 153-65.

Garavello JC, Britski HA. Family Anostomidae (Headstanders). P.71-84. In: Reis, R.E., Kullander, S.O. & Ferraris, C.J. (eds.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre, EDIPUCRS. 2003

García-Melo, Jorge E, Oliveira C, Da Costa S, Guilherme J, Ochoa-Orrego LE, Garcia PLH, Maldonado-Ocampo JA. Species delimitation of neotropical Characins (Stevardiinae): Implications for taxonomy of complex groups. *PLOS ONE*. 2019; 14(6): e0216786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216786>

Gealh AM. Ictiofauna dos rios Fortaleza, Iap , alto e médio Tibagi. In: Melo MS, Moro RS, Guimarães GB, editors. Patrim nio natural dos Campos Gerais do Paraná. Ponta Grossa: Editora UEPG; 2007. p.151–62. Available from: http://ri.uepg.br:8080/riuepg/bitstream/handle/123456789/460/CAP%e3%8dTULO16_IctiofaunaRiosFortaleza.pdf?sequence=1

Hammer  , Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron*. 2001; 4(1):1–09.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Waard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci*. 2003; 270(1512):313–21. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>

Ito ISB, Souza-Shibatta L, Venturieri M, Birindelli JLO. A new species of *Leporinus* (Characiformes: Anostomidae) from the Serra do Cachimbo, Pará State, Brazil. *Neotropical Ichthyology*. 2023; 21(3), e230058. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2023-0058ite>

Jolicoeur P, James EM. "Size and shape variation in the painted turtle. A principal component analysis." *Growth* 24.4; 1960: 339-354.

Kapli T, Lutteropp S, Zhang J, Kobert K, Pavlidis P, Stamatakis A, Flouri T. Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. *Bioinformatics*. 2016; 33(11): 1630-1638. doi:10.1093/bioinformatics/btx025

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>

Langeani, F., Castro, R. M. C., Oyakawa, O. T., Shibatta, O. A., Pavanelli, C. S., & Casatti, L. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica*. 2007; 7(3): 181-197. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032007000300020>

Maroneze, D.M., Tupinambás, T.H., Alves, C.B.M. *et al.* Fish as ecological tools to complement biodiversity inventories of benthic macroinvertebrates. *Hydrobiologia*. 2011;673: 29–40. <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0747-8>

Mendoza JRMS. Plant diversity and galling arthropod diversity searching for taxonomic patterns in an animal-plant interaction in the Neotropics. *Bol Soc Argent Bot* 2007; 42: 347-357

Mendonça FP, Hahn, N.S, Loureiro-Crippa VE. Feeding aspects of *Leporinus amblyrhynchus* (Characiformes: Anostomidae) in the first stages of formation of a Neotropical reservoir, Brazil. *Neotropical Ichthyology*. 2004; 2(3), 145–150. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252004000300006>

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. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *PLOS Biology*. 2004; 2(10): e354. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020354>

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>

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* 22. 2011 71–79. doi:10.3109/19401736.2010.532213.

Sabaj P, Mark H. "Photographic Atlas of Fishes of the Guiana Shield," Bulletin of the Biological Society of Washington 17. 2009 (1): 52-59. <https://doi.org/10.2988/0097-0298-17.1.52>

Pons J, Barraclough, TG, Gomez-Zurita J, Cardoso A, Duran DP, Hazell S, Vogler AP. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic biology*. 2006; 55(4): 595-609. <https://doi.org/10.1080/10635150600852011>

Pugedo ML, de Andrade Neto FR, Pessali TC, Birindelli JLO, Carvalho DC. Integrative taxonomy supports new candidate fish species in a poorly studied neotropical region: the Jequitinhonha River Basin. *Genetica*. 2016;144: 341–349. <https://doi.org/10.1007/s10709-016-9903-4>

Puillandre N, Brouillet S, Achaz G. ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Mol Ecol Resour*. 2021; 21(2):609–20. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281>

Ramirez JL, Birindelli JL, Carvalho DC, Affonso PRAM, Venere PC, Ortega H, Carrillo-Avila M, Rodríguez-Pulido JA, Galetti PM. "Revealing hidden diversity of the underestimated neotropical ichthyofauna: DNA barcoding in the recently described genus *Megaleporinus* (Characiformes: Anostomidae)." *Frontiers in Genetics* 2017; 8: 293126. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00149>

