

ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE
MESTRADO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE

PATRÍCIA CALEGARI FAGUNDES

TAXONOMIA INTEGRATIVA: COMBINANDO DADOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES NO ESTUDO
DE *PAREIORHAPHIS HYSTRIX* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE)

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA
BIODIVERSIDADE

**TAXONOMIA INTEGRATIVA: COMBINANDO DADOS MORFOLÓGICOS E
MOLECULARES NO ESTUDO DE *PAEIORHAPHIS HYSTRIX* (SILURIFORMES,
LORICARIIDAE)**

Patrícia Calegari Fagundes

Orientador: Dr. Roberto E. Reis

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE - RS - BRASIL

2019

“Conhecimento não é aquilo
que você sabe, mas o que
você faz com aquilo que você
sabe”. – Aldous Huxley

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Aspectos gerais sobre Loricariidae.....	13
1.2 A Subfamília Neoplecostominae e o gênero <i>Pareiorhaphis</i>	14
1.3 Filogeografia.....	17
1.3.1 As bacias hidrográficas do rio Taquari e Uruguai.....	18
1.3.2 O avanço molecular.....	19
1.4 Justificativa e hipóteses.....	20
1.5 Objetivos.....	22
1.5.1 Objetivo geral.....	22
1.5.2 Objetivos específicos.....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.1 Localidade e disponibilidade de material.....	22
2.2 Análise Morfológica.....	24
2.3 Análise Molecular.....	25
2.3.1 Extração, amplificação e sequenciamento do DNA.....	25
2.3.1.1 Gene <i>col</i>	25
2.3.1.2 Gene <i>cytb</i>	26
2.3.1.3 Gene 16S.....	26
2.3.1.1 Gene 12S.....	26
2.3.2 Pós-PCR.....	26
2.3.3 Testes moleculares.....	27
2.4 Lista de material analisado.....	29
3. RESULTADOS.....	33
3.1 Análise Morfológica.....	33
3.1.1 Desenvolvimento dos odontódeos e da intumescência lateral.....	33
3.1.2 Padrão de colorido.....	35
3.1.3 Desenvolvimento de placas na região abdominal.....	36
3.1.4 Análises merísticas e morfométricas.....	38
3.2 Análise Molecular.....	53
3.2.1 Alinhamento e diversidade genética.....	53
3.2.2 Rede de haplótipos.....	54
3.2.3 Distância genética.....	57
3.2.4 Análise filogenética.....	60
3.2.5 Análise de delimitação de espécie por coalescência.....	62
3.2.6 Análise de variância molecular e de F_{ST}	65
4. DISCUSSÃO.....	71
4.1 Análise Morfológica.....	71
4.2 Análise Molecular.....	74
4.3 Baixa diversidade do gênero em áreas comuns à <i>Pareiorhaphis hystrix</i>	78
5. Conclusões.....	79
6. Referências Bibliográficas.....	80

Relação de Figuras

Figura 1. Macho adulto de <i>Pareiorhaphis hystrix</i> , médio rio das Antas, bacia do rio Taquari.....	15
Figura 2. Fêmea adulta de <i>Pareiorhaphis hystrix</i> , rio Canoas, bacia do rio Uruguai.....	16
Figura 3. Holótipo de <i>Pareiorhaphis hystrix</i> , rio dos Touros, bacia do rio Uruguai.....	17
Figura 4. Pontos de amostragens de <i>Pareiorhaphis hystrix</i> , sul do Brasil.....	23
Figura 5. Padrão de variação dos odontódeos e da intumescência lateral em machos de <i>Pareiorhaphis hystrix</i>	34
Figura 6. Padrão de desenvolvimento dos odontódeos no espinho da nadadeira peitoral em machos de <i>Pareiorhaphis hystrix</i>	35
Figura 7. Variação no colorido de espécimes de <i>Pareiorhaphis hystrix</i>	37
Figura 8. Desenho esquemático do desenvolvimento de placas abdominais em <i>Pareiorhaphis hystrix</i>	38
Figura 9. Variação merística encontrada em exemplares de <i>Pareiorhaphis hystrix</i>	40
Figura 10. Análise de componentes principais (PCA), PC1 x PC2.....	43
Figura 11. Análise discriminante linear (LDA), LDA1 x LDA2.....	43
Figura 12. Rede de haplótipos baseada em quatro genes mitocondriais concatenados (<i>coI</i> , <i>cytb</i> , 16S, 12S).....	55
Figura 13. Rede de haplótipos individual (<i>coI</i> , <i>cytb</i> , 16S, 12S).....	56
Figura 14. Reconstrução filogenética por análise Bayesiana concatenada (<i>coI</i> , <i>cytb</i> , 16S, 12S).....	61
Figura 15. Reconstrução filogenética por análise Bayesiana, gene <i>coI</i>	62
Figura 16. Método de delimitação de espécie por coalescência (GMYC), gene <i>cytb</i>	64

Figura 17. Método de delimitação de espécie por coalescência (GMYC), gene *col*..... **65**

Relação de Tabelas

Tabela 1. Número de lotes, de exemplares e de tecidos de <i>Pareiorhaphis hystrix</i> analisados por área geográfica.....	23
Tabela 2. Região e tamanho do fragmento amplificado, primers utilizados para cada gene mitocondrial e sua respectiva sequência.....	27
Tabela 3. Dados morfométricos (%) e merísticos de <i>Pareiorhaphis hystrix</i> , alto rio das Antas.	44
Tabela 4. Dados morfométricos (%) e merísticos de <i>Pareiorhaphis hystrix</i> , médio rio das Antas.....	45
Tabela 5. Dados morfométricos (%) e merísticos de <i>Pareiorhaphis hystrix</i> , rio da Prata.....	46
Tabela 6. Dados morfométricos (%) e merísticos de <i>Pareiorhaphis hystrix</i> , rio Chapecó.....	47
Tabela 7. Dados morfométricos (%) e merísticos de <i>Pareiorhaphis hystrix</i> , rio Pelotas.....	48
Tabela 8. Dados morfométricos (%) e merísticos de <i>Pareiorhaphis hystrix</i> , rio Ijuí.....	49
Tabela 9. Dados morfométricos (%) e merísticos de <i>Pareiorhaphis hystrix</i> , rio Passo Fundo.....	50
Tabela 10. Dados morfométricos (%) e merísticos de <i>Pareiorhaphis hystrix</i> , médio rio Uruguai.....	51
Tabela 11. Dados morfométricos (%) e merísticos de <i>Pareiorhaphis hystrix</i> , rio Canoas.....	52
Tabela 12. Índice de diversidade genética para cada gene mitocondrial (<i>coI</i> , <i>cytb</i> , 16S, 12S).....	53
Tabela 13. Distância genética média entre e dentro das diferentes áreas de ocorrência de <i>Pareiorhaphis hystrix</i> , para os genes mitocondriais concatenados (<i>coI</i> , <i>cytb</i> , 16S, 12S).....	58
Tabela 14. Distância genética média entre e dentro das diferentes áreas de ocorrência de <i>Pareiorhaphis hystrix</i> , gene <i>coI</i>	59

Tabela 15. Análise de variância molecular (AMOVA), gene <i>cytb</i>	66
Tabela 16. Análise de variância molecular (AMOVA) com os agrupamentos obtidos na morfologia, gene <i>cytb</i>	67
Tabela 17. Análise de variância molecular (AMOVA) com os agrupamentos obtidos na morfologia, gene <i>cytb</i>	67
Tabela 18. Análise de F_{ST} par-à-par, gene <i>cytb</i>	68
Tabela 19. Análise de variância molecular (AMOVA), gene <i>col</i>	69
Tabela 20. Análise de F_{ST} par-à-par, gene <i>col</i>	70

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Roberto Reis, por ter aceitado me orientar e por ter me ajudado durante esses dois anos de mestrado. Sou muito grata por me apresentar ao mundo dos “cascudos”, por toda paciência, ajuda e conhecimento compartilhado.

Também gostaria de agradecer ao Edson Pereira, que mesmo não oficialmente, me co-orientou desde o início do projeto. Sou grata por toda ajuda e acompanhamento (sempre com muito bom humor) nesses dois anos de trabalho.

Agradeço aos meus colegas do laboratório de ictiologia da PUCRS, com os quais convivi durante esses dois anos. Um agradecimento muito especial para a Bárbara Calegari, por ter me ajudado no andamento de toda parte molecular do trabalho, assim como no entendimento de algumas análises realizadas e por ter me ensinado algumas técnicas no Photoshop; a Vanessa Vargas por ter me ensinado toda prática para a realização da PCR, e também por ter me ajudado sempre que precisei; a Maria Laura por todas as dicas para a elaboração da metodologia do meu projeto, assim como por todo auxílio nesses dois anos; e aos demais colegas Alejandro Londoño, Álvaro Neto, Arthur Capelli, Rafael Lugo e Suelen Gamarra pelas conversas, ideias trocadas e por terem me acalmado sempre que preciso. Ao Carlos Lucena e a Margarete Lucena, curadores da Coleção ictiológica do Museu da PUCRS, por toda ajuda e auxílio sempre que precisei de dados, planilhas e materiais da coleção científica.

Agradeço a Juliana Wingert curadora da coleção ictiológica da UFRGS, ao Pablo Albornoz, professor e pesquisador do laboratório de Ictiologia da UNISINOS, pelo empréstimo de material e tecido, assim como pelo envio de planilhas e demais materiais de interesse. Também agradeço ao Dario Fuster, doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da UFRGS, por toda ajuda no entendimento de análises de coalescência.

Sou grata a minha família, em especial aos meus pais, por todo apoio, ajuda e compreensão durante esses dois anos de mestrado. Ao meu amor e grande amigo, Igor Pepe, por ter estado ao meu lado desde o início dessa jornada, por ter me apoiado constantemente e me acalmado quando necessário, por toda ajuda no desenvolvimento dos desenhos da minha tese e por ter me introduzido ao mundo do Photoshop, o meu muito obrigada por todo carinho.

Finalmente, agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade da PUCRS por todo aprendizado nesses dois anos de mestrado. Um agradecimento especial ao professor Sandro Bonatto, pela ajuda no entendimento de algumas análises moleculares finais do meu projeto e pela atenção prestada, ao professor Nelson Fontoura pela ajuda no desenvolvimento de métodos estatísticos, e também ao professor Marco Brandalise pelas dicas de trabalhos acerca de datação fóssil. A PUCRS pela possibilidade de realização do curso, assim como ao Museu de Ciências e Tecnologia por toda base para realização do projeto; ao CNPQ pelos custeios para saídas de coleta de material. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Resumo: Loricariidae é a maior família de Siluriformes, com espécies amplamente distribuídas na região Neotropical. *Pareiorhaphis hystrix* apresenta ampla distribuição, ocorrendo no alto e médio rio Uruguai e no rio Taquari, da bacia da Laguna dos Patos, sul do Brasil. Análises prévias detectaram variações morfológicas ao longo da sua distribuição e, dessa forma, este trabalho testou a coespecificidade nas várias áreas de ocorrência. Foram utilizados espécimes de seis áreas da bacia do rio Uruguai: rio Chapecó, rio Pelotas, rio Ijuí, rio Passo Fundo, médio rio Uruguai e rio Canoas; e três na bacia do rio Taquari: alto rio das Antas, médio rio das Antas e rio da Prata. Para a análise morfológica, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para os dados merísticos e uma análise de componentes principais (PCA) e discriminante linear (LDA) para dados morfométricos. A análise molecular utilizou quatro genes mitocondriais (*col*, *cytb*, 16S e 12S), sendo analisadas as diversidades de nucleotídeos e de haplótipos, a distância genética, a variância molecular (AMOVA), a delimitação de possíveis espécies através do método *Generalized Mixed Yule Coalescent* (GMYC) e as relações filogenéticas por inferência Bayesiana. Para dados merísticos, a ANOVA apresentou alguns valores significativos ($p < 0,05$) (por exemplo, número de dentes do pré-maxilar, número de dentes do dentário), sendo observado, de forma geral, uma diferenciação significativa entre as duas bacias hidrográficas, com exceção do rio Pelotas, que se mostrou mais relacionado à bacia do Taquari. Para os dados morfométricos, a PCA indicou uma tendência de sobreposição entre áreas, enquanto a LDA separou as bacias do rio Taquari e do rio Uruguai, com exceção do rio Pelotas, que também ficou melhor agrupado às áreas do Taquari, sendo as medidas com maior poder discriminatório o comprimento do pedúnculo caudal (LDA1) e o comprimento do espinho anal (LDA2). Além disso, exemplares adultos da bacia do Uruguai apresentaram pequenas placas sobre o cleitro, ausentes naqueles do rio Taquari e Pelotas. Para os dados moleculares, o alinhamento de 2.518 pares de bases (genes concatenados), apontou uma diversidade nucleotídica inferior a haplotípica, sugestivo de expansão recente. A rede de haplótipos concatenada apresentou maior diferenciação entre as áreas, com cada localidade portando haplótipos exclusivos e não compartilhados, embora seja observado poucos passos mutacionais entre haplótipos. AMOVA sugeriu estruturação genética (diferenciação entre as áreas = 50,6%; $F_{ST} = 0,5^*$, *cytb*), melhor observada pelos valores de F_{ST} par-à-par. A análise de delimitação de espécies por coalescência (GMYC) não foi eficiente na separação interespecífica, tanto para o *col* quanto para o *cytb*, e apesar de ambos sugerirem a presença de distintas OTUS, essa separação não é clara nas demais análises realizadas. As duas áreas geneticamente mais distintas nesse trabalho foram o rio Chapecó e o rio Passo Fundo. De forma geral, os dados apontam para uma variação morfológica sutil por bacia hidrográfica. Por sua vez, as análises genéticas indicam uma leve estruturação populacional por área geográfica, mas ainda não há diferenciação suficiente entre os exemplares para sugerir diferentes espécies. A análise conjunta dos dados morfológicos e moleculares permite concluir que *Pareiorhaphis hystrix* é composta por uma única espécie biológica.

Palavras-chave: Loricariidae; Neoplecostominae; DNA; populações biológicas.

Integrative taxonomy: Combining morphological and molecular data in the study of *Pareiorhaphis hystrix* (Siluriformes, Loricariidae)

Abstract: Loricariidae is the largest family of Siluriformes, with species widely distributed on the Neotropical Region. *Pareiorhaphis hystrix* presents a wide distribution within the genus, occurring in the upper and middle Uruguay River and in the Taquari River, in the Laguna dos Patos, southern Brazil. Morphological variations were detected throughout the distribution of *P. hystrix*, and this work seeks to test the conspecificity in the various occurrence areas. Specimens from six areas of the Uruguay River basin were used: Chapecó, Pelotas, Ijuí, Passo Fundo, middle Uruguay and Canoas; and three in the Taquari River basin: upper Antas, middle Antas, and Prata. A variance analysis (ANOVA) was performed for the meristic data, and a Principal Component Analysis (PCA) and a Linear Discriminant Analysis (LDA) for morphometric data. The molecular analysis used four mitochondrial genes (*coI*, *cytb*, 16S and 12S), analyzing nucleotide diversity, haplotypes, genetic distance, molecular variance (AMOVA), and delimitation of possible species through the "Generalized Mixed Yule Coalescent" (GMYC) method, and the phylogenetic relationships through Bayesian inference. ANOVA presented some significant values ($p < 0.05$) (for example, number of premaxillary teeth, number of dentary teeth), and a significant differentiation was observed between the hydrographic basins, with the exception of the Pelotas River, more closely related to Taquari basin. The PCA indicated a tendency of overlap between areas, while the LDA separated the basins of Taquari River and the Uruguay River, with the exception of the Pelotas which was grouped with the Taquari areas, being the measures with greater discriminatory power the length of the caudal peduncle (LDA1) and anal-fin spine (LDA2). In addition, adult specimens from the Uruguay River basin presented platelets on the abdomen, absent in specimens from the Taquari and Pelotas rivers. The molecular data, with an alignment of 2,518 base pairs (concatenated genes) indicated a nucleotide diversity lower than the haplotypic diversity, suggestive of recent expansion. The concatenated haplotype network points to differentiation which is between areas, with each locality presenting unique and non-shared haplotypes, although there were few mutational steps in general. AMOVA indicated genetic structuring (differentiation between areas = 50.6%, $F_{ST} = 0.5^*$, *cytb*), best observed by the pairwise F_{ST} distance between areas. The coalescence-based species delimitation analysis (GMYC) was not efficient for interspecific separation for both *coI* and *cytb*, although both suggested the presence of OTUS, this separation is not clear. The two areas better genetically defined were the Chapecó and Passo Fundo rivers. In general, the data suggest a subtle morphological variation by hydrographic basin, while the genetic data indicates a weak population structuration by hydrographic areas, but still insufficient for species differentiation between the areas. The joint analysis of morphological and molecular data allows to conclude that *Pareiorhaphis hystrix* is composed of a single biological species.

Keywords: Loricariidae; Neoplecostominae; DNA; natural populations.

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais sobre Loricariidae

A ictiofauna de água doce neotropical apresenta a maior diversidade de peixes do mundo (mais de 40%), com aproximadamente 5,4 mil espécies distribuídas em cinco grandes grupos: Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Perciformes (Py-Daniel, COX Fernandes, 2005; Nelson, 2006; L veque *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2016). Desses grupos, Siluriformes cont m cerca de 10% do total das espécies de peixes do mundo, sendo predominantemente de água doce, com exce o de duas famílias, Ariidae e Plotosidae, representadas de forma geral, por espécies marinhas, mas também podendo ser encontradas em águas salobras, costeiras e em águas doces (Nelson *et al.*, 2016). Segundo Nelson (2006) os Siluriformes são dominantes na América do Sul e apresentam uma ampla distribui o mundial, sendo formado por um grupo extremamente grande e diverso, com mais de 3.900 espécies em 39 famílias (Fricke *et al.*, 2019). A diversidade de espécies dentro da ordem segue aumentando significativamente, com 1086 espécies descritas nos últimos dez anos (Fricke *et al.*, 2019).

Das famílias de Siluriformes, Loricariidae possui a maior riqueza, com aproximadamente 984 espécies válidas atualmente (Fricke *et al.*, 2019). Os peixes dessa família, conhecidos popularmente como cascudos, são amplamente distribuídos em água doce neotropical, do sul da Costa Rica, drenagem Pacífica, até o nordeste da Argentina, com oito subfamílias reconhecidas atualmente (Isbrücker, 1980; Reis *et al.*, 2016; Fricke *et al.*, 2019). Loricar deos apresentam uma cobertura de placas ósseas, cobertas de pequenas estruturas dentárias extra-orais, em forma de espinho, chamadas de odontódeos, além de lábios modificados em um disco de suc o, que facilita a fixa o desses peixes em rochas/substratos (Armbruster, 2004; Py-Daniel, COX Fernandes, 2005).

Devido a importantes especializa es morfológicas e ecológicas, os loricarídeos colonizaram os mais diversos tipos de ambientes, desde locais extremos, como riachos andinos de águas extremamente frias e velozes até grandes rios e pântanos costeiros, sendo mais comumente encontrados sobre o fundo dos corpos d'água, em áreas com correntezas e rochas (Bizerril, 1994; Ribeiro, 2006; Chiachio *et al.*, 2008). Das oito subfamílias de Loricariidae, três apresentam baixo número de espécies: Lithogeneinae (3 spp.), Rhinelepinae (6 spp.) e Delturinae (7 spp.); duas cont m um número moderado de espécies: Hypoptopomatinae (58) e Neoplecostominae (61 spp.); e três são ricas em

espécies e bem distribuídas: Otothyrinae (124 spp.), Loricariinae (246 spp.) e Hypostominae (477 spp.) (Fricke *et al.*, 2019).

1.2 A Subfamília Neoplecostominae e o gênero *Pareiorhaphis*

Neoplecostominae foi criada por Regan (1904) para alocar *Neoplecostomus granosus* (Valenciennes, 1840). Atualmente, a subfamília apresenta sete gêneros (*Euryochus*, *Hirtella*, *Isbrueckerichthys*, *Kronichthys*, *Neoplecostomus*, *Pareiorhaphis* e *Pareiorhina*) (Pereira *et al.*, 2007) e 61 espécies válidas, sendo 22 descritas nos últimos 10 anos (Fricke *et al.*, 2019). Segundo Pereira *et al.* (2007) e Pereira, Reis (2017) a distribuição de Neoplecostominae é restrita às drenagens brasileiras, incluindo a maior parte das drenagens costeiras atlânticas do rio Maquiné, no sul do Brasil, até o rio Paraguaçu na Bahia, nordeste do Brasil, além dos rios Jacuí, Uruguai, Iguaçu, Paraná e São Francisco.

Pareiorhaphis (Miranda Ribeiro, 1918) foi retirado da sinonímia de *Hemipsilichthys* (Eigenmann, 1889) por Pereira (2005) para melhor agrupar espécies filogeneticamente distantes. O gênero foi recentemente demonstrado monofilético por Pereira, Reis (2017), sendo o mais diverso de Neoplecostominae, com 26 espécies válidas (Fricke *et al.*, 2019). Nos últimos 10 anos, foram descritas oito novas espécies para o gênero (Fricke *et al.*, 2019), garantindo assim, o aumento do conhecimento da sua diversidade e ampliando sua área de distribuição no Brasil. *Pareiorhaphis* apresenta uma grande variação morfológica, com espécies exibindo variações no tamanho do corpo, com indivíduos de pequeno (*P. nudula* - 34 mm CP) a médio porte (*P. azygolechis* - 116 mm CP), diferentes padrões de colorido e manchas, de dimorfismo sexual, de natureza da cobertura da cintura peitoral, de formas da cabeça, do focinho, da boca e outras distinções morfométricas e merísticas comumente observáveis dentro do gênero (Pereira, 2005; Pereira, Reis, 2017). Pereira *et al.* (2017) destacam que um padrão relacionado ao dimorfismo sexual encontrado em machos adultos e compartilhado por todas as espécies do gênero é a presença de odontódeos hipertrofiados. Estes odontódeos cobrem a maior parte da intumescência lateral da cabeça, opérculo e o espinho da nadadeira peitoral.

Pareiorhaphis hystrix (Pereira & Reis, 2002) (Figs. 1-2) foi descrita há aproximadamente duas décadas e seu nome “*hystrix*” vem do latim e refere-se a “porco-espinho”, em alusão ao aspecto espinhoso do seu focinho, comum em machos maduros. Foi originalmente descrita do alto rio Pelotas (Fig. 3), sub-bacia do rio Uruguai, Rio Grande do Sul e, posteriormente, teve sua distribuição ampliada na literatura, sendo hoje

conhecida do alto e médio rio Uruguai e do rio Taquari. Sua distribuição ampla a diferencia de outras espécies de *Pareiorhaphis*, que são mais restritas na região sul, como *P. garapia* Pereira, Lehmann, Schwambach & Reis, 2015, encontrada na drenagem do rio Maquiné; *P. vestigipinnis* (Pereira & Reis, 1992) nas cabeceiras da bacia do rio Canoas; e *P. eurycephalus* (Pereira & Reis, 2002) na bacia do alto rio Canoas.



Figura 1: Vista dorsal, lateral e ventral de *Pareiorhaphis hystrix*. MCP 48327, macho, 99,2 mm CP. Médio rio das Antas, bacia do rio Taquari, São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul.



Figura 2: Vista dorsal, lateral e ventral de *Pareiorhaphis hystrix*. MCP 53241, fêmea, 85,0 mm CP. Rio Ponte Alta, tributário do rio Canoas, bacia do rio Uruguai, Santa Catarina.

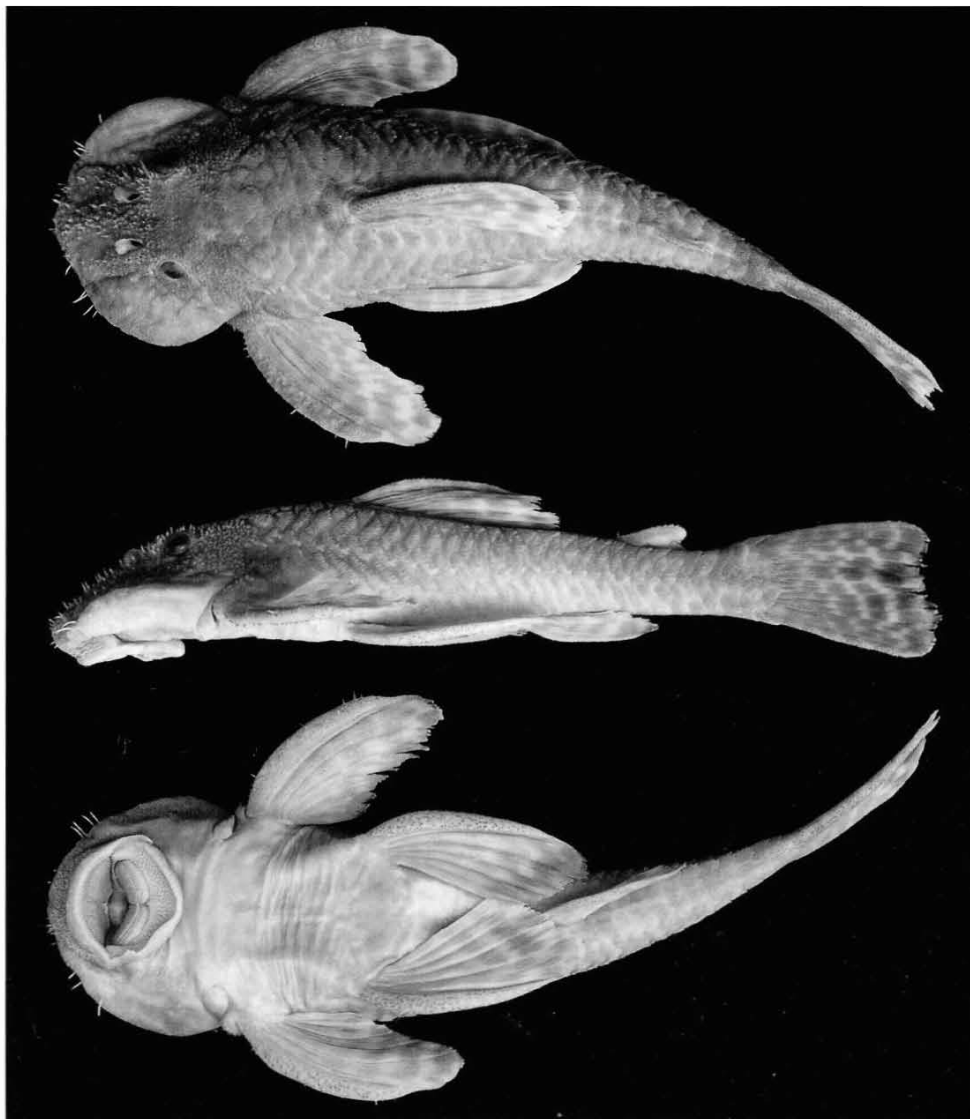


Figura 3: Holótipo de *Pareiorhaphis hystrix*, MCP 19779, macho, 110,2 mm CP. Arroio tributário do rio dos Touros, bacia do rio Uruguai, Rio Grande do Sul. Extraído de Pereira, Reis (2002).

1.3 Filogeografia

Segundo Avise (2000) a filogeografia pode ser considerada como uma Ciência que visa estudar os princípios e os processos que norteiam a distribuição geográfica de linhagens, de espécies e de táxons relacionados. Os peixes de água doce, por exemplo, costumam exibir uma estrutura filogeográfica diferenciada, frequentemente associada a mudanças de caráter histórico e ecológico no seu ambiente aquático, dependendo diretamente de conexões entre as bacias hidrográficas para dispersão e aumento da sua área de distribuição (Villwock, Tomazelli, 1995; Lévêque *et al.*, 2008). Segundo Lévêque *et al.* (2008) a distribuição atual dos peixes de água doce foi moldada por milhões de anos, considerando as mudanças no ciclo global da água. Eventos de especiação e

extinção foram associados a eventos climáticos e geológicos, proporcionando oportunidades de migração e colonização de novos habitats por diferentes espécies de peixes. A origem das várias linhagens da ictiofauna é relacionada ao Gondwana, e uma grande diversificação neotropical moderna durante o período de 70 milhões de anos, desde o final do Cretáceo até o Mioceno, sendo a fauna de peixes neotropical essencialmente moderna no final do Mioceno (Lévêque *et al.*, 2008).

De modo geral, a drenagem da América do Sul se desenvolveu após sua separação da África, há aproximadamente 100 milhões de anos, durante o cretáceo inferior, favorecendo assim, a evolução de um número significativo de espécies endêmicas, tanto na América do Sul quanto na África (Villwock, Tomazelli, 1995; Albert, Reis, 2016). A diversificada fauna de peixes de água doce neotropical evoluiu sob influência de inúmeras mudanças geológicas e climáticas, envolvendo a formação/modificação nas bacias hidrográficas e outras formações de grande impacto. Adicionalmente, esta ictiofauna evoluiu sob condições tropicais úmidas, influenciada pelas mudanças no nível do mar. Esta última, exercendo importante papel na moderna composição da Planície Costeira Sul, com o desenvolvimento de lagoas e conexões de rios anteriormente isolados (Villwock, Tomazelli, 1995; Albert, Reis, 2011). Eventos tectônicos globais, paisagens regionais, características ecológicas específicas (altitude, gradientes de riachos, chuvas, temperaturas, cobertura florestal e química da água) também exerceram importante papel nessa diversificação (Villwock, Tomazelli, 1995; Albert, Reis, 2011; Reis *et al.*, 2016).

Conhecer o passado histórico de diferentes linhagens de peixes é de extrema importância para melhor entender a atual distribuição das espécies neotropicais. Estudos filogeográficos têm sido amplamente realizados com Loricariidae, visando compreender os padrões de distribuição atual das diferentes espécies da família e de suas populações (Chiachio *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2017, Collins *et al.*, 2018).

1.3.1 As bacias hidrográficas do rio Taquari e Uruguai

Pareiorhaphis hystrix, encontrada na região sul do Brasil nas bacias do rio Uruguai e do rio Taquari, torna o entendimento de aspectos históricos da formação dessas bacias muito importante para a melhor compreensão da sua história evolutiva, assim como da ictiofauna da região. A bacia hidrográfica do rio Taquari está localizada a nordeste do estado do Rio Grande do Sul, com área de 26.491 km², abrangendo as províncias geomorfológicas do Planalto Meridional e Depressão Central (SEMA, 2018). Esta sub-bacia é uma das principais da bacia da Laguna dos Patos, que é uma grande

drenagem que flui para o Oceano Atlântico. A bacia hidrográfica do rio Taquari, sob o ponto de vista geológico, situa-se na parte oriental da bacia do rio Paraná, e o rio das Antas, seu rio principal situa-se na parte superior da bacia, flui de um alto platô basáltico (800-1200 metros de altitude) por meio de vales profundamente incisos até terras baixas, onde passa a ser chamado de rio Taquari (Becker *et al.*, 2013). Os principais cursos de água desse sistema são: o rio das Antas, o rio Tainhas, o rio Lageado Grande, o rio Humatã, o rio Carreiro, o rio Guaporé, o rio da Prata, o rio Forqueta, o rio Forquetinha e o rio Taquari (FEPAM, 2018; SEMA, 2018).

Por sua vez, a bacia hidrográfica do rio Uruguai faz parte da bacia do rio da Prata, ocupando grande parte da área meridional do Brasil. Essa bacia apresenta leito rochoso proveniente do derrame basáltico que levou a formação do Planalto Meridional do Brasil, com a separação da África (Potter, 1997; Albert, Reis, 2011). Atualmente, a bacia do rio Uruguai possui 2.200 km de extensão e está localizada na região sul do Brasil (sul de Santa Catarina e norte e oeste do Rio Grande do Sul), noroeste do Uruguai e nordeste da Argentina, sendo o rio Uruguai formado pelo encontro do rio Pelotas com o rio Canoas. As altitudes caem e se encontram 150 metros abaixo no trecho entre Sete Quedas e Encarnación, na Argentina (Almeida, 1956). Alguns rios apresentam importante contribuição para essa bacia, sendo estes: rio do Peixe, Irani e rio Chapecó (margem direita ou Catarinense), Apuaê, Forquilha, Passo Fundo, da Várzea e Guarita (afluentes da margem esquerda ou gaúcha) (ANA, 2018; SEMA, 2018).

1.3.2 O avanço molecular

Nos últimos anos, estudos de cunho filogeográficos e filogenéticos garantiram a melhor compreensão da evolução interespecífica e intraespecífica da ictiofauna peixes, nos seus mais diferenciados ambientes neotropicais (Piorski *et al.*, 2008). Existem inúmeros estudos com a utilização de haplótipos de DNA mitocondrial, presente em várias cópias por célula, para resolução de problemas taxonômicos e para a melhor compreensão das relações filogenéticas, a nível intraespecífico ou interespecífico em peixes (Ponzetto *et al.*, 2016; Ponzetto *et al.*, 2017; Prizon *et al.*, 2017; Magalhães *et al.*, 2017; Souza-Shibatta *et al.*, 2018).

Para Loricariidae o uso de marcadores genéticos apresenta grande importância, visto que a família é representada por espécies que geralmente não migram. Dessa forma, o acúmulo de diferenças genéticas entre suas populações acaba sendo facilmente observável com o uso de diferentes ferramentas moleculares. Além da facilidade de

manipulação e de isolamento, o DNA mitocondrial apresenta várias características favoráveis que contribuem para o seu uso, como um grande número de cópias por célula, a herança uniparental materna, a ausência de recombinação e as altas taxas evolutivas, quando comparado ao DNA nuclear (Avise, 1994; Avise, 2000; Calcagnotto, 2004). O genoma mitocondrial é caracterizado como pequeno, tipicamente de tamanho ~15-20 kb, onde a maioria dos animais apresentam 37 genes, dois para rRNAs, 13 para proteínas e 22 para tRNAs, enquanto o DNA nuclear codifica cerca de 100.000 diferentes genes (Boore, 1999).

Um dos genes mitocondriais mais utilizado em estudos filogenéticos para vertebrados é o Citocromo b (*cytb*), do qual é muito informativo para o entendimento de relações filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos. Provavelmente, o *cytb* é o gene mitocondrial mais conhecido quanto à sua estrutura e função (Meyer, 1994). Meyer (1994) também destaca o sucesso do uso do *cytb* em estudos que envolvem questões ecológicas e evolutivas, comumente encontrados na literatura (Cramer *et al.*, 2007; Porter *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2016; D'Anatro, 2017; Collins *et al.*, 2018).

Outro gene muito empregado em estudos filogenéticos é o Citocromo c oxidase I (*coI*), também utilizado para “DNA barcoding” (Silva, 2012). Segundo Hebert *et al.* (2003a) esse gene é aparentemente um importante marcador molecular para código de barras genético de animais, pois oferece a vantagem de ser espécie-específico, apresentando grande variabilidade entre diferentes espécies. Dessa forma, é um dos genes mais utilizados para a identificação de novas espécies de peixes (Roxo *et al.*, 2012; Calegari *et al.*, 2013; Cramer, Sousa, 2016; Guimarães *et al.*, 2018).

1.4 Justificativa e hipóteses

Por causa da ampla distribuição e da coleta de espécimes de *Pareiorhaphis hystrix* nos diferentes ambientes de ocorrência no sul do Brasil, têm sido observadas variações morfológicas importantes entre os espécimes que compõe esta espécie. Essas variações se dão principalmente quanto a distribuição e ao tamanho dos odontódeos encontrados em machos maduros, podendo se mostrar desenvolvidos ou não, sobre o focinho e/ou junto à intumescência lateral da cabeça; ao tamanho da intumescência da lateral da cabeça; o padrão de colorido manchado característico da espécie; a presença de pequenas placas abdominais sobre a cintura escapular. Ainda, possivelmente, há outras variações entre os espécimes ainda não relatadas. A distribuição das variações, ainda não havia sido

investigada, assim, não estando definido se tratam apenas de variações intraespecíficas ou se poderia ser indício da presença de diferentes espécies.

Espécies com uma grande distribuição geográfica, como é o caso de *P. hystrix*, mostram necessidade de estudos que possam detectar divergências intrapopulacionais entre seus espécimes. Moritz *et al.* (2000) destacam que informações acerca da distribuição geográfica, variações morfológicas, genéticas, dados ecológicos e história de vida podem fornecer importantes dados sobre as relações entre as populações biológicas, assim como as linhagens históricas e o tempo estimado de eventos de divergência entre elas. A combinação de dados morfológicos com o uso de marcadores moleculares tem tido uma aplicabilidade eficiente em estudos populacionais em peixes, e o seu uso pode colaborar na diferenciação e identificação de espécies crípticas, caso ocorram e sejam de difícil identificação morfológica (Prizon *et al.*, 2017; Souza-Shibatta *et al.*, 2018).

Dessa forma, com o avanço da genética de populações e o uso do DNA mitocondrial, esse estudo se torna muito importante para revisão taxonômica de espécimes de *P. hystrix*, distribuídos ao longo das sub-bacias do rio Uruguai e do rio Taquari. No geral, os trabalhos que envolvem espécies do gênero são descritivos, focando apenas na descrição morfológica de novas espécies (Pereira *et al.*, 2012; Pereira, Zanata, 2014; Pereira *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2018). Para *P. hystrix*, são observados principalmente estudos filogenéticos considerando sua posição dentro de Loricariidae e de Neoplecostominae (Pereira, 2005; Pereira, Reis, 2017, dentre outros), e há apenas um estudo de cunho ecológico, tratando de aspectos específicos referentes à sua dieta (Dias, Fialho, 2011).

O uso da taxonomia integrativa, comumente empregada no estudo de diferentes espécies, busca utilizar um grande número de caracteres, incluindo tanto dados moleculares como também diferentes dados morfológicos, para assim descobrir, identificar e delimitar espécies e táxons naturais, superando a variação de caracteres sobrepostos em um sistema de caracteres específico (Will *et al.*, 2005; Yeates *et al.*, 2010). O uso conjunto de diferentes dados morfológicos e moleculares ainda foram pouco explorados no gênero *Pareiorhaphis* (Lima *et al.*, 2017), o que reforça a importância do presente trabalho.

Assim, a hipótese a ser testada neste trabalho é a coespecificidade dos espécimes de *P. hystrix* nas diferentes áreas de ocorrência no sul do Brasil, sendo a hipótese nula que *P. hystrix* constitui uma única espécie biológica, enquanto a hipótese alternativa é que *P. hystrix* pode agregar diferentes espécies biológicas crípticas. É esperado que

através de diferentes análises morfológicas e moleculares, sejam constatadas variações significativas entre espécimes de diferentes áreas geográficas, de forma a indicar a ocorrência de divergência e especiação biológica entre eles, e assim, a presença de diferentes espécies.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo geral

Revisão taxonômica de espécimes de *Pareiorhaphis hystrix* nas áreas de ocorrência, nas bacias do rio Uruguai e do rio Taquari, sul do Brasil.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Comparar e analisar os espécimes morfométrica e meristicamente;
2. Comparar e analisar os espécimes geneticamente, através de quatro marcadores mitocondriais;
3. Analisar a estruturação populacional dos espécimes de acordo com suas áreas de ocorrência;
4. Descrever possíveis variações intraespecíficas ou novos táxons detectados nas análises.