Ramirez JL, Birindelli JL, Galetti Jr. PM. A new genus of Anostomidae (Ostariophysi: Characiformes): diversity, phylogeny and biogeography based on cytogenetic, molecular and morphological data. *Mol Phylogenet Evol*. 2017; 107:308–23. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.11.012>

Ramirez JL, Santos CA, Machado CB, Oliveira AK, Garavello JC, Britski HA et al. Molecular phylogeny and species delimitation of the genus *Schizodon* (Characiformes, Anostomidae). *Mol Phylogenet Evol*. 2020; 153:106959. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106959>

Ramirez JL, Galetti Jr. PM. DNA barcode and evolutionary relationship within *Laemolyta Cope, 1872* (Characiformes: Anostomidae) through molecular analyses. *Mol Phylogenet Evol*. 2015; 93:77–82. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.07.021>

Ramos IP, Franceschini L, Zago AC, Zica ÉOP, Wunderlich AC, Carvalho ED, Silva RJ. New host records and a checklist of fishes infected with *Austrodiplostomum compactum* (Digenea: Diplostomidae) in Brazil. *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária*. 2013; 22(4): 511–518. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000400010>

Reis RE, Albert JS, Di Dario F, Mincarone MM, Petry P, Rocha LA. Fish biodiversity and conservation in South America. *J Fish Biol*. 2016; 89(1):12–47. <https://doi.org/10.1111/jfb.13016>.

Santos, Hélio, et al. "Assessment of fish assemblage in an urban system, Itapecerica River, upper São Francisco River basin, Divinópolis, Minas Gerais, Brazil." *Check List* 2013; 9.3: 482-486.

Sidlauskas BL, Birindelli JLO. Family Anostomidae - toothed headstanders. In: P. Van der Sleen, Albert JS, editors. Field guide to the fishes of the Amazon, Orinoco & Guianas. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 2017, p.82–89.

Sidlauskas BL, Mol JH, Vari RP, Dealing with allometry in linear and geometric morphometrics: a taxonomic case study in the *Leporinus cylindriformis* group (Characiformes: Anostomidae) with description of a new species from Suriname. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 2011; 162(1): 103-130.

Sidlauskas BL, Vari RP. Phylogenetic relationships within the South American fish family Anostomidae (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). *Zool J Linn Soc-Lond*. 2008; 154(1):70–210. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2008.00407.x>

Shibatta OA, Gealh AM, Bennemann ST. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. *Biota Neotropica*. 2007; 7(2): 125–134. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032007000200014>

Stecher G, Tamura K, Kumar S. Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) for macOS. *Molecular biology and evolution*. 2020; 37(4): 1237-1239. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz312>

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. 2013; 30(12): 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>

Taylor WR, Van Dyke GG. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium*. 1985; 9(2):107–09.

Toledo-Piza M, Baena EG, Dagosta FCP, Menezes NA, Andrade M, Benine RC, Zanata AM. Checklist of the species of the Order Characiformes (Teleostei: Ostariophysi). *Neotropical Ichthyology*, 2024; 22(1): e230086. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2023-0086>

Vono V, Silva LGM, Maia BP, Godinho HP. Biologia reprodutiva de três espécies simpátricas de peixes neotropicais: *Pimelodus maculatus* Lacépede (Siluriformes, Pimelodidae), *Leporinus amblyrhynchus* Garavello & Britski e *Schizodon nasutus* Kner (Characiformes, Anostomidae) do recém-formado Reservatório de Miranda, Alto Paraná. *Revista Brasileira de Zoologia*. 2002; 19(3): 819-826. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752002000300020>

Ward RD, Zemlak 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>.

Ward RD, Hanner R, Hebert PDN. *Review paper the campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL*. *J. Fish Biol*. 2009; 74: 329-356. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02080.x>

Winterbottom R. Systematics, osteology and phylogenetic relationships of fishes of the ostariophysan subfamily Anostominae (Characoidei, Anostomidae). *Life Science Contribution, Royal Ontario Museum*, 1980; 123: 1-112.

Weitzman SH. The osteology of *Brycon meeki*, a generalized characid fish, with an osteological definition of the family. *Stanford Ichthyol Bull.* 1962; 8: 1-77.

Zhang Y, Zhang F, Li X, Baller JA, Qi Y, Starker CG, Voytas DF. Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant physiology*, 2013; 161(1): 20-27. <https://doi.org/10.1104/pp.112.205179>