2. Material e métodos

2.1 Localidade e disponibilidade de material

O projeto foi realizado no Laboratório de Sistemática de Vertebrados, no Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, município de Porto Alegre, estado do Rio Grande do Sul. Foram selecionados e utilizados exemplares e amostras de tecidos de *Pareiorhaphis hystrix*, pertencentes às coleções de peixes da PUCRS, UFRGS e UNISINOS. Também foi realizada uma coleta de material no mês de janeiro de 2018, para amostragem de espécimes e tecidos faltantes em determinadas áreas de ocorrência.

O número de espécimes utilizados para análise morfológica e molecular são destacados na Tabela 1. Os exemplares em álcool foram selecionados para a análise morfométrica com base no seu comprimento padrão, sendo considerados somente exemplares adultos, acima de 70 mm, já que análises prévias mostraram uma estabilização quanto a variações na forma a partir desse tamanho. No entanto, algumas

áreas apresentaram baixa abundância de espécimes maiores, sendo então utilizados alguns exemplares acima de 60 mm. Nove áreas geográficas foram definidas (Fig. 4), considerando a abundância e disponibilidade dos lotes. As nove áreas analisadas foram

Tabela 1: Áreas, bacias, número de lotes, número de exemplares e de tecidos analisados de *Pareiorhaphis hystrix*.

Áreas	Bacias	Nº de lotes	Nº de exemplares	Nº de tecidos
alto rio das Antas	Taquari	21	34	8
médio rio das Antas	Taquari	15	25	5
rio da Prata	Taquari	12	25	5
rio Chapecó	Uruguai	6	14	5
rio Pelotas	Uruguai	21	25	5
rio Ijuí	Uruguai	18	26	4
rio Passo Fundo	Uruguai	10	16	5
médio rio Uruguai	Uruguai	13	22	5
rio Canoas	Uruguai	3	24	5

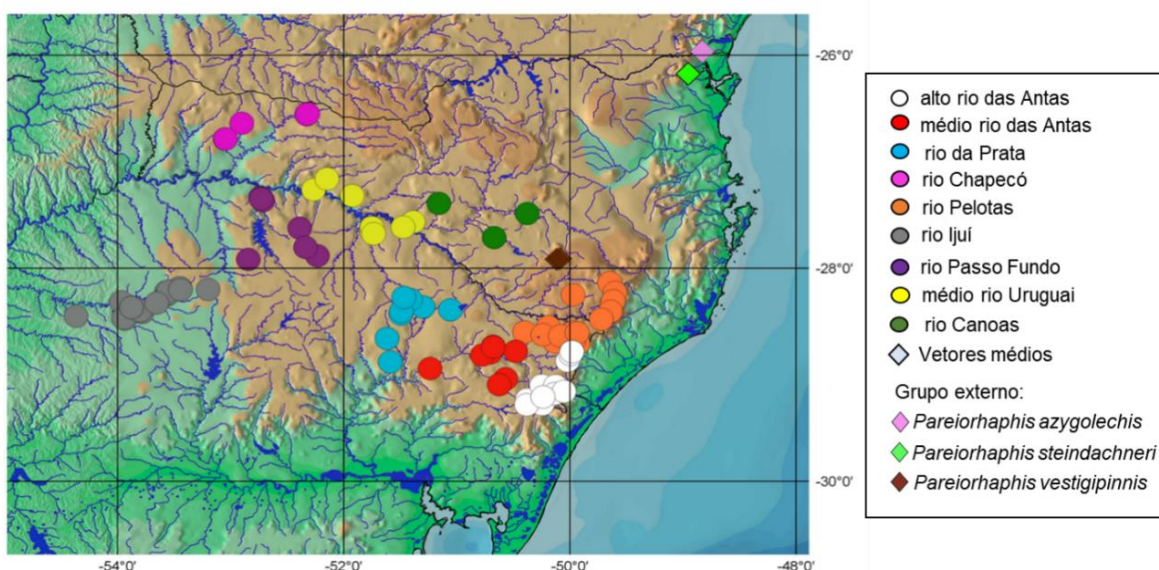


Figura 4: Pontos de amostragens de *Pareiorhaphis hystrix* e do grupo externo de *Pareiorhaphis* utilizado, considerando materiais em álcool e tecidos das coleções do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, UFRGS e UNISINOS. Cada círculo representa um lote proveniente de uma área específica; losangos representam o grupo externo. Mapa: QGIS 2.1.

as seguintes: três pertencentes a bacia do rio Taquari, 1) alto rio das Antas (calha principal e pequenos arroios afluentes); 2) médio rio das Antas (calha principal e pequenos arroios afluentes); 3) rio da Prata (tributário do rio das Antas); e seis pertencentes a bacia do rio Uruguai, 4) rio Chapecó (afluente do alto rio Uruguai); 5) rio Pelotas (afluente do alto rio

Uruguai); 6) rio Ijuí (afluente do médio rio Uruguai); 7) rio Passo Fundo (afluente do alto rio Uruguai); 8) médio rio Uruguai (calha principal e pequenos rios afluentes); e 9) rio Canoas (afluente do alto rio Uruguai).

2.2 Análise Morfológica

As observações e análises morfológicas dos exemplares foram realizadas em espécimes previamente fixados em formalina 10% e preservados em etanol 70%. Foram analisadas as variações nos odontódeos de machos, na região anterior, junto ao focinho, e sobre a lateral da cabeça, assim como os odontódeos sobre o espinho da nadadeira peitoral. Padrões de colorido também foram avaliados em espécimes das nove áreas, mantidos submersos em álcool para melhor visualização.

A anatomia do esqueleto dos espécimes também foi analisada, utilizando o amplo material diafanizado disponível. O processo de diafanização e coloração de ossos e cartilagens segue a técnica de Taylor, Van Dyke (1985), no qual cada exemplar é processado por digestão enzimática com tripsina, levando ao clareamento dos tecidos, e coloração de ossos com alizarina e cartilagens com azul de alcian. A nomenclatura osteológica seguiu Schaefer (1987), exceto para o parieto-supra-occipital em vez de supra-occipital, como sugerido por Arratia (2003), e pterótico composto em vez de pterótico-supracleitro, como usado por Aquino, Schaefer (2002).

Com o auxílio do microscópio estereoscópio foi feito o levantamento dos dados merísticos, e com paquímetro digital (precisão de 0,1 mm) foi feito o levantamento de dados morfométricos. As contagens e medidas foram feitas segundo Pereira *et al.* (2007), sendo as medidas expressas em porcentagem do comprimento padrão, enquanto as da região cefálica, expressas em porcentagens do comprimento da cabeça.

Os espécimes de *P. hystrix* provenientes das diferentes áreas das bacias do Uruguai e do Taquari foram comparados e analisados morfometricamente e meristicamente entre si. Essa comparação foi realizada através de uma análise estatística dos valores das proporções corporais e das contagens, sendo apresentados os valores mínimo, máximo, média e desvio padrão para cada área geográfica.

Os dados merísticos foram avaliados através do teste estatístico univariado ANOVA (*Analysis of variance*) no software PAST v3.12 (*Palaeontological Statistics*, Hammer *et al.*, 2001), buscando comparar as diferentes médias obtidas. ANOVA não destaca quais grupos diferem entre si, dessa forma, também foi utilizado o Teste de Tukey. O box plot das contagens foi construído com o PAST.

As regressões de potência ($y = a.CP^b$), onde CP = comprimento padrão, foram aplicadas a dados agregados dos espécimes de *Pareiorhaphis hystrix* das diferentes áreas, para converter cada medida em resíduo, visando eliminar o viés do tamanho individual e do padrão de crescimento alométrico, comum em peixes. As regressões foram realizadas por meio de regressão não-linear no programa SPSS v22.0, utilizando o algoritmo de Levenberg-Marquardt (Moré, 2006), buscando eliminar o viés da transformação de log. Posteriormente, os espécimes foram comparados morfometricamente, através de análises multivariadas, PCA (*Principal Component Analysis*) e da LDA (*Discriminant analysis*), utilizando o software PAST e os resíduos obtidos anteriormente.

2.3 Análise Molecular

2.3.1 Extração, amplificação e sequenciamento do DNA

Através dos tecidos obtidos ou já disponíveis (Tab. 1) mantidos em álcool 99%, foi feita a extração de DNA, com o uso de kit comercial de extração de DNA total DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. As amplificações de DNA foram feitas pela técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), para os seguintes genes mitocondriais: *Cytochrome c oxidase subunit I (coI)*, *Cytochrome b (cytb)*, 16S e 12S. Estes fragmentos foram amplificados usando primers previamente publicados e disponíveis (Tab. 2). As amplificações foram realizadas em um volume de 12,5 µl de Master Mix, com um volume de concentração de 1,25 µl para cada primer (Forward e Reverse) e 6,0 µl de água Mili-Q, totalizando 23 µl. Foram utilizados 2 µl do DNA de cada amostra para a amplificação, completando 25 µl de reação final.

2.3.1.1 Gene *coI*

As condições do ciclo da PCR para o gene *coI* (Primer LCOI490 e HCO2198) incluíram: desnaturação inicial de 94°C por 2 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 30 s, anelamento 50°C, 48°C, 46°C, 44°C, 42°C e 40°C com 20 s para cada extremidade e 5 s para as intermediárias, extensão de 72°C por 2 min e extensão final de 72°C por 10 min. Para o gene *coI* (Primer VF2_t1, Fish F2_t1, Fish R2_t1 e FR1d_t1): desnaturação inicial de 94°C por 2 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação de 94°C por 30 s, anelamento 50°C, 48°C, 46°C, 44°C, 42°C e 40°C com 20 s para cada extremidade e 5 s para as intermediárias, extensão de 72°C por 2 min e extensão final de 72°C por 10 min. Para o gene *coI* (Primer LCO 1490 e HCO 2198): desnaturação inicial de 94°C por 2 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 30 s, anelamento

50°C, 48°C, 46°C, 44°C, 42°C e 40°C com 20 s para cada extremidade e 5 s para as intermediárias, extensão de 72°C por 1,5min e extensão final de 72°C por 10 min.

2.3.1.2 Gene *cytb*

Para o *cytb*, os ciclos da PCR apresentaram: desnaturação inicial 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação de 94°C por 30 s, anelamento em 57°C, 55°C e 53°C com 20 s para cada, extensão de 72°C por 1,5 min e extensão final de 72°C por 10 min.

2.3.1.3 Gene 16S

Para o gene 16S, as condições dos ciclos da PCR incluíram: desnaturação inicial de 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação de 94°C por 30 s, anelamento de 48 e/ou 40°C dependendo da área analisada durante 20 s, extensão de 72°C por 60 s e extensão final de 72°C por 10 min.

2.3.1.4 Gene 12S

Para o gene 12S, as condições dos ciclos da PCR incluíram: desnaturação inicial de 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação de 95°C por 30 s, anelamento 52°C, 50°C e 48°C com 20 s para cada, extensão de 72°C por 80 s e extensão final de 72°C por 10 min. Em todos os procedimentos foram utilizados os controles negativos, apresentando todos os elementos da mistura da reação, com exceção do DNA.

2.3.2 Pós-PCR

Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose, corados com Gelred e foto-documentados, para verificar e registrar a qualidade de amplificação do DNA antes do envio para o sequenciamento. Posteriormente, as placas com os produtos da PCR foram enviadas para a empresa Funcional Bioscience, nos Estados Unidos, para o processo de purificação dos produtos da PCR e o seu sequenciamento.

Com as sequências disponíveis, o software Geneious R8 6.0.5 (Kearse *et al.*, 2012) foi utilizado para a edição e obtenção da sequência consenso e o alinhamento automático (*coI*, *cytb*), utilizando o algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). O software SATE v2, foi utilizado para o alinhamento dos genes 16S e 12S, também utilizando o algoritmo MUSCLE. Posteriormente, as sequências dos quatro genes mitocondriais foram

concatenadas no Geneious. As sequências obtidas de *Pareiorhaphis hystrix* e do grupo externo serão disponibilizadas no GenBank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tabela 2: Região e tamanho de cada gene mitocondrial amplificado, nome do primer utilizado e sua respectiva sequência forward e reverse.

Região e tamanho do fragmento	Primer	Referência	Sequência do primer (Forward e reverse)
<i>col</i> rRNA (447-658 bp)	LCO1490 HCO2198	Hebert <i>et al.</i> (2003b)	5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' 5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'
<i>col</i> COCKTAILS (447-655 bp)	VF2_t1	Ward <i>et al.</i> (2005); Ivanova <i>et al.</i> (2007)	5'TGTAAAACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAA GACATTGGCAC-3'
	Fish F2_t1		5'TGTAAAACGACGGCCAGTCGACTAATCATAAG ATATCGGCAC-3'
	Fish R2_t1		5'CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGCCG AAGAATCAGAA-3'
	FR1d_t1		5'CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCC GAARAAYCARAA-3'
<i>col</i> (447-650 bp)	L6252 H7271	Melo <i>et al.</i> (2011)	5'- AAG GCG GGG AAA GCC CCG GCA G -3' 5'-TCC TAT GTA GCC GAA TGG TTCTTT T -3'
<i>cytb</i> (843-1150 bp)	<i>cytb</i> Fa <i>cytb</i> Ra	Lujan <i>et al.</i> (2015)	5'-TCCCACCCGGACTCTAACCGA-3' 5'-CCGGATTACAAGACCGGCGCT-3'
16S rRNA (453-700 bp)	16Sar 16Sbr	Adaptado de Lujan <i>et al.</i> (2015)	5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3' 5'CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'
12S rRNA (775-900 bp)	Phe-L941 Val-H2010	Roxo <i>et al.</i> (2012)	5'-AAA TCA AAG CAT AAC ACT GAA GAT G-3' 5'-CCA ATT TGC ATG GAT GTC TTC TCG G-3'

2.3.3 Testes moleculares

Os quatro genes mitocondriais sequenciados nesse estudo (*col*, *cytb*, 16S, 12S) foram utilizados para cálculos dos parâmetros de diversidade genética: número de sítios polimórficos (s), o número de haplótipos (n), a diversidade haplotípica (hd), a diversidade nucleotídica (π), e os desvios padrão, através do programa Arlequin v3.5 (Excoffier, Lischer, 2010). O programa Network v5.3 foi utilizado para construção de rede de haplótipos, utilizando o algoritmo *median-joining* que identifica os haplótipos mais proximamente relacionados, com o critério de parcimônia e favorecendo conexões mais curtas (Bandelt *et al.*, 1999). Segundo Bandelt *et al.* (1999) o método utiliza “median vectors (mv)”, que representam sequências consenso, podendo ser interpretadas como

sequências que não foram amostradas no estudo ou ainda, possíveis sequências ancestrais extintas.

O conjunto dos genes concatenados foi utilizado para o desenvolvimento de uma matriz de distância genética, calculada no software MEGA v6 (Tamura *et al.*, 2013), através do melhor modelo determinado para os dados - Tamura Nei (TN93) - e os erros padrão foram estimados em 10.000 iterações de bootstrap. Também foi construída uma matriz de distância genética individual para o gene *coI*, considerando que é um gene muito utilizado em peixes para delimitação a nível de espécie.

Por fim, para a realização da análise filogenética - através do método de inferência Bayesiana (BI), o software Partition Finder v1.1.1 (Lanfear *et al.*, 2012) foi utilizado na determinação de modelos específicos de códon de evolução molecular, para cada gene mitocondrial (*coI*, *cytb*, 16S, 12S) sob o Critério de Informação Bayesiana (BIC). Os seguintes modelos foram selecionados: *coI*, posição um (JC), posição dois (F81), posição três (TrN+G); *cytb*, posição um (K80+I), posição dois (HKY), posição três (TrN+G); 16S (HKY+I) e 12S (TrNef). Análises preliminares foram testadas com o programa MrBayes v3.2.6, buscando verificar possíveis erros no script montado e sua correção (Ronquist *et al.*, 2012). Posteriormente, por meio do cluster de supercomputação CIPRES (<http://www.phylo.org/index.php>; Miller *et al.*, 2010), foi realizada a análise Bayesiana, com o programa MrBayes v3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012). A inferência Bayesiana permite a construção de árvores genéticas, facilitando a melhor compreensão das diferentes áreas estudadas. Foram selecionadas três espécies de *Pareiorhaphis* como grupo externo: *P. vestigipinnis*, *P. steindachneri* (Miranda Ribeiro, 1918) e *P. azygolechis* (Pereira, Reis, 2002). MrBayes foi configurado para correr 100 milhões de gerações usando quatro cadeias (nchain = 4), duas corridas paralelas, amostragem à cada 1000 árvores com os primeiros 25% de árvores sendo descartadas.

A delimitação de possíveis novas espécies foi testada através do modelo *General Mixed Yule Coalescent* (GMYC), disponível no servidor GMYC (<https://species.hits.org/gmyc>; Zhang *et al.*, 2013). GMYC consiste em um método para delimitação de espécies que evoluem independentemente, onde as mutações que surgem em uma espécie não podem se espalhar rapidamente para outra. Ainda, são modelados a especiação e eventos de ramificação, inferindo o ponto de transição entre as taxas de ramificação inter e intraespecífica em uma árvore ultramétrica calibrada no tempo (De Queiroz, 2007; Fujisawa, Barraclough, 2013).

A árvore de coalescência foi criada por inferência Bayesiana, para dois genes individualmente (*cytb* e *col*). Foi considerado o modelo HKY para todas as posições, com um relógio molecular relaxado (relaxed clock log normal), usando uma distribuição de tempo lognormal e nascimento-morte (birth death model). Esses parâmetros foram configurados no programa BEAUTi v2 e a análise foi realizada no BEAST v2 (Bouckaert *et al.*, 2014). O BEAST foi programado para rodar 100 milhões de gerações, amostrando a cada 1.000 árvores. Um tamanho de amostra efetivo (ESS) para todas as métricas foi verificado no software Tracer v1.7 (Rambaut *et al.*, 2018), e por fim, o TreeAnnotator (Rambaut, Drummond, 2015) foi utilizado para construir uma árvore consenso, com 10% das árvores descartadas. Para executar a análise no servidor online, a árvore gerada no TreeAnnotator foi convertida no formato Newick, com a utilização do software R v.3 (R Development Core Team, 2017).

A estruturação populacional e a diferenciação genética em diferentes escalas geográficas foram investigadas usando a estatística F de Wright (1965), com a AMOVA (*Analysis of Molecular Variance*) (Excoffier *et al.*, 1992), considerando a distância entre os haplótipos, para os genes *cytb* e o *col*. AMOVA testa a heterogeneidade genética em diferentes escalas: entre/dentro de diferentes populações e entre grupos, considerando estruturas populacionais pré-definidas (Wright, 1965). O F_{ST} foi baseado em 10.000 permutações, através do programa Arlequin. Também foi construída uma matriz de distância genética, baseada nos valores de comparação de F_{ST} par-à-par, entre as nove áreas geográficas.

2.4 Lista de material analisado

Bacia do rio Taquari: alto rio das Antas: Brasil: MCP 53197, 2 em álcool, 2 tecidos, 2 tecidos analisados, rio das Antas, foz das Trutas, São José dos Ausentes, Rio Grande do Sul (28°47'04"S 49°58'57"O). MCP 35069, 12 em álcool, 2 analisados, 77,1-89,7 mm SL, afluente do rio Taquari, São José dos Ausentes, Rio Grande do Sul (28°47'03"S 49°58'57"O). UFRGS 8910, 22 em álcool, 3 analisados, 73,5-84,9 mm SL, rio das Antas, São José dos Ausentes, Rio Grande do Sul (28°47'01"S 49°58'57"O). UFRGS 8911, 39 em álcool, 2 analisados, 78,2-79,3 mm SL, rio das Antas, São José dos Ausentes, Rio Grande do Sul (28°47'01"S 49°58'56"O). MCP 25666, 5 em álcool, 2 analisados, 80,7-90,7 mm SL, rio das Antas, vale das trutas, São José dos Ausentes, Rio Grande do Sul (≈28°47'00"S ≈49°59'00"O). MCP 25668, 9 em álcool, 5 analisados, 76,5-91,7 mm SL, rio das Antas, São José dos Ausentes, Rio Grande do Sul (28°47'00"S 49°59'00"O). MCP 35068, 13 em álcool, 2 analisados, 76,5-77,4 mm SL, afluente do rio das Antas, São José dos Ausentes, Rio Grande do Sul (28°48'36"S 49°59'37"O). UFRGS 21850, 2 em álcool, 1 analisado, 82,9 mm SL, arroio São Gonçalo, afluente do rio das Antas, São José dos Ausentes, Rio Grande do Sul (28°52'09"S 50°01'14"O). UNISINOS 53, 1 tecido, 1 tecido analisado, arroio Perdizes, Cambará do Sul, Rio Grande do Sul (29°09'25"S 50°03'06"O). UNISINOS 97, 1 tecido, 1 tecido analisado, Ponte Guarita, Cambará do Sul, Rio Grande do Sul (29°09'25"S 50°03'06"O). MCP 50156, 6 em álcool, 3 analisados, 73,3-99,9 mm SL, drenagem do rio das Antas, Cambará do Sul,

Rio Grande do Sul (28°52'12"S 50°01'13"O). UNISINOS 2368, 19 em álcool, 1 analisado, 98,1 mm SL, rio Camisas, Cambará do Sul, Rio Grande do Sul (29°06'14"S 50°07'40"O). MCP 53186, 28 em álcool, 3 analisados, 75,2, 95,4 mm SL, 1 tecido, 1 tecido analisado, riacho afluente do rio Camisas, Cambará do Sul, Rio Grande do Sul (29°10'46"S 50°08'13"O). UNISINOS 842, 16 em álcool, 1 analisado, 89,1 mm SL, rio Camisas, Cambará do Sul, Rio Grande do Sul (29°10'45"S 50°08'13"O). UNISINOS 2579, 6 em álcool, 1 analisado, 87,2 mm SL, rio Camisas, Cambará do Sul, Rio Grande do Sul (29°06'04"S 50°06'50"O). MCP 53190, 24 em álcool, 3 analisados, 65,4-88,6 mm SL, arroio Baia Branco, afluente do rio das Antas, Tainhas, Rio Grande do Sul (29°12'34"S 50°14'19"O). MCP 50093, 3 em álcool, 3 tecidos, 1 tecido analisado, arroio Baio Branco, Tainhas, Rio Grande do Sul (29°12'32"S 50°14'17"O). MCP 41308, 19 em álcool, 1 analisado, 71,8 mm SL, rio Contendas, Tainhas, Rio Grande do Sul (29°16'43"S 50°14'41"O). MCP 48714, 3 em álcool, 3 tecidos, 1 tecido analisado, rio Contendas, Tainhas, Rio Grande do Sul (29°16'56"S 50°22'60"O). MCP 53185, 5 em álcool, 1 analisado, 83,0 mm SL, riacho afluente do rio Tainhas, Tainhas, Rio Grande do Sul (29°15'03"S 50°16'42"O). MCP 53187, 19 em álcool, 2 analisados, 69,4-69,8 mm SL, 3 tecidos, 1 tecido analisado, arroio Ribeirão, afluente do rio das Antas, Tainhas, Rio Grande do Sul (29°14'02"S 50°22'30"O). MCP 22346, 15 em álcool, 1 analisado, 70,4 mm SL, arroio Ribeirão, rota do Sol, Tainhas, Rio Grande do Sul (29°13'57"S 50°22'33"O). **Médio rio das Antas:** Brasil: MCP 53200, 23 em álcool, 2 analisados, 73,2-75,0 mm SL, 2 tecidos, 1 tecido analisado, arroio Barreiro, Bom Jesus, Rio Grande do Sul (28°46'49"S 50°28'48"O). MCP 22793, 78 em álcool, 4 analisados, 78,2-82,2 mm SL, arroio Barreiro, Bom Jesus, Rio Grande do Sul (28°46'48"S 50°28'48"O). MCP 53184, 17 em álcool, 1 analisado, 76,6 mm SL, 5 tecidos, 1 tecido analisado, arroio São Tomé, afluente do rio das Antas, Lageado Grande, Rio Grande do Sul (29°02'21"S 50°34'09"O). MCP 50159, 17 em álcool, 3 analisados, 70,1-82,4 mm SL, 6 tecidos, 2 analisados, ponte na RS 476, entre Lageado Grande e Bom Jesus, Rio Grande do Sul (29°02'21"S 50°34'08"O). MCP 22351, 1 em álcool, 1 analisado, 82,5 mm SL, rio Lageado Grande, Lageado Grande, Rio Grande do Sul (29°05'34"S 50°37'30"O). MCP 48729, 3 em álcool, 2 analisados, 80,3-87,5 mm SL, arroio Buriti junto a foz do arroio Porto Morto, Lageado Grande, Rio Grande do Sul (29°05'35"S 50°37'32"O). MCP 50107, 1 em álcool, 1 tecido, 1 tecido analisado, estrada RS-476, Lageado Grande, Rio Grande do Sul (29°54'35"S 50°374'32"O). MCP 42786, 64 em álcool, 4 analisados, 70,1-76,6 mm SL, arroio Governador, bacia do rio das Antas, Bom Jesus, Rio Grande do Sul (28°44'02"S 50°40'42"O). MCP 48711, 40 em álcool, 8 tecidos, 1 tecido analisado, arroio Governador, Bom Jesus, Rio Grande do Sul (28°44'24"S 50°40'43"O). MCP 43972, 20 em álcool, 1 analisado, 103,5 mm SL, arroio Governador, bacia do rio das Antas, Bom Jesus, Rio Grande do Sul (28°44'23"S 50°40'42"O). MCP 43343, 24 em álcool, 3 analisados, 76,5-87,4 mm SL, arroio Governador, bacia do rio das Antas, Bom Jesus, Rio Grande do Sul (28°44'23"S 50°40'42"O). MCP 42792, 32 em álcool, 1 analisado, 70,1, arroio Governador, bacia do rio das Antas, Bom Jesus, Rio Grande do Sul (28°47'42"S 50°42'18"O). MCP 48327, 1 em álcool, 1 analisado, 99,2 mm SL, rio São Tomé, bacia do rio das Antas, São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul (28°48'59"S 50°46'31"O). MCP 32405, 24 em álcool, 1 analisado, 78,8 mm SL, arroio São Tomé, tributário do rio das Antas, São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul (29°02'19"S 50°34'07"O). MCP 43518, 1 em álcool, 1 analisado, 90,5 mm SL, drenagem Jacuí, córrego Serra Negra, Rio Grande do Sul (28°56'33"S 51°14'12"O). **Rio da Prata:** Brasil: MCP 22787, 24 em álcool, 7 analisados, 73,0-99,2 mm SL, arroio Espeto/rio dos Soares, Muitos Capões, Rio Grande do Sul (28°23'26"S 51°03'22"O). MCP 35066, 6 em álcool, 1 analisado, 75,7 mm SL, arroio Espeto/ rio dos Soares, Muitos Capões, Rio Grande do Sul (28°23'26"S 51°03'22"O). MCP 49481, 28 em álcool, 1 analisado, 66,5 mm SL, 1 tecido, 1 tecido analisado, rio Tavocá, Muitos Capões, Rio Grande do Sul (28°21'53"S 51°17'53"O). MCP 22799, 58 em álcool, 2 analisados, 78,6-99,0 mm SL, arroio afluente do rio Taquari, Muitos Capões, Rio Grande do Sul (28°21'51"S 51°17'53"O). MCP 49470, 2 em álcool, 1 tecido, 1 tecido analisado, arroio Carazinho, Lagoa Vermelha, Rio Grande do Sul (28°16'26"S 51°28'07"O). MCP 22788, 1 em álcool, 1 analisado, 75,9 mm SL, arroio Carazinho, Lagoa Vermelha, Rio Grande do Sul (28°17'36"S 51°24'42"O). MCP 49497, 11 em álcool, 3 analisados, 71,5-78,5 mm SL, ponte na RS-470 em Santo Antônio do Turvo, Lagoa Vermelha, Rio Grande do Sul (28°24'19"S 51°29'25"O). MCP 35054, 16 em álcool, 4 analisados,

71,0-94,4 mm SL, rio Turvo, Rio Grande do Sul (28°24'19"S 51°29'25"O). MCP 49478, 16 em álcool, 1 analisado, 71,8 mm SL, 1 tecido, 1 tecido analisado, Ponte BR-470 entre Laranjal-Turvo, Turvo, Rio Grande do Sul (28°25'52"S 51°29'39"O). MCP 35053, 17 em álcool, 1 analisado, 70,1 mm SL, arroio Herval, Guabiju, Rio Grande do Sul (28°39'35"S 51°37'5"O). MCP 50356, 5 em álcool, 2 analisados, 88,4-94,3 mm SL, 3 tecidos, 1 tecido analisado, arroio na estrada, André da Rocha, Rio Grande do Sul (28°39'34"S 51°37'04"O). MCP 49485, 20 em álcool, 2 analisados, 78,6-96,0 mm SL, 1 tecido, 1 tecido analisado, arroio sob a ponte da RS-355, Vila Flores, Rio Grande do Sul (28°52'48"S 51°35'19"O). **Bacia do rio Uruguai: rio Pelotas:** Brasil: MCP 22348, 13 em álcool, 1 analisado, 84,2 mm SL, rio Tambezinho, Bom Jardim da Serra, Santa Catarina (28°13'45"S 49°36'03"O). MCP 22350, 11 em álcool, 1 analisado, 70,2 mm SL, rio Cachoeira, Bom Jardim da Serra, Santa Catarina (28°18'26"S 49°37'02"O). MCP 22347, 17 em álcool, 1 analisado, 71,7 mm SL, rio Barrinha, Bom Jardim da Serra, Santa Catarina (28°20'15"S 49°37'49"O). MCP 22345, 6 em álcool, 1 analisado, 72,3 mm SL, rio Capivaras, Bom Jardim da Serra, Santa Catarina (28°24'21"S 49°38'26"O). UFRGS 8152, 3 em álcool, 1 analisado, 88,3 mm SL, rio Capivaras, bacia do rio Pelotas, Bom Jardim da Serra, Santa Catarina (28°24'20"S 49°38'26"O). UFRGS 7134, 1 em álcool, 1 analisado, 98,2 mm SL, arroio Lajeado, Bom Jardim da Serra, Rio Grande do Sul (28°28'46"S 49°43'20"O). MCP 22340, 23 em álcool, 1 analisado, 78,2 mm SL, arroio afluente do rio Lava-Tudo, Urubici, Santa Catarina (28°08'14"S 49°38'55"O). UFRGS 9552, 35 em álcool, 3 analisados, 78,7-82,2 mm SL, arroio Lajeado, São José dos Ausentes, Rio Grande do Sul (28°42'24"S 49°55'41"O). UFRGS 9553, 17 em álcool, 2 analisados, 70,0-93,0 mm SL, arroio Lajeado, São José dos Ausentes, Rio Grande do Sul (28°42'24"S 49°55'41"O). UFRGS 9554, 5 em álcool, 1 analisado, 83,1 mm SL, arroio Lajeado, São José dos Ausentes, Rio Grande do Sul (28°42'24"S 49°55'41"O). UFRGS 21876, 2 em álcool, 1 analisado, 93,8 mm SL, rio da Divisa, afluente do rio Pelotas, São José dos Ausentes, Rio Grande do Sul (28°40'16"S 49°57'56"O). UFRGS 21907, 2 tecidos, 1 tecido analisado, arroio sem nome afluente do rio Pelotas, São José dos Ausentes, Rio Grande do Sul (28°40'26"S 49°58'00"O). UFRGS 9551, 2 em álcool, 1 analisado, 83,8 mm SL, rio Silveira, São José dos Ausentes, Rio Grande do Sul (28°35'53"S 49°58'07"O). UFRGS 9541, 11 em álcool, 3 analisados, 78,0-85,9 mm SL, rio do Marco, São José dos Ausentes, Rio Grande do Sul (28°36'07"S 49°58'57"O). MCP 49988, 17 em álcool, 1 analisado, 74,8 mm SL, 1 tecido, 1 tecido analisado, rio dos Touros, São José dos Ausentes, Rio Grande do Sul (28°41'40"S 50°07'49"O). MCP 50164, 1 em álcool, 1 tecido, 1 tecido analisado, drenagem Pelotas, ponte sobre o arroio na RS-020, Rio Grande do Sul (28°36'22"S 49°56'06"O). MCP 49994, 1 em álcool, 1 tecido, 1 tecido analisado, arroio Aspa de Cobra, Silveira, Rio Grande do Sul (28°38'08"S 50°02'54"O). UFRGS 7163, 17 em álcool, 1 analisado, 83,0, rio Antoninha, estrada Lages, bacia do rio Pelotas, São Joaquim, Santa Catarina (28°15'03"S 49°58'16"O). MCP 53198, 18 em álcool, 2 analisados, 69,0-68,8 mm, drenagem Uruguai, rio Cerquinha, Bom Jesus, Rio Grande do Sul (28°32'57"S 50°11'24"O). MCP 50023, 66 em álcool, 3 analisados, 70,5-93,6 mm SL, 1 tecido, 1 tecido analisado, arroio Carretão, afluente rio dos Touros, Bom Jesus, Rio Grande do Sul (28°37'29"S 50°14'20"O). MCP 13764, 1 em álcool, 1 analisado, 70,7 mm SL, arroio Água Branca, rio Uruguai, Bom Jesus, Rio Grande do Sul (≈28°36'00"S ≈50°24'00"O). **Rio Canoas:** Brasil: MCP 53241, 42 em álcool, 23 analisados, 74,5-115,0 mm SL, 6 tecidos, 3 tecidos analisados, rio Ponte Alta, tributário do rio Canoas, Ponte Alta, Santa Catarina (27°29'13"S 50°22'37"O). MCP 52573, 1 em álcool, 1 analisado, 96,0 mm SL, rio Canoas, Campo Belo do Sul, Rio Grande do Sul (27°42'45"S 50°40'10"O). MCP 53208, 22 em álcool, 2 tecidos, 2 tecidos analisados, rio São João, drenagem do rio Canoas, Campos Novos, Santa Catarina (27°23'31"S 51°09'31"O). **Médio rio Uruguai:** Brasil: MCP 19388, 4 em álcool, 1 analisado, 77,9 mm SL, arroio afluente do rio Canoas, Tupitinga, Santa Catarina (27°33'54"S 51°23'06"O). MCP 47753, 31 em álcool, 1 analisado, 84,2 mm SL, rio Marmeleiro, Barracão, Rio Grande do Sul (27°36'55"S 51°28'31"O). MCP 51229, 2 em álcool, 1 analisado, 84,3 mm SL, 1 tecido, 1 tecido analisado, rio Forquilha, Paim Filho, Rio Grande do Sul (27°40'36"S 51°44'09"O). MCP 41462, 3 em álcool, 1 analisado, 69,8 mm SL, rio Forquilha, Machadinho, Rio Grande do Sul (27°37'04"S 51°45'03"O). MCP 50946, 31 em álcool, 3 analisados, 74-87,8 mm SL, rio Forquilha entre Machadinho e Maximiliano de Almeida, Rio Grande do Sul (27°36'48"S 51°45'10"O). MCP 51452, 9 em álcool, 6 analisados, 71,9-93,8 mm SL, 1 tecido, 1 tecido analisado, rio Forquilha, Maximiliano de

Almeida, Rio Grande do Sul (27°37'11"S 51°45'09"O). MCP 51270, 40 em álcool, 1 analisado, 76,8 mm SL, 2 tecidos, 1 tecido analisado, rio Forquilha, Maximiliano de Almeida, Rio Grande do Sul (27°36'50"S 51°45'13"O). MCP 53255, 4 em álcool, 2 analisados, 73,6-92,6 mm SL, 1 tecido, drenagem Uruguai, rio Forquilha, Maximiliano de Almeida, Rio Grande do Sul (27°37'13"S 51°45'12"O). MCP 41481, 2 em álcool, 1 analisado, 89,9 mm SL, rio Forquilha, Maximiliano de Almeida, Rio Grande do Sul (27°38'54"S 51°45'16"O). MCP 18800, 5 em álcool, 3 analisados, 73,2-87,5 mm SL, rio Uruguai, Concórdia, Rio Grande do Sul (27°38'54"S 51°45'16"O). MCP 53255, 4 em álcool, 2 analisados, 73,7-92,6 mm SL, rio Forquilha, Maximiliano de Almeida, Rio Grande do Sul (27°19'11"S 51°55'30"O). MCP 18799, 5 em álcool, 1 analisado, 71,2 mm SL, rio Rancho Grande, Concórdia, Rio Grande do Sul (27°19'11"S 051°55'30"O). MCP 51286, 2 em álcool, 1 analisado, 96,0 mm SL, 2 tecidos, 2 tecidos analisados, rio Jabutinga, Arabutã, Santa Catarina (27°09'40"S 52°08'54"O). **Rio Passo Fundo:** Brasil: MCP 27028, 5 em álcool, 1 analisado, 65,4 mm SL, rio Abaúna, Getúlio Vargas, Rio Grande do Sul (27°52'60"S 52°14'00"O). MCP 46819, 19 em álcool, 1 analisado, 72,2 mm SL, arroio afluyente do rio Erechim, Erebangó, Rio Grande do Sul (27°48'16"S 52°20'20"O). MCP 46772, 19 em álcool, 1 analisado, 80,4 mm SL, 2 tecidos, 2 analisados, arroio afluyente do Lageado Grande, Barão de Cotegipe, Rio Grande do Sul (27°37'26"S 52°23'23"O). MCP 53257, 16 em álcool, 5 analisados, 61,8-81,7 mm SL, 4 tecidos, 2 analisados, arroio Lageado Grande, afluyente do rio Passo Fundo, Barão de Cotegipe, Rio Grande do Sul (27°37'26"S 52°23'23"O). MCP 47906, 35 em álcool, 1 analisado, 71,4 mm SL, drenagem do rio Uruguai, Rondinha, Rio Grande do Sul (27°55'03"S 52°50'39"O). MCP 44272, 2 em álcool, 2 analisados, 64,5-64,8 mm SL, rio Passo Fundo, Nonoai, Rio Grande do Sul (27°20'43"S 52°43'51"O). MCP 26508, 3 em álcool, 1 analisado, 72,7 mm SL, foz do arroio Lageado do Tigre no rio Passo Fundo, Nonoai, Rio Grande do Sul (27°21'60"S 52°43'00"O). MCP 43227, 1 em álcool, 1 analisado, 84,6 mm SL, rio Passo Fundo, Nonoai, Rio Grande do Sul (27°20'54"S 52°43'57"O). MCP 44271, 17 em álcool, 2 analisados, 79,0-84,8 mm SL, rio Passo Fundo, Nonoai, Rio Grande do Sul (27°20'43"S 52°43'51"O). MCP 53254, 1 em álcool, 1 analisado, 65,7 mm SL, 1 tecido, 1 analisado, Lageado do Tigre, junto a foz do rio Passo Fundo, Nonoai, Rio Grande do Sul (27°20'04"S 52°44'09"O). **Rio Chapecó:** Brasil: MCP 40058, 5 em álcool, 1 analisado, 60,5 mm SL, foz do rio Chapecó, Aberlado Luz, Santa Catarina (26°33'03"S 52°19'10"O). MCP 48283, 12 em álcool, 3 tecidos, 3 tecidos analisados, arroio afluyente do rio Chapecó, Abelardo Luz, Santa Catarina (26°33'05"S 52°19'10"O). MCP 40150, 2 em álcool, 2 analisados, 85,1-91,2 mm, rio Chapecó, Aberlado Luz, Santa Catarina (26°33'35"S 52°19'41"O). MCP 48282, 12 em álcool, 1 analisado, 62,00 mm SL, arroio na estrada Formosa do Sul, rio Chapecó, Santa Catarina (26°38'22"S 52°54'08"O). MCP 40132, 6 em álcool, 2 analisados, 84,4-86,7 mm SL, 1 tecido, 1 tecido analisado, rio Saudade, Santa Catarina (26°47'10"S 53°02'43"O). MCP 53263, 36 em álcool, 5 analisados, 61,4-81,3 mm SL, 6 tecidos, 1 tecido analisado, rio Saudade, Modelo, Santa Catarina (26°47'11"S 53°02'58"O). **Rio Ijuí:** Brasil: MCP 21114, 29 em álcool, 1 analisado, 79,9 mm SL, rio Morimotimã, Condor, Rio Grande do Sul (≈28°12'00"S ≈53°31'00"O). MCP 21115, 25 em álcool, 1 analisado, 78,4 mm SL, rio Morimotimã, Condor, Rio Grande do Sul (≈28°13'00"S ≈53°33'00"O). MCP 21191, 49 em álcool, 2 analisados, 79,2-80,5 mm SL, rio Alegre, Condor, Rio Grande do Sul (≈28°11'00"S ≈53°27'00"O). MCP 18741, 29 em álcool, 1 analisado, 87,2 mm SL, rio Alegre, Condor, Rio Grande do Sul (≈28°11'00"S 53°27'00"O). MCP 53274, 60 em álcool, 5 analisados, 76,5-85,0 mm SL, riacho afluyente do rio Palmeira, drenagem do rio Ijuí, Condor, Rio Grande do Sul (28°12'31"S 28°12'31"O). MCP 49204, 2 em álcool, 1 analisado, 81,8 mm SL, rio Palmeira, Panambi, Rio Grande do Sul (28°14'35"S 53°33'12"O). MCP 48639, 13 em álcool, 1 analisado, 75,3 mm SL, rio Palmeira, Panambi, Rio Grande do Sul (28°15'03"S 53°33'49"O). UFRGS 11704, 3 em álcool, 1 analisado, 79,6 mm SL, rio Divisa, bacia rio Ijuí, Panambi, Rio Grande do Sul (28°13'19"S 53°34'5"O). MCP 53273, 10 em álcool, 2 tecidos, 1 tecido analisado, rio Caxambu, Pejuçara, Rio Grande do Sul (28°19'37"N 53°39'19"O). MCP 50927, 4 em álcool, 1 tecido, 1 tecido analisado, rio Potiribu, Ijuí, Rio Grande do Sul (28°22'10"S 53°52'43"O). UFRGS 18228, 4 tecidos, 1 tecido analisado, jusante PCH rio Alegre, Condor, Rio Grande do Sul (28°12'10"S 53°26'39"O). MCP 50127, 3 em álcool, 3 tecidos, 2 tecidos analisados, rio Potiribu, rio Ijuí, Rio Grande do Sul (28°22'09"N 53°52'43"O). MCP 32562, 1 em álcool, 1 analisado, 109,4 mm SL, rio Potiribu, afluyente do rio Ijuí, rio Ijuí, Rio Grande do Sul (28°25'00"S

53°47'00"O). MCP 41707, 24 em álcool, 3 analisados, 79,5-87,7 mm SL, rio Potiribu, afluente do rio Ijuí, Dr. Bozano, Rio Grande do Sul (28°24'00"S 53°48'00"O). MCP 41698, 49 em álcool, 3 analisados, 80,3-99,9 mm SL, rio Potiribu, afluente do rio Ijuí, Bozano, Rio Grande do Sul (≈28°24'00"S 53°48'00"O). MCP 44995, 4 em álcool, 1 analisado, 89,66 mm SL, rio Conceição, drenagem do rio Ijuí, rio Ijuí, Rio Grande do Sul (28°28'38"S 53°56'02"O). MCP 44993, 2 em álcool, 2 analisados, 81,2-106,1 mm SL, rio Conceição, drenagem do rio Ijuí, Rio Grande do Sul (28°28'12"S 53°56'52"O). UFRGS 6034, 4 em álcool, 2 analisados, 88,7-102,2 mm SL, rio Ijuí, Ijuí, Rio Grande do Sul (28°19'00"S 53°58'00"O). MCP 16792, 16 em álcool, 1 analisado, 85,2 mm SL, arroio Lageado do Moinho, afluente rio Ijuizinho, Entre Injuís, Rio Grande do Sul (≈28°27'00"S 54°22'00"O). **Grupo externo:** Brasil: MCP 41909, *Pareiorhaphis azygolechis*, 1 tecido, 1 tecido analisado, rio Araraquara na estrada BR - 101, ao norte de Garuva, Santa Catarina (25°57'56"S 48°49'43"O). MCP 41289, *Pareiorhaphis steindachneri*, 1 tecido, 1 tecido analisado, rio da Prata, na Santa Catarina – 301, entre Joinville e São Bento do Sul, Santa Catarina (26°10'31"S 48°57'10"O). UFRGS 14619, *Pareiorhaphis vestigipinnis*, 2 tecidos, 1 tecido analisado, córrego Passo Fundo, afluente do rio Painel, bacia do rio Caveiras, Santa Catarina (27°54'34"S 50°05'15"O). MCP 43034, *Pareiorhaphis vestigipinnis*, 3 tecidos, 2 tecidos analisados, córrego do Engenho Velho, afluente do córrego Passo Fundo, bacia do rio Caveiras, Santa Catarina (27°54'12"S 50°04'19"O).

3. Resultados

3.1 Análise Morfológica

3.1.1 Desenvolvimento dos odontódeos e da intumescência lateral

A análise morfológica dos espécimes das duas bacias hidrográficas apresentou variações quanto aos padrões de desenvolvimento dos odontódeos hipertrofiados na região da cabeça, assim como o grau de desenvolvimento da intumescência lateral da cabeça, ambos encontrados em machos maduros. Foi observado, de forma geral, mais de um padrão de desenvolvimento dessas estruturas, tanto por área geográfica como dentro de cada área.

Os padrões mais marcantes dentro da bacia do rio Taquari foram os seguintes: alguns exemplares do rio da Prata e do alto rio das Antas apresentaram intumescência bem desenvolvida, enquanto os odontódeos se mostraram pouco visíveis (Fig. 5GIK). O médio rio das Antas apresentou exemplares, de forma geral, com odontódeos visíveis e bem desenvolvidos, assim como a intumescência (Fig. 5EJ).

Quanto aos espécimes da bacia do rio Uruguai, machos do rio Chapecó, apresentaram intumescência e odontódeos levemente desenvolvidos (Fig. 5A). Alguns machos do rio Pelotas possuem a intumescência evidente, com odontódeos maiores e bem desenvolvidos, similar ao médio rio das Antas (Fig. 5E). Quanto aos espécimes do rio Ijuí, alguns apresentaram intumescência lateral e odontódeos desenvolvidos (Fig. 5BH), porém, geralmente menores/ou pouco visíveis quando comparados aos do médio rio das Antas e ao rio Pelotas. No rio Passo Fundo, de forma geral, a intumescência lateral estava visível, com odontódeos pouco desenvolvidos (Fig. 5D). Machos do médio rio Uruguai

apresentaram pequenos odontódeos junto a intumescência, essa também pouco desenvolvida (Fig. 5C). Por fim, nos machos do rio Canoas foi observada uma intumescência maior, com odontódeos pouco visíveis (Fig. 5F). Um maior desenvolvimento de odontódeos está localizado preferencialmente junto a intumescência lateral de machos.

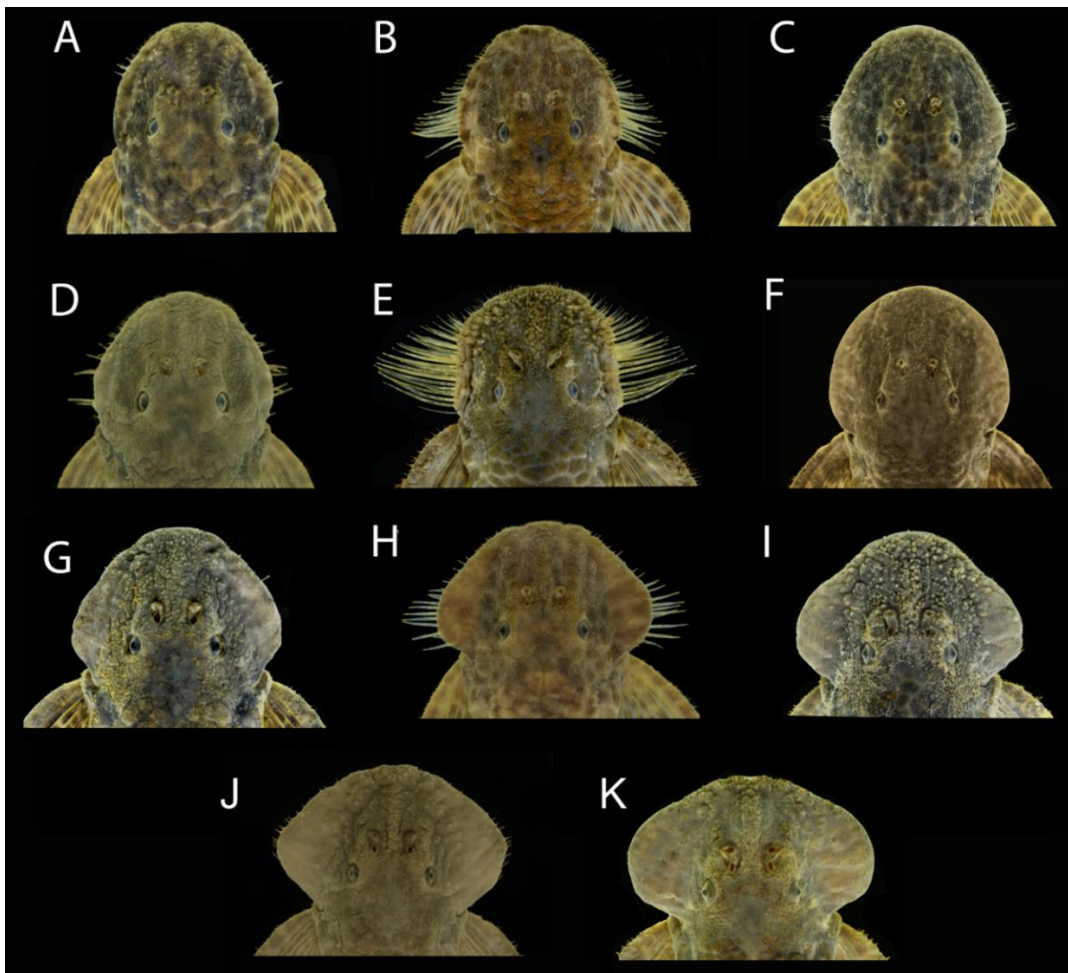


Figura 5: Variação no desenvolvimento da intumescência lateral e de odontódeos, presente em machos de *Pareiorhaphis hystrix*: indivíduo do rio Chapecó - MCP 40150 (A), rio Ijuí - MCP 11704 (B), médio rio Uruguai - MCP 50946 (C), rio Passo Fundo - MCP 53257 (D), médio rio das Antas - MCP 48327 (E), rio Canoas – MCP 53259 (F), rio da Prata - MCP 22787 (G), rio Ijuí - MCP 21191 (H), alto rio das Antas - MCP 50156 (I), médio rio das Antas – MCP 43518 (J), alto rio das Antas -UFRGS 8910 (K).

Machos de *Pareiorhaphis hystrix* também apresentaram odontódeos sobre o espinho da nadadeira peitoral, apesar do padrão não ser bem desenvolvido. Os odontódeos nessa região são mais delicados e homogêneos, sem grandes padrões de diferenciação. Contudo, é possível observar alguns machos adultos com odontódeos um pouco maiores

na região (Fig. 6B), porém, outros espécimes também adultos (Fig. 6A) apresentaram odontódeos pequenos e pouco visíveis na região em destaque.

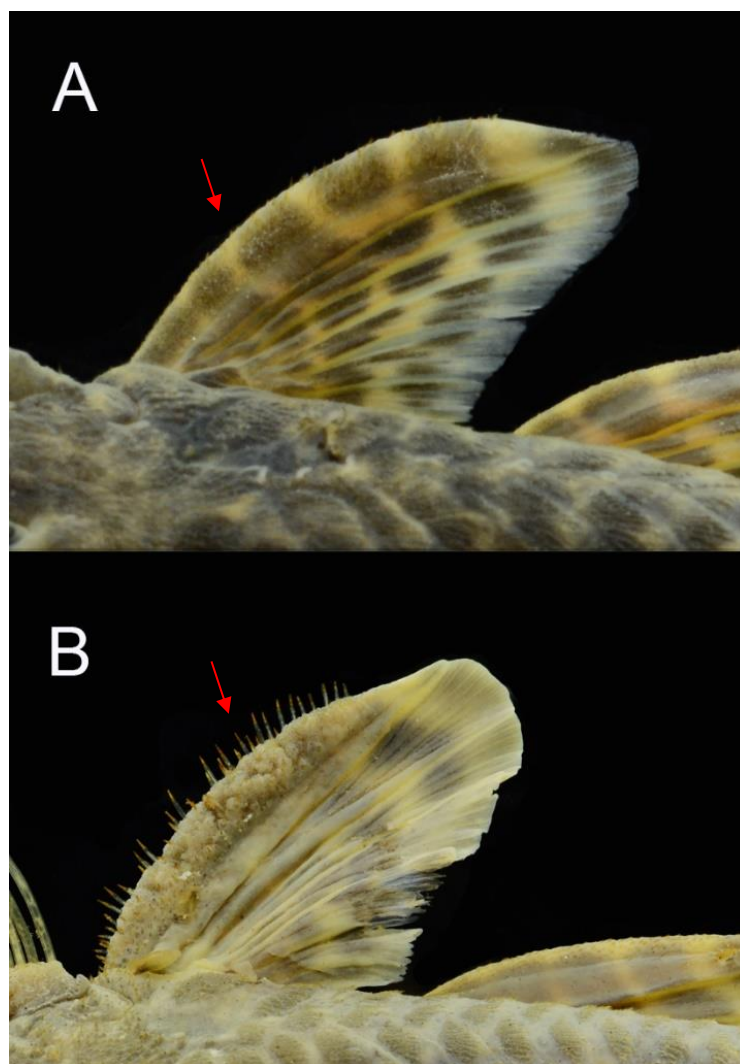


Figura 6: Desenvolvimento padrão de odontódeos sobre o espinho da nadadeira peitoral presente em machos de *Pareiorhaphis hystrix*. Padrão curto, espécime do médio rio Uruguai– MCP 50946 (A), maior padrão observado, espécime do médio rio das Antas - MCP 48327 (B). Flechas indicam a variação nos odontódeos.

3.1.2 Padrão de colorido

Quanto ao padrão de colorido dos espécimes, *Pareiorhaphis hystrix* é descrita por Pereira, Reis (2002) com superfície dorsal do corpo e da cabeça em tons de cinza escuro, às vezes acastanhada, coberto por manchas castanho-escuras a negras, irregularmente dispersas, menores e mais discretas na cabeça. A região ventral é caracterizada por um amarelo claro. A análise de exemplares das diferentes áreas mostrou alguns padrões leves de diferenciação, onde essas variações podem ser observadas dentro das próprias áreas.

No geral, a coloração dos espécimes variou dorsalmente de cinza a tons mais escuros e com manchas dispersas, apresentando a região ventral em tons de amarelo. Alguns espécimes da bacia do rio Uruguai, coletados no rio Ijuí (Fig. 7AB) e no rio Pelotas, mostraram pontuações escuras bem visíveis ao longo da cabeça, também podendo ser observado ao longo da superfície dorsal do corpo. Alguns espécimes do alto e médio rio das Antas, bacia do rio Taquari, também mostraram padrão similar, contudo, mais discreto. Outros exemplares do rio Ijuí, médio rio Uruguai e do alto rio das Antas apresentaram coloração dorsal mais escura, com padrão mais manchado (Fig. 7CD).

3.1.3 Desenvolvimento de placas na região abdominal

A análise de espécimes diafanizados não constatou diferenças na osteologia. A presença de placas abdominais foi analisada mais detalhadamente e essas foram observadas em exemplares das diferentes áreas geográficas. Exemplares da bacia do rio Uruguai mostraram predomínio de placas, com exceção dos espécimes do rio Pelotas e, os da bacia do rio Taquari não apresentaram placas abdominais.

De forma geral, *Pareiorhaphis hystrix* apresenta algumas placas na região abdominal, restritas a cada lado da cintura escapular, logo após a abertura das brânquias (Fig. 8A-E). Observou-se em um indivíduo do rio Passo Fundo (Fig. 8A) um número maior de placas na região escapular, comumente elas se mostram diminutas e em menor quantidade (Fig. 8B-E), com odontódeos implantados sobre elas. As placas estão localizadas na região mediana e nas bordas da cintura escapular, podendo se mostrar mais próximas umas das outras ou mais dispersas, sendo geralmente observadas apenas em espécimes adultos, tanto em machos quanto em fêmeas.

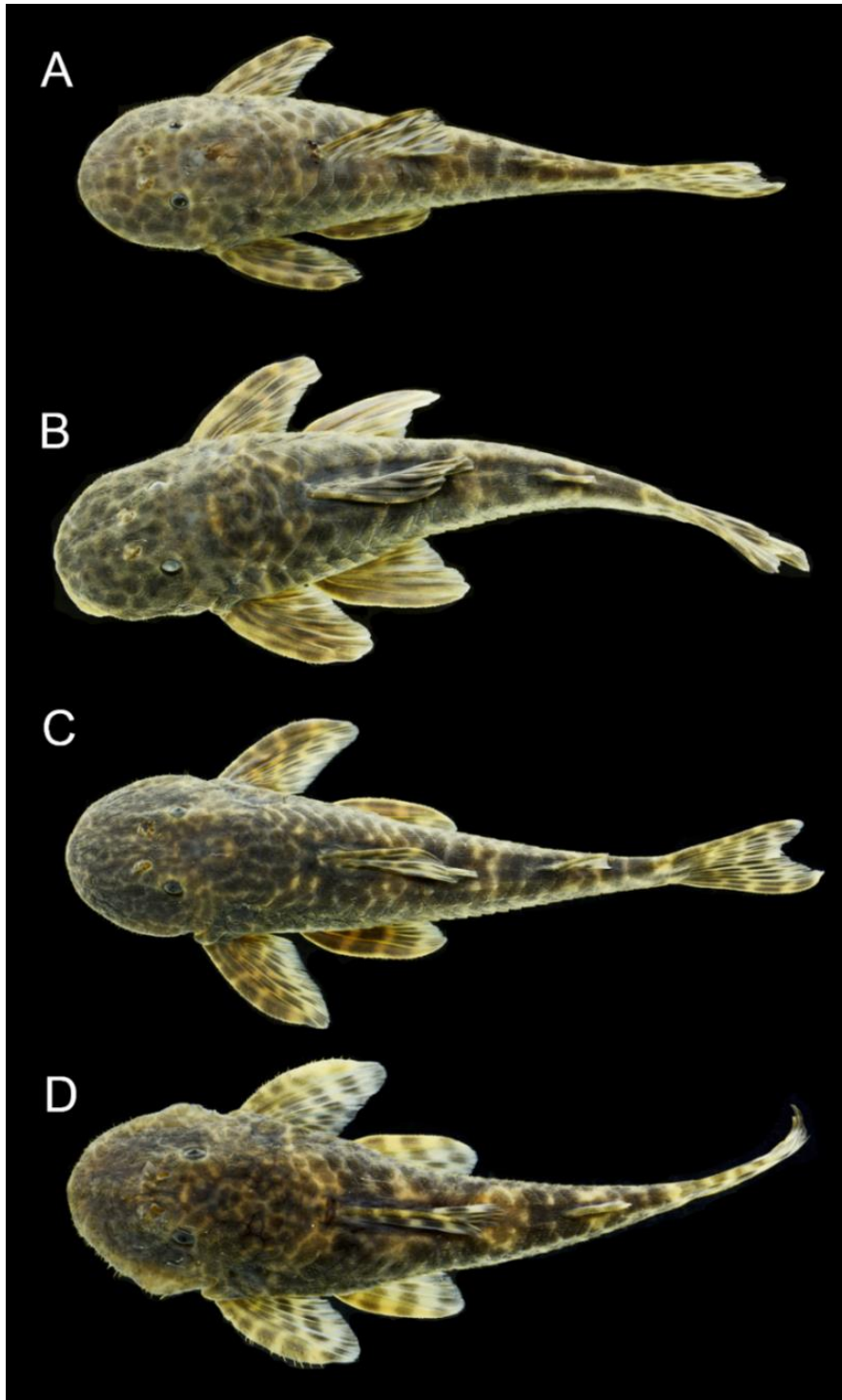


Figura 7: Variação no colorido de espécimes de *Pareiorhaphis hystrix*: fêmea do rio Ijuí – pontuações escuras (MCP 48639, 75,3 mm CP) (A), fêmea do rio Ijuí - pontuações escuras (MCP 44995, 89,66 mm CP) (B), macho do médio rio Uruguai - padrão manchado escuro (MCP 51452, 86,36 mm CP) (C), macho do alto rio das Antas - padrão manchado escuro (UFRGS 21850, 82,9 mm CP) (D).

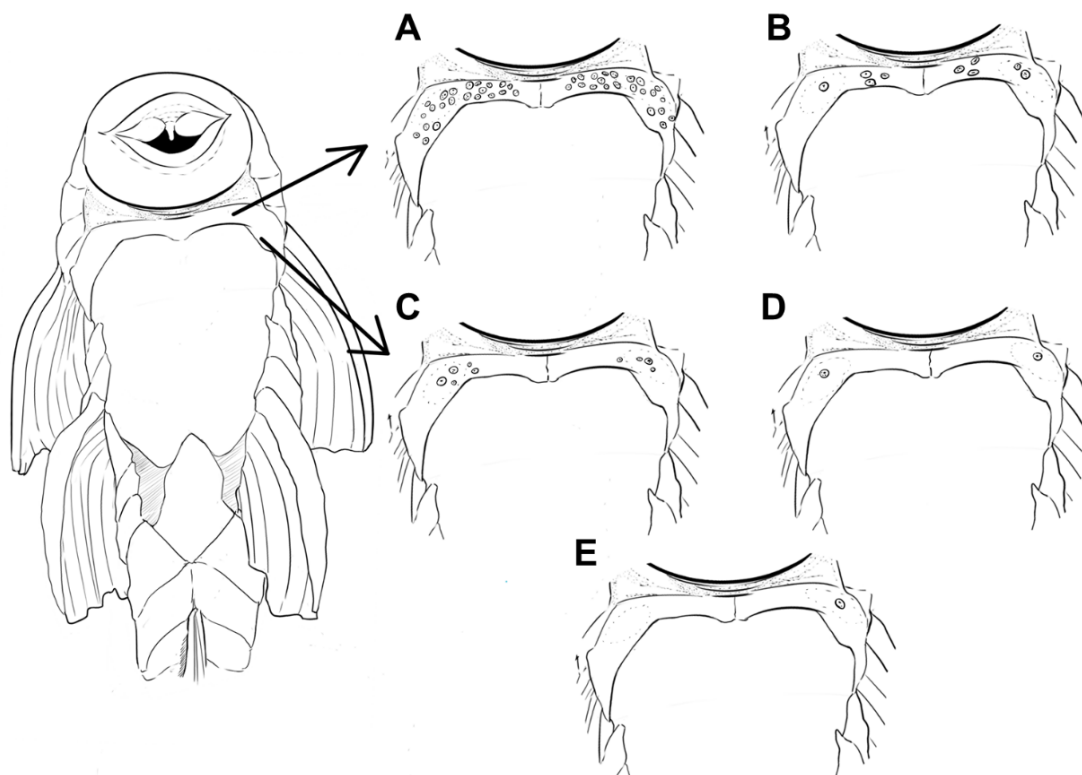


Figura 8: Desenho esquemático da variação de placas abdominais encontradas em espécimes de *Pareiorhaphis hystrix*. Maior número de placas encontradas em exemplar do rio Passo Fundo (A), variação encontrada em diferentes exemplares das áreas do rio Passo Fundo, rio Chapecó, médio rio Uruguai, rio Canoas e rio Ijuí (B-E).

3.1.4 Análises merísticas e morfométricas

A comparação entre os dados merísticos e morfométricos dos espécimes das nove áreas estudadas gerou nove tabelas detalhadas (Tabs. 3-11).

Quanto aos padrões de variações merísticas (Fig. 9A-N), observou-se variações estatisticamente significativas no número de dentes analisados: número de dentes do pré-maxilar (ANOVA, $p=0,0003$, $f=3,90$), onde o teste de Tukey indicou valores significativos de diferenciação entre o rio Canoas e as demais localidades ($p<0,05$), com exceção do rio Chapecó ($p=0,06$), do rio Ijuí ($p=0,69$) e do médio rio Uruguai ($p=0,15$); número de dentes do dentário (ANOVA, $p=1,053E-07$, $f=6,64$), em que espécimes do rio Canoas diferiram dos espécimes das demais áreas ($p<0,05$) - com exceção do rio Ijuí ($p=0,7$), o rio Pelotas diferiu significativamente do rio Ijuí ($p=0,002$).

A merística também indicou variações significativas no número de placas encontradas nos exemplares, como: placas em série lateral mediana ($p=8,667E-13$, $f=10,94$), com o rio Canoas se diferenciando das demais áreas ($p<0,05$), com exceção do rio Chapecó ($p=0,8$) e do rio Passo ($p=0,6$). Ainda, de forma geral, as áreas do rio Uruguai

(rio Chapecó, rio Ijuí, rio Passo Fundo, rio Canoas) diferiram das áreas do rio Taquari - alto e médio rio das Antas ($p < 0,05$), o rio Pelotas se diferenciou do rio Chapecó ($p = 0,03$), do rio Passo Fundo ($p = 0,04$) e do rio Canoas ($p = 1,218E-6$); placas na base da nadadeira dorsal ($p = 4,481E-8$, $f = 28,07$), onde os exemplares da bacia do rio Uruguai, de forma geral, se diferenciaram estatisticamente dos da bacia do rio Taquari ($p < 0,05$), com exceção do rio Pelotas (bacia do rio Uruguai; $p > 0,05$); placas entre a nadadeira dorsal e a adiposa ($p = 4,248E-11$, $f = 9,4$), onde os exemplares da bacia do rio Uruguai diferem estatisticamente da bacia adjacente - Taquari (rio Ijuí x alto rio das Antas; rio Passo Fundo x alto e médio rio das Antas; rio Canoas x alto rio das Antas; $p < 0,05$), com a exceção dos espécimes do rio Pelotas; placas entre a nadadeira anal e caudal ($p = 7,818E-6$, $f = 5,13$), onde é observado o rio Passo Fundo se diferenciar de forma significativa da maioria das áreas (alto e médio rio das Antas - bacia do Taquari; rio Chapecó, rio Pelotas, médio rio Uruguai e rio Canoas - bacia do Uruguai), e ainda, o rio Pelotas mostrou maior proximidade à bacia do rio Taquari.

Os seguintes dados merísticos não mostraram diferenciação significativa ou variância entre as nove áreas analisadas: placas entre a nadadeira adiposa e a caudal ($p = 0,07$, $f = 1,83$); placas na base da nadadeira anal (ANOVA, $p > 0,05$); placas áziguas pré-adiposa (ANOVA, não há variância); número de raios ramificados na nadadeira dorsal (ANOVA, $p > 0,05$); número de raios ramificados na nadadeira peitoral (ANOVA, não há variância); número de raios ramificados na nadadeira pélvica (ANOVA, não há variância); número de raios ramificados na nadadeira anal (ANOVA, $p > 0,05$); e número de raios ramificados na nadadeira caudal (ANOVA, $p > 0,05$).

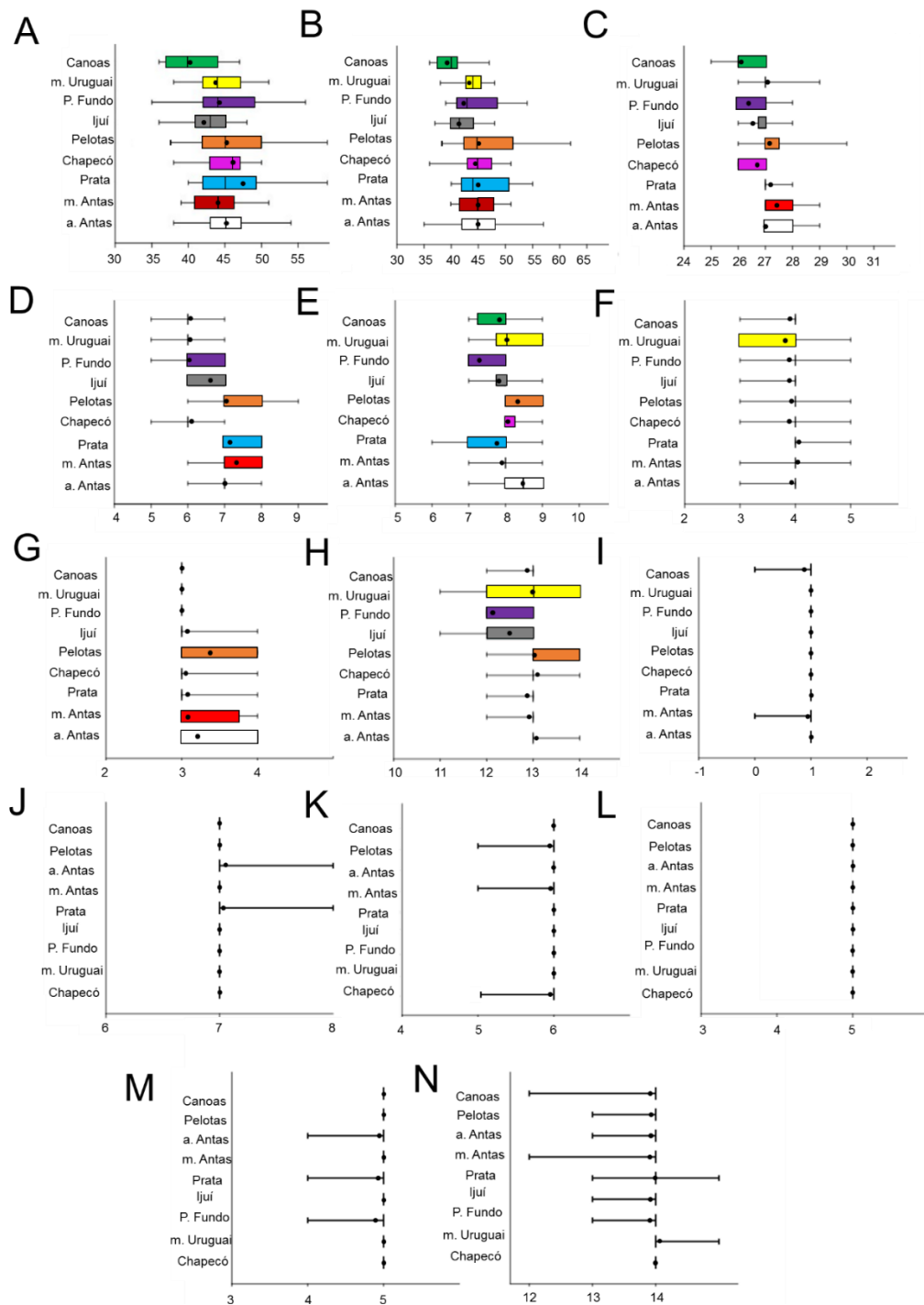


Figura 9: Variação merística entre as diferentes áreas de ocorrência de *Pareiorhaphis hystrix*. Número de dentes do pré-maxilar, lado esquerdo (A); de dentes do dentário, lado esquerdo (B); de placas na série lateral mediana (C); de placas na base da nadadeira dorsal (D); de placas entre a nadadeira dorsal e a adiposa (E); de placas entre a nadadeira adiposa e a caudal (F); de placas na base da nadadeira anal (G); de placas entre a nadadeira anal e caudal (H); de placas áziguas pré-adiposa (I); de raios ramificados na nadadeira dorsal (J); de raios ramificados na nadadeira peitoral (K); de raios ramificados na nadadeira pélvica (L); de raios ramificados na nadadeira anal (M); de raios ramificados na nadadeira caudal (N). Para cada amostra, os quartis de 25 a 75% foram desenhados usando uma caixa; a mediana é indicada com uma linha vertical dentro de cada caixa; a média é representada por um ponto; os valores mínimo e máximo são mostrados como linhas horizontais curtas.

Para os dados morfométricos, a análise de componentes principais (PCA), não diferenciou as nove áreas de forma clara a nível populacional, as quais se mostraram, no geral, sobrepostas. Contudo, é possível observar uma leve separação por bacia, com exceção do rio da Prata e do rio Pelotas, que ficaram mais próximos às bacias adjacentes (Fig. 10). O componente principal 1 (PC1) foi responsável por 28,92% da variância total, o PC2 por 20,06% e o PC3 por 7,85%.

As variáveis que mais carregaram no PC1 foram: altura do corpo na origem da nadadeira dorsal (0,4), do qual os espécimes da bacia do rio Uruguai - com exceção do rio Pelotas, mostraram comprimentos menores em relação aos demais; largura do corpo na origem da nadadeira dorsal (0,3), com exemplares do rio Chapecó apresentando as menores larguras, enquanto os do alto rio das Antas, do médio rio das Antas e do rio Pelotas as maiores; distância da nadadeira adiposa até a caudal (-0,16), onde os espécimes do rio Chapecó apresentaram as menores distâncias, enquanto os do rio Ijuí as maiores; comprimento pós-dorsal (-0,21), de modo geral, as áreas da bacia do rio Uruguai apresentaram os maiores valores.

Já as variáveis que mais carregaram para o PC2 foram: comprimento do espinho-pélvico (0,36), com o alto rio das Antas apresentando espécimes com menores tamanhos, enquanto o médio rio das Antas e o rio Pelotas os maiores; comprimento do pedúnculo caudal (0,33), sendo menor para os exemplares do médio rio das Antas e do rio Pelotas; comprimento pré-adiposa (-0,22), com o alto rio das Antas mostrando valores maiores, apesar da pequena diferença quanto às demais áreas; e comprimento pré-anal (-0,3), com espécimes do médio rio das Antas com os menores e maiores comprimentos. Apesar das variações destacadas as diferenças foram mínimas, com médias muito próximas entre as áreas.

A análise discriminante linear (LDA) (Fig. 11) apresentou melhor diferenciação entre as áreas em relação à PCA. Na LDA a separação inter-classes é enfatizada através da substituição da matriz de covariância total do PCA por uma medida de separabilidade com o critério Fisher, o que muitas vezes apresenta melhores resultados. A separação percentual alcançada por cada função discriminante foi de 51,83 % para LDA1, 20,17 % para LDA2, 10,28 % para LDA3 e 6,50 % para LDA4.

As cargas para cada função discriminante LDA1 sugerem que as medidas mais significativas foram: o comprimento do pedúnculo caudal (0,22), do qual os espécimes das áreas do médio rio das Antas, médio rio Uruguai, rio Ijuí e do rio Canoas apresentaram maior comprimento, com o médio rio das Antas também agrupando os menores comprimentos, juntamente ao rio Pelotas; comprimento pós-dorsal (0,19), destacado anteriormente pela PCA; altura da cabeça (-0,32), com os espécimes da bacia do Taquari - especificamente do médio e alto rio das Antas, e do rio Pelotas (bacia do Uruguai) com as maiores alturas; a altura do corpo na origem da nadadeira dorsal (-0,5), destacado anteriormente pela PCA.

Já para LDA2 as seguintes medidas foram as mais significativas: comprimento do espinho da nadadeira-anal (0,26), com espécimes do alto rio das Antas, médio rio das Antas e do rio Pelotas apresentando os maiores comprimentos, já os do rio Ijuí, apresentaram os menores; comprimento pré-adiposa (0,22), com exemplares do alto rio das Antas apresentando maior comprimento, apesar da mínima variação entre as áreas; largura do corpo na origem da nadadeira dorsal (-0,19), destacado anteriormente pela PCA; comprimento do espinho da nadadeira adiposa (-0,26), com o maior comprimento para os espécimes do rio da Prata, apesar da média entre as áreas serem muito próximas. De forma geral, as variações observadas entre as áreas pela LDA foram mínimas, com médias muito próximas.

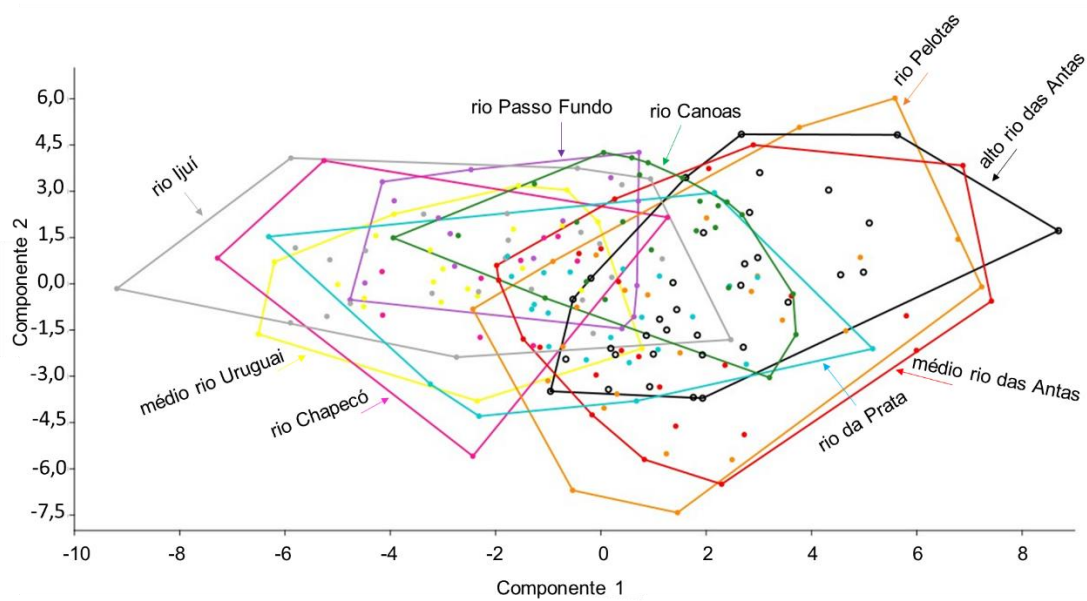


Figura 10: Análise de componentes principais (PCA), PC1 x PC2. Cada cor representa uma área estudada da bacia do rio Taquari e do rio Uruguai.

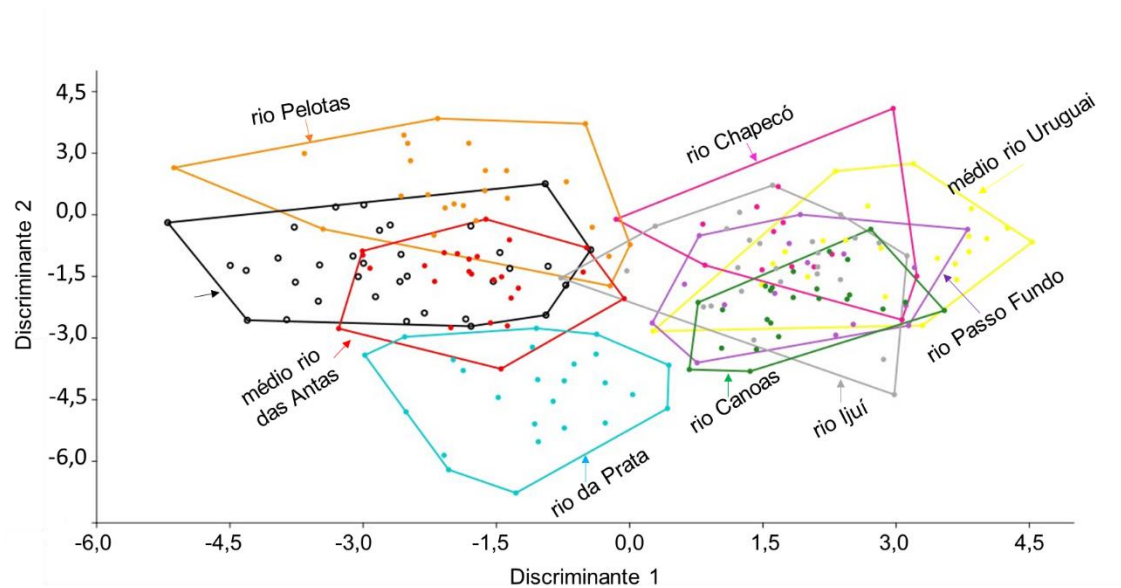


Figura 11: Análise discriminante, LDA1 x LDA2. Cada cor representa uma área estudada da bacia do rio Taquari e do rio Uruguai.

Tabela 3: Dados morfométricos e merísticos de exemplares de *Pareiorhaphis hystrix*, do alto rio das Antas. N = número de exemplares analisados; DP = desvio padrão.

	N	Menor	Maior	Média	DP
Comprimento padrão (mm)	34	65,43	99,94	80,90	8,84
Porcentagem do comprimento padrão					
Comprimento da cabeça	34	29,9	34,1	32,3	0,9
Comprimento do tronco	34	14,0	18,8	16,2	1,1
Comprimento abdominal	34	23,3	28,7	26,1	1,1
Comprimento pré-dorsal	34	42,6	46,2	44,0	0,8
Comprimento do espinho da nadadeira-dorsal	34	19,9	27,3	22,6	1,4
Altura do corpo na origem da nadadeira dorsal	34	17,4	22,2	19,6	1,2
Largura do corpo na origem da nadadeira dorsal	34	22,4	28,0	24,3	1,1
Comprimento pós-dorsal	34	38,6	45,0	41,3	1,5
Comprimento pré-adiposa	34	78,4	84,1	81,0	1,2
Comprimento do espinho da nadadeira-adiposa	34	7,9	11,2	9,4	0,8
Distância da nadadeira adiposa até a caudal	34	16,2	21,3	18,9	1,1
Comprimento pré-anal	34	62,1	66,9	63,8	1,3
Comprimento do espinho da nadadeira-anal	34	14,0	19,8	16,6	1,5
Comprimento do espinho da nadadeira-peitoral	34	20,1	27,9	25,2	1,6
Comprimento do espinho-pélvico	34	19,9	27,8	23,6	2,0
Largura cleitral	34	28,1	32,3	30,5	1,0
Comprimento do raio da nadadeira caudal superior	34	20,5	27,3	24,2	1,6
Comprimento do raio da nadadeira caudal inferior	34	21,8	30,1	26,8	1,6
Largura do corpo na origem da nadadeira anal	34	11,8	16,7	14,8	1,2
Comprimento do pedúnculo caudal	34	33,2	37,9	35,3	1,3
Altura do pedúnculo caudal	34	8,4	10,2	9,1	0,4
Largura do pedúnculo caudal	34	4,4	6,9	6,0	0,7
Porcentagem do comprimento da cabeça					
Comprimento do focinho	34	56,0	68,3	62,0	2,6
Diâmetro orbital	34	10,9	14,8	12,7	1,0
Largura interorbital	34	32,4	39,6	35,1	1,5
Altura da cabeça	34	45,2	57,1	51,3	2,3
Contagens					
Dentes do pré-maxilar	34	38	54	45,4	3,7
Dentes do dentário	34	35	57	45,1	4,3
Placas da série lateral mediana	34	27	29	27,4	0,5
Placas na base da nadadeira-dorsal	34	6	8	7,1	0,4
Placas entre a nadadeira dorsal e a adiposa	34	7	9	8,5	0,6
Placas entre a nadadeira adiposa e caudal	34	3	4	3,8	0,4
Placas na base da nadadeira-anal	34	3	4	3,3	0,5
Placas entre a nadadeira anal e caudal	34	13	14	13,1	0,4
Placas áziguas pré-adiposas	34	1	1	1,0	0,0
Número de raios ramificados					
Da nadadeira dorsal	34	7	8	7,1	0,3
Da nadadeira peitoral	34	6	6	6,0	0,0
Da nadadeira pélvica	34	5	5	5,0	0,0
Da nadadeira anal	34	4	5	5,0	0,2
Da nadadeira caudal	34	13	14	14,0	0,2

Tabela 4: Dados morfométricos (%) e merísticos de exemplares de *Pareiorhaphis hystrix*, do médio rio das Antas. N = número de exemplares analisados; DP = desvio padrão.

	N	Menor	Maior	Média	DP
Comprimento padrão (mm)	25	70,08	103,5	80,15	8,46
Porcentagem do comprimento padrão					
Comprimento da cabeça	25	30,7	35,4	32,3	1,3
Comprimento do tronco	25	14,5	18,7	16,4	1,0
Comprimento abdominal	25	23,6	28,2	26,1	1,4
Comprimento pré-dorsal	25	42,1	46,5	44,2	1,2
Comprimento do espinho da nadadeira-dorsal	25	19,4	24,9	21,7	1,1
Altura do corpo na origem da nadadeira dorsal	25	15,1	22,7	19,0	1,6
Largura do corpo na origem da nadadeira dorsal	25	22,5	29,0	24,9	1,4
Comprimento pós-dorsal	25	36,5	44,3	41,1	2,1
Comprimento pré-adiposa	25	77,7	83,0	81,0	1,2
Comprimento do espinho da nadadeira-adiposa	25	7,4	11,3	9,1	0,9
Distância da nadadeira adiposa até a caudal	25	16,8	21,5	19,0	1,1
Comprimento pré-anal	25	60,7	67,1	64,4	1,9
Comprimento do espinho da nadadeira-anal	25	13,3	20,5	15,8	1,5
Comprimento do espinho da nadadeira-peitoral	25	22,8	28,7	25,2	1,4
Comprimento do espinho-pélvico	25	21,5	28,5	23,8	1,9
Largura cleitral	25	27,7	34,7	30,5	1,4
Comprimento do raio da nadadeira caudal superior	25	20,5	27,0	23,4	1,7
Comprimento do raio da nadadeira caudal inferior	25	23,0	31,0	26,1	1,9
Largura do corpo na origem da nadadeira anal	25	12,9	16,8	14,7	1,0
Comprimento do pedúnculo caudal	25	31,8	39,0	35,0	1,8
Altura do pedúnculo caudal	25	8,6	10,0	9,0	0,3
Largura do pedúnculo caudal	25	4,4	7,2	5,7	0,7
Porcentagem do comprimento da cabeça					
Comprimento do focinho	25	56,4	67,4	62,0	2,3
Diâmetro orbital	25	8,8	14,7	12,5	1,2
Largura interorbital	25	30,6	39,1	35,3	2,2
Altura da cabeça	25	47,8	61,6	51,1	2,9
Contagens					
Dentes do pré-maxilar	25	39	51	44,4	3,0
Dentes do dentário	25	41	51	45,3	3,2
Placas da série lateral mediana	25	27	29	27,3	0,6
Placas na base da nadadeira-dorsal	25	6	8	7,5	0,6
Placas entre a nadadeira dorsal e a adiposa	25	7	9	8,0	0,5
Placas entre a nadadeira adiposa e caudal	25	3	5	4,1	0,4
Placas na base da nadadeira-anal	25	3	4	3,2	0,4
Placas entre a nadadeira anal e caudal	25	12	13	12,9	0,3
Placas áziguas pré-adiposas	25	0	1	1,0	0,2
Número de raios ramificados					
Da nadadeira dorsal	25	7	7	7,0	0,0
Da nadadeira peitoral	25	5	6	6,0	0,2
Da nadadeira pélvica	25	5	5	5,0	0,0
Da nadadeira anal	25	5	5	5,0	0,0
Da nadadeira caudal	25	12	14	13,9	0,4

Tabela 5: Dados morfométricos (%) e merísticos de exemplares de *Pareiorhaphis hystrix*, do rio da Prata. N = número de exemplares analisados; DP = desvio padrão.

	N	Menor	Maior	Média	DP
Comprimento padrão (mm)	25	66,47	99,25	80,18	9,84
Porcentagem do comprimento padrão					
Comprimento da cabeça	25	30,1	35,7	32,5	1,4
Comprimento do tronco	25	14,0	17,3	15,8	0,9
Comprimento abdominal	25	24,9	29,3	26,5	1,1
Comprimento pré-dorsal	25	41,0	45,3	43,3	0,9
Comprimento do espinho da nadadeira-dorsal	25	19,2	25,1	21,6	1,4
Altura do corpo na origem da nadadeira dorsal	25	16,0	20,8	18,3	1,1
Largura do corpo na origem da nadadeira dorsal	25	22,7	27,3	24,5	1,1
Comprimento pós-dorsal	25	38,8	44,8	41,0	1,4
Comprimento pré-adiposa	25	77,3	81,7	79,7	1,2
Comprimento do espinho da nadadeira-adiposa	25	8,3	16,4	10,0	1,5
Distância da nadadeira adiposa até a caudal	25	17,3	21,3	19,2	1,1
Comprimento pré-anal	25	60,3	66,0	63,1	1,5
Comprimento do espinho da nadadeira-anal	25	12,8	17,3	14,6	1,2
Comprimento do espinho da nadadeira-peitoral	25	19,9	26,7	24,0	1,5
Comprimento do espinho-pélvico	25	21,6	26,5	23,5	1,4
Largura cleitral	25	29,0	32,8	30,9	1,0
Comprimento do raio da nadadeira caudal superior	25	20,4	25,3	22,9	1,3
Comprimento do raio da nadadeira caudal inferior	25	22,3	29,9	26,2	1,8
Largura do corpo na origem da nadadeira anal	25	12,6	15,9	14,5	0,8
Comprimento do pedúnculo caudal	25	33,5	38,0	35,6	1,1
Altura do pedúnculo caudal	25	8,2	10,5	9,1	0,5
Largura do pedúnculo caudal	25	4,4	6,6	5,4	0,5
Porcentagem do comprimento da cabeça					
Comprimento do focinho	25	58,3	65,7	62,2	1,8
Diâmetro orbital	25	10,0	13,8	12,4	1,0
Largura interorbital	25	31,1	38,3	35,2	1,9
Altura da cabeça	25	45,7	55,0	49,0	2,4
Contagens					
Dentes do pré-maxilar	25	40	59	45,7	4,9
Dentes do dentário	25	40	55	46,0	4,8
Placas da série lateral mediana	25	27	28	27,2	0,4
Placas na base da nadadeira-dorsal	25	7	8	7,4	0,5
Placas entre a nadadeira dorsal e a adiposa	25	6	9	7,7	0,6
Placas entre a nadadeira adiposa e caudal	25	4	5	4,0	0,2
Placas na base da nadadeira-anal	25	3	4	3,0	0,2
Placas entre a nadadeira anal e caudal	25	12	13	12,8	0,4
Placas áziguas pré-adiposas	25	1	1	1,0	0,0
Número de raios ramificados					
Da nadadeira dorsal	25	7	8	7,0	0,2
Da nadadeira peitoral	25	6	6	6,0	0,0
Da nadadeira pélvica	25	5	5	5,0	0,0
Da nadadeira anal	25	4	5	5,0	0,2
Da nadadeira caudal	25	13	15	14,0	0,3

Tabela 6: Dados morfométricos (%) e merísticos de exemplares de *Pareiorhaphis hystrix*, do rio Chapecó. N = número de exemplares analisados; DP = desvio padrão.

	N	Menor	Maior	Média	DP
Comprimento padrão (mm)	14	60,48	92,63	76,78	12,28
Porcentagem do comprimento padrão					
Comprimento da cabeça	14	30,5	34,3	32,2	1,3
Comprimento do tronco	14	13,0	16,7	15,4	1,1
Comprimento abdominal	14	23,9	28,4	25,7	1,2
Comprimento pré-dorsal	14	40,0	45,2	43,4	1,7
Comprimento do espinho da nadadeira-dorsal	14	19,4	23,7	21,8	1,3
Altura do corpo na origem da nadadeira dorsal	14	14,5	18,3	16,4	1,0
Largura do corpo na origem da nadadeira dorsal	14	20,1	23,9	22,2	1,2
Comprimento pós-dorsal	14	39,8	44,9	42,4	1,4
Comprimento pré-adiposa	14	77,3	83,5	80,3	1,8
Comprimento do espinho da nadadeira-adiposa	14	7,4	9,3	8,3	0,6
Distância da nadadeira adiposa até a caudal	14	15,6	21,7	19,5	1,8
Comprimento pré-anal	14	61,1	66,6	63,6	1,6
Comprimento do espinho da nadadeira-anal	14	13,1	17,2	15,0	1,2
Comprimento do espinho da nadadeira-peitoral	14	21,4	26,0	23,8	1,1
Comprimento do espinho-pélvico	14	21,7	26,2	24,0	1,4
Largura cleitral	14	27,4	31,8	29,7	1,3
Comprimento do raio da nadadeira caudal superior	14	21,8	25,4	23,3	1,3
Comprimento do raio da nadadeira caudal inferior	14	22,7	28,7	26,0	1,9
Largura do corpo na origem da nadadeira anal	14	10,6	13,2	12,2	0,8
Comprimento do pedúnculo caudal	14	33,8	38,7	36,1	1,4
Altura do pedúnculo caudal	14	6,9	8,8	7,9	0,6
Largura do pedúnculo caudal	14	4,0	5,9	5,0	0,5
Porcentagem do comprimento da cabeça					
Comprimento do focinho	14	56,9	65,1	62,4	1,9
Diâmetro orbital	14	9,7	14,9	12,5	1,3
Largura interorbital	14	30,5	35,3	33,3	1,5
Altura da cabeça	14	42,8	51,4	46,2	2,4
Contagens					
Dentes do pré-maxilar	14	38	52	45,4	4,0
Dentes do dentário	14	36	51	44,9	4,0
Placas da série lateral mediana	14	26	27	26,7	0,5
Placas na base da nadadeira-dorsal	14	5	7	6,2	0,6
Placas entre a nadadeira dorsal e a adiposa	14	8	9	8,3	0,5
Placas entre a nadadeira adiposa e caudal	14	3	5	3,9	0,5
Placas na base da nadadeira-anal	14	3	4	3,1	0,3
Placas entre a nadadeira anal e caudal	14	12	14	13,1	0,5
Placas áziguas pré-adiposas	14	1	1	1,0	0,0
Número de raios ramificados					
Da nadadeira dorsal	14	7	7	7,0	0,0
Da nadadeira peitoral	14	5	6	5,9	0,3
Da nadadeira pélvica	14	5	5	5,0	0,0
Da nadadeira anal	14	5	5	5,0	0,0
Da nadadeira caudal	14	14	14	14,0	0,0

Tabela 7: Dados morfométricos (%) e merísticos de exemplares de *Pareiorhaphis hystrix*, do rio Pelotas. N = número de exemplares analisados; DP = desvio padrão.

	N	Menor	Maior	Média	DP
Comprimento padrão (mm)	25	70,00	98,22	80,16	8,78
Porcentagem do comprimento padrão					
Comprimento da cabeça	25	30,6	35,4	32,6	1,1
Comprimento do tronco	25	14,7	18,4	16,2	1,0
Comprimento abdominal	25	23,5	28,5	26,3	1,3
Comprimento pré-dorsal	25	43,0	47,0	44,9	1,2
Comprimento do espinho da nadadeira-dorsal	25	19,4	25,5	22,7	1,4
Altura do corpo na origem da nadadeira dorsal	25	17,0	22,3	19,1	1,5
Largura do corpo na origem da nadadeira dorsal	25	21,9	28,5	24,2	1,8
Comprimento pós-dorsal	25	36,7	46,6	40,6	2,1
Comprimento pré-adiposa	25	77,5	83,7	80,9	1,5
Comprimento do espinho da nadadeira-adiposa	25	6,6	9,9	8,3	0,8
Distância da nadadeira adiposa até a caudal	25	16,0	21,5	18,5	1,2
Comprimento pré-anal	25	60,3	66,6	63,9	1,5
Comprimento do espinho da nadadeira-anal	25	12,2	20,5	16,6	1,9
Comprimento do espinho da nadadeira-peitoral	25	21,5	28,0	24,7	1,5
Comprimento do espinho-pélvico	25	20,4	28,5	23,7	2,1
Largura cleitral	25	28,3	32,6	30,7	1,1
Comprimento do raio da nadadeira caudal superior	25	20,1	26,6	23,1	1,7
Comprimento do raio da nadadeira caudal inferior	25	22,4	29,5	26,2	2,0
Largura do corpo na origem da nadadeira anal	25	11,8	15,7	13,8	0,9
Comprimento do pedúnculo caudal	25	31,9	38,0	35,0	1,6
Altura do pedúnculo caudal	25	7,4	9,6	8,7	0,7
Largura do pedúnculo caudal	25	4,4	8,5	6,0	0,9
Porcentagem do comprimento da cabeça					
Comprimento do focinho	25	59,2	65,7	62,3	1,6
Diâmetro orbital	25	10,5	15,5	12,6	1,2
Largura interorbital	25	32,2	36,6	34,4	1,2
Altura da cabeça	25	46,4	61,1	52,1	3,2
Contagens					
Dentes do pré-maxilar	25	33	59	45,7	6,0
Dentes do dentário	25	35	62	46,4	5,7
Placas da série lateral mediana	25	26	30	27,3	0,7
Placas na base da nadadeira-dorsal	25	6	9	7,2	0,6
Placas entre a nadadeira dorsal e a adiposa	25	8	9	8,5	0,5
Placas entre a nadadeira adiposa e caudal	25	3	5	4,0	0,5
Placas na base da nadadeira-anal	25	3	4	3,4	0,5
Placas entre a nadadeira anal e caudal	25	12	14	13,2	0,6
Placas áziguas pré-adiposas	25	1	1	1,0	0,0
Número de raios ramificados					
Da nadadeira dorsal	25	7	7	7,0	0,0
Da nadadeira peitoral	25	5	6	6,0	0,2
Da nadadeira pélvica	25	5	5	5,0	0,0
Da nadadeira anal	25	5	5	5,0	0,0
Da nadadeira caudal	25	13	14	14,0	0,2

Tabela 8: Dados morfométricos (%) e merísticos de exemplares de *Pareiorhaphis hystrix*, do rio Ijuí. N= número de exemplares analisados; DP = desvio padrão.

	N	Menor	Maior	Média	DP
Comprimento padrão (mm)	26	75,30	109,38	85,34	9,17
Porcentagem do comprimento padrão					
Comprimento da cabeça	26	28,9	33,5	31,8	1,3
Comprimento do tronco	26	12,3	17,1	15,6	1,0
Comprimento abdominal	26	23,8	28,3	25,6	1,2
Comprimento pré-dorsal	26	40,1	44,9	42,9	1,5
Comprimento do espinho da nadadeira-dorsal	26	20,0	23,7	21,7	1,1
Altura do corpo na origem da nadadeira dorsal	26	13,7	18,6	16,4	1,1
Largura do corpo na origem da nadadeira dorsal	26	20,6	25,7	22,7	1,2
Comprimento pós-dorsal	26	39,3	45,3	42,3	1,5
Comprimento pré-adiposa	26	77,4	82,1	79,8	1,2
Comprimento do espinho da nadadeira-adiposa	26	7,5	10,2	8,9	0,8
Distância da nadadeira adiposa até a caudal	26	17,4	23,1	20,1	1,5
Comprimento pré-anal	26	60,6	66,1	63,0	1,4
Comprimento do espinho da nadadeira-anal	26	11,9	17,4	15,3	1,4
Comprimento do espinho da nadadeira-peitoral	26	22,0	28,0	25,3	1,5
Comprimento do espinho-pélvico	26	21,2	27,1	24,1	1,3
Largura cleitral	26	26,7	31,8	29,5	1,3
Comprimento do raio da nadadeira caudal superior	26	20,6	24,9	22,6	1,1
Comprimento do raio da nadadeira caudal inferior	26	22,3	27,9	25,6	1,4
Largura do corpo na origem da nadadeira anal	26	11,8	15,4	13,6	0,9
Comprimento do pedúnculo caudal	26	34,0	39,8	36,6	1,3
Altura do pedúnculo caudal	26	6,8	9,1	8,0	0,4
Largura do pedúnculo caudal	26	4,6	6,2	5,2	0,4
Porcentagem do comprimento da cabeça					
Comprimento do focinho	26	61,0	65,6	63,4	1,3
Diâmetro orbital	26	9,3	14,6	12,7	1,3
Largura interorbital	26	30,2	36,9	33,9	1,5
Altura da cabeça	26	43,2	50,1	46,8	1,7
Contagens					
Dentes do pré-maxilar	26	37	48	42,7	3,0
Dentes do dentário	26	37	48	41,9	2,7
Placas da série lateral mediana	26	26	28	26,8	0,5
Placas na base da nadadeira-dorsal	26	6	7	6,6	0,5
Placas entre a nadadeira dorsal e a adiposa	26	7	9	7,8	0,5
Placas entre a nadadeira adiposa e caudal	26	3	4	3,9	0,3
Placas na base da nadadeira-anal	26	3	4	3,1	0,3
Placas entre a nadadeira anal e caudal	26	11	13	12,6	0,6
Placas áziguas pré-adiposas	26	1	1	1	0,0
Número de raios ramificados					
Da nadadeira dorsal	26	7	7	7,0	0
Da nadadeira peitoral	26	6	6	6,0	0
Da nadadeira pélvica	26	5	5	5,0	0
Da nadadeira anal	26	5	5	5,0	0
Da nadadeira caudal	26	13	14	14,0	0,2

Tabela 9: Dados morfométricos (%) e merísticos de exemplares de *Pareiorhaphis hystrix*, do rio Passo Fundo. N= número de exemplares analisados; DP = desvio padrão.

	N	Menor	Maior	Média	DP
Comprimento padrão (mm)	16	61,82	84,82	72,16	7,78
Porcentagem do comprimento padrão					
Comprimento da cabeça	16	29,7	33,6	32,4	1,0
Comprimento do tronco	16	14,9	17,2	15,9	0,7
Comprimento abdominal	16	23,2	27,7	25,6	1,2
Comprimento pré-dorsal	16	40,3	44,7	43,0	1,1
Comprimento do espinho da nadadeira-dorsal	16	19,4	25,7	22,8	1,7
Altura do corpo na origem da nadadeira dorsal	16	14,1	19,7	16,8	1,5
Largura do corpo na origem da nadadeira dorsal	16	19,6	27,0	22,7	1,9
Comprimento pós-dorsal	16	39,8	44,6	42,7	1,2
Comprimento pré-adiposa	16	77,1	81,2	78,8	1,3
Comprimento do espinho da nadadeira-adiposa	16	7,6	9,6	8,4	0,6
Distância da nadadeira adiposa até a caudal	16	18,6	22,6	20,8	1,0
Comprimento pré-anal	16	60,3	65,5	62,5	1,5
Comprimento do espinho da nadadeira-anal	16	13,8	17,5	15,7	1,1
Comprimento do espinho da nadadeira-peitoral	16	23,0	27,1	24,7	1,3
Comprimento do espinho-pélvico	16	23,0	27,1	24,5	1,1
Largura cleitral	16	27,9	31,9	29,8	1,2
Comprimento do raio da nadadeira caudal superior	16	21,0	26,9	23,1	1,7
Comprimento do raio da nadadeira caudal inferior	16	22,6	29,9	26,5	2,0
Largura do corpo na origem da nadadeira anal	16	10,4	17,5	13,5	1,5
Comprimento do pedúnculo caudal	16	34,0	38,6	36,1	1,4
Altura do pedúnculo caudal	16	7,7	9,0	8,5	0,4
Largura do pedúnculo caudal	17	4,3	6,1	5,5	0,5
Porcentagem do comprimento da cabeça					
Comprimento do focinho	16	62,6	66,8	64,3	1,2
Diâmetro orbital	16	9,4	13,8	11,7	1,4
Largura interorbital	16	31,5	36,8	34,2	1,3
Altura da cabeça	16	43,2	51,1	46,8	2,3
Contagens					
Dentes do pré-maxilar	16	35	56	45,1	5,5
Dentes do dentário	16	39	54	44,6	4,8
Placas da série lateral mediana	16	26	28	26,7	0,6
Placas na base da nadadeira-dorsal	16	5	7	6,2	0,5
Placas entre a nadadeira dorsal e a adiposa	16	7	8	7,4	0,5
Placas entre a nadadeira adiposa e caudal	16	3	5	3,9	0,6
Placas na base da nadadeira-anal	16	3	3	3,0	0,0
Placas entre a nadadeira anal e caudal	16	12	13	12,3	0,5
Placas áziguas pré-adiposas	16	1	1	1,0	0
Número de raios ramificados					
Da nadadeira dorsal	16	7	7	7,0	0
Da nadadeira peitoral	16	6	6	6,0	0
Da nadadeira pélvica	16	5	5	5,0	0
Da nadadeira anal	16	4	5	4,9	0,2
Da nadadeira caudal	16	13	14	13,9	0,2

Tabela 10: Dados morfométricos (%) e merísticos de exemplares de *Pareiorhaphis hystrix*, do médio rio Uruguai. N= número de exemplares analisados; DP = desvio padrão.

	N	Menor	Maior	Média	DP
Comprimento padrão (mm)	22	70,00	95,90	81,19	8,05
Porcentagem do comprimento padrão					
Comprimento da cabeça	22	29,8	34,3	31,8	1,1
Comprimento do tronco	22	14,0	16,7	15,3	0,8
Comprimento abdominal	22	24,0	27,3	25,6	0,8
Comprimento pré-dorsal	22	41,8	45,7	43,1	1,0
Comprimento do espinho da nadadeira-dorsal	22	19,6	23,2	21,3	0,9
Altura do corpo na origem da nadadeira dorsal	22	13,6	19,2	16,1	1,4
Largura do corpo na origem da nadadeira dorsal	22	19,7	25,6	22,5	1,3
Comprimento pós-dorsal	22	39,1	46,7	42,0	1,5
Comprimento pré-adiposa	22	77,2	83,6	80,5	1,4
Comprimento do espinho da nadadeira-adiposa	22	7,8	11,1	8,9	0,7
Distância da nadadeira adiposa até a caudal	22	17,3	22,5	19,6	1,3
Comprimento pré-anal	22	60,5	65,2	62,9	1,1
Comprimento do espinho da nadadeira-anal	22	13,0	17,6	14,9	1,1
Comprimento do espinho da nadadeira-peitoral	22	22,8	27,4	24,7	1,3
Comprimento do espinho-pélvico	22	22,2	26,1	24,1	1,0
Largura cleitral	22	26,8	30,8	28,4	1,1
Comprimento do raio da nadadeira caudal superior	22	19,6	25,5	22,7	1,5
Comprimento do raio da nadadeira caudal inferior	22	23,9	29,0	25,9	1,6
Largura do corpo na origem da nadadeira anal	22	12,5	15,5	13,9	0,8
Comprimento do pedúnculo caudal	22	32,9	39,7	36,8	1,4
Altura do pedúnculo caudal	22	6,8	8,3	7,5	0,4
Largura do pedúnculo caudal	23	4,3	6,1	5,0	0,5
Porcentagem do comprimento da cabeça					
Comprimento do focinho	22	58,5	68,0	64,6	2,1
Diâmetro orbital	22	10,2	13,8	11,7	0,8
Largura interorbital	22	31,1	37,0	33,9	1,5
Altura da cabeça	22	41,5	49,8	45,8	2,5
Contagens					
Dentes do pré-maxilar	22	38	51	44,0	3,6
Dentes do dentário	22	38	48	43,9	2,7
Placas da série lateral mediana	22	26	29	27,1	0,6
Placas na base da nadadeira-dorsal	22	5	7	6,2	0,5
Placas entre a nadadeira dorsal e a adiposa	22	7	9	8,0	0,7
Placas entre a nadadeira adiposa e caudal	22	3	5	3,7	0,5
Placas na base da nadadeira-anal	22	3	3	3,0	0,0
Placas entre a nadadeira anal e caudal	22	11	14	12,9	1,0
Placas áziguas pré-adiposas	22	1	1	1,0	0,0
Número de raios ramificados					
Da nadadeira dorsal	22	7	7	7,0	0,0
Da nadadeira peitoral	22	6	6	6,0	0,0
Da nadadeira pélvica	22	5	5	5,0	0,0
Da nadadeira anal	22	5	5	5,0	0,0
Da nadadeira caudal	22	14	15	14,0	0,2

Tabela 11: Dados morfométricos (%) e merísticos de exemplares de *Pareiorhaphis hystrix*, do rio Canoas. N = número de exemplares analisados; DP = desvio padrão.

	N	Menor	Maior	Média	DP
Comprimento padrão (mm)	24	72,12	114,70	89,63	11,60
Porcentagem do comprimento padrão					
Comprimento da cabeça	24	30,6	33,9	32,3	0,9
Comprimento do tronco	24	14,5	17,1	15,6	0,7
Comprimento abdominal	24	24,1	27,9	26,2	1,0
Comprimento pré-dorsal	24	41,2	45,0	43,3	0,9
Comprimento do espinho da nadadeira-dorsal	24	21,3	24,4	22,8	0,9
Altura do corpo na origem da nadadeira dorsal	24	14,6	20,2	17,5	1,3
Largura do corpo na origem da nadadeira dorsal	24	22,1	27,3	24,7	1,3
Comprimento pós-dorsal	24	36,9	44,9	41,8	1,6
Comprimento pré-adiposa	24	77,8	81,8	79,6	1,0
Comprimento do espinho da nadadeira-adiposa	24	7,1	11,1	9,0	0,9
Distância da nadadeira adiposa até a caudal	24	16,9	21,3	19,5	0,9
Comprimento pré-anal	24	59,9	65,2	62,7	1,4
Comprimento do espinho da nadadeira-anal	24	13,4	16,9	15,4	1,0
Comprimento do espinho da nadadeira-peitoral	24	23,0	27,5	26,1	1,2
Comprimento do espinho-pélvico	24	23,3	26,7	25,2	1,0
Largura cleitral	24	27,8	32,5	30,8	1,1
Comprimento do raio da nadadeira caudal superior	24	22,4	25,9	24,1	0,9
Comprimento do raio da nadadeira caudal inferior	24	22,0	29,7	27,7	1,6
Largura do corpo na origem da nadadeira anal	24	12,9	15,4	14,2	0,6
Comprimento do pedúnculo caudal	24	33,4	39,1	36,2	1,3
Altura do pedúnculo caudal	24	7,4	8,5	7,9	0,3
Largura do pedúnculo caudal	24	4,8	6,2	5,5	0,4
Porcentagem do comprimento da cabeça					
Comprimento do focinho	24	60,5	67,6	64,2	1,6
Diâmetro orbital	24	10,4	14,2	12,4	0,9
Largura interorbital	24	31,5	36,3	34,3	1,4
Altura da cabeça	24	44,9	50,3	47,5	1,4
Contagens					
Dentes do pré-maxilar	24	36	47	40,6	3,4
Dentes do dentário	24	36	47	39,9	2,7
Placas da série lateral mediana	24	25	27	26,3	0,6
Placas na base da nadadeira-dorsal	24	5	7	6,2	0,5
Placas entre a nadadeira dorsal e a adiposa	24	7	9	7,8	0,5
Placas entre a nadadeira adiposa e caudal	24	3	4	3,8	0,4
Placas na base da nadadeira-anal	24	3	3	3,0	0,0
Placas entre a nadadeira anal e caudal	24	12	13	12,9	0,3
Placas áziguas pré-adiposas	24	0	1	0,9	0,3
Número de raios ramificados					
Da nadadeira dorsal	24	7	7	7,0	0
Da nadadeira peitoral	24	6	6	6,0	0
Da nadadeira pélvica	24	5	5	5,0	0
Da nadadeira anal	24	5	5	5,0	0
Da nadadeira caudal	24	12	14	13,9	0,4

3.2 Análise Molecular

3.2.1 Alinhamento e diversidade genética

Um alinhamento de 2.518 pares de bases (pb) foi obtido para os genes mitocondriais *col* (447 pb), *cytb* (843 pb), 16S (453 pb) e 12S (775 pb), sendo a composição nucleotídica a seguinte: Citosina (C): 28,45%; Timina (T): 25,09%; Adenina (A): 26,89% e Guanina (G): 19,55%. De forma geral, observa-se uma maior diversidade de haplótipos (hd) em comparação à diversidade de nucleotídeos (π), para os quatro genes mitocondriais (Tab. 12).

Tabela 12: Número amostral de espécimes de *Pareiorhaphis hystrix* utilizados na análise (N), número de sítios polimórficos (s), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (hd) e diversidade nucleotídica (π), considerando cada gene individualmente: *col*, *cytb*, 16S e 12S. Rosa: áreas da bacia do rio Taquari; azul: áreas da bacia do rio Uruguai. Exemplos com muitos dados faltantes não foram considerados na análise.

<i>col</i>					
Áreas	N	s	h	hd	π
alto rio das Antas	7	3	2	0,28 +/- 0,19	0,04 +/- 0,04
médio rio das Antas	3	0	1	0,00 +/- 0,00	0,00 +/- 0,00
rio da Prata	2	5	2	1,00 +/- 0,50	0,26 +/- 0,28
rio Chapecó	4	3	3	0,83 +/- 0,22	0,07 +/- 0,07
rio Pelotas	3	0	1	0,00 +/- 0,00	0,00 +/- 0,00
rio Ijuí	3	2	2	0,66 +/- 0,31	0,07 +/- 0,07
rio Passo Fundo	3	0	1	0,00 +/- 0,00	0,00 +/- 0,00
médio rio Uruguai	3	3	2	0,66 +/- 0,31	0,10 +/- 0,09
rio Canoas	4	3	2	0,50 +/- 0,26	0,07 +/- 0,07
<i>cytb</i>					
alto rio das Antas	7	7	4	0,80 +/- 0,12	0,04 +/- 0,03
médio rio das Antas	4	2	3	0,83 +/- 0,22	0,04 +/- 0,04
rio da Prata	4	8	3	0,83 +/- 0,22	0,13 +/- 0,10
rio Chapecó	5	7	4	0,90 +/- 0,16	0,09 +/- 0,07
rio Pelotas	4	7	3	0,83 +/- 0,22	0,13 +/- 0,09
rio Ijuí	2	0	1	0,00 +/- 0,00	0,00 +/- 0,00
rio Passo Fundo	3	0	1	0,00 +/- 0,00	0,00 +/- 0,00
médio rio Uruguai	4	9	3	0,83 +/- 0,22	0,16 +/- 0,12
rio Canoas	5	2	3	0,70 +/- 0,21	0,11 +/- 0,08
16S					
alto rio das Antas	7	0	1	0,00 +/- 0,00	0,00 +/- 0,00
médio rio das Antas	3	0	1	0,00 +/- 0,00	0,00 +/- 0,00
rio da Prata	4	1	2	0,50 +/- 0,26	0,07 +/- 0,08
rio Chapecó	5	2	2	0,40 +/- 0,23	0,11 +/- 0,11
rio Pelotas	5	0	1	0,00 +/- 0,00	0,00 +/- 0,00
rio Ijuí	4	0	1	0,00 +/- 0,00	0,00 +/- 0,00
rio Passo Fundo	5	2	2	0,40 +/- 0,23	0,11 +/- 0,11
médio rio Uruguai	5	1	2	0,60 +/- 0,17	0,08 +/- 0,09
rio Canoas	4	0	1	0,00 +/- 0,00	0,00 +/- 0,00
12S					
alto rio das Antas	5	4	3	0,80 +/- 0,16	0,14 +/- 0,11
médio rio das Antas	5	3	3	0,70 +/- 0,21	0,11 +/- 0,09
rio da Prata	3	2	3	1,00 +/- 0,27	0,09 +/- 0,09
rio Chapecó	5	4	4	0,90 +/- 0,16	0,11 +/- 0,09
rio Pelotas	5	1	2	0,40 +/- 0,23	0,02 +/- 0,03
rio Ijuí	2	0	1	0,00 +/- 0,00	0,00 +/- 0,00
rio Passo Fundo	3	0	1	0,00 +/- 0,00	0,00 +/- 0,00
rio médio Uruguai	4	4	2	0,50 +/- 0,26	0,14 +/- 0,11
rio Canoas	4	1	2	0,50 +/- 0,26	0,03 +/- 0,04

Para o gene *col*, as áreas que apresentaram a maior diversidade haplotípica, considerando o número amostral, foram representadas pelo rio da Prata (1,00 +/- 0,50) e o rio Chapecó (0,83 +/- 0,22), enquanto que, o médio rio das Antas, o rio Pelotas e o rio Passo Fundo os menores valores (0,00 hd). Para o *cytb*, os valores de diversidade haplotípica foram altos, principalmente para o rio Chapecó (0,90 +/- 0,16), e os menores para o rio Ijuí e o rio Passo Fundo (0,00 hd). O 16S apresentou valores medianos de diversidade, sendo o maior observado para o médio rio Uruguai (0,60 +/- 0,17) e o rio da Prata (0,50 +/- 0,26), enquanto que os menores, para o alto e médio rio das Antas, rio Pelotas, rio Ijuí e o rio Canoas (0,00 hd). E por fim, para o gene 12S, a maior diversidade de haplótipos foi a do rio da Prata (1,00 +/- 0,27) e do rio Chapecó (0,90 +/- 0,16), enquanto o rio Ijuí e o rio Passo Fundo, os menores (0,00 hd).

3.2.2 Rede de haplótipos

A rede de haplótipos concatenada (Fig. 12), considerando os quatro genes mitocondriais, apresentou 22 haplótipos e uma estrutura genética moderada por área geográfica, com haplótipos exclusivos e não compartilhados. O rio Pelotas apresentou proximidade com espécimes da bacia do rio Taquari, já o rio Passo Fundo e o rio Chapecó apresentaram maior distância das demais áreas (com mais de dez passos mutacionais). Duas espécies do grupo externo, *P. stendachneri* e *P. azygolechis*, apresentaram um número considerável de mutações separando-as do grupo interno (45 passos mutacionais). *Pareiorhaphis vestigipinnis*, por sua vez, apresentou diferenciação um pouco menor quanto aos espécimes de *P. hystrix*, com um pouco mais de dez passos mutacionais.

A observação individual de cada rede de haplótipos possibilitou analisar o quanto cada gene mitocondrial contribuiu para a rede concatenada desenvolvida. De forma geral, é observado o compartilhamento de haplótipos entre as diferentes áreas, apesar de também portarem haplótipos exclusivos. Há uma baixa diferenciação entre as populações, com poucas mutações separando-as.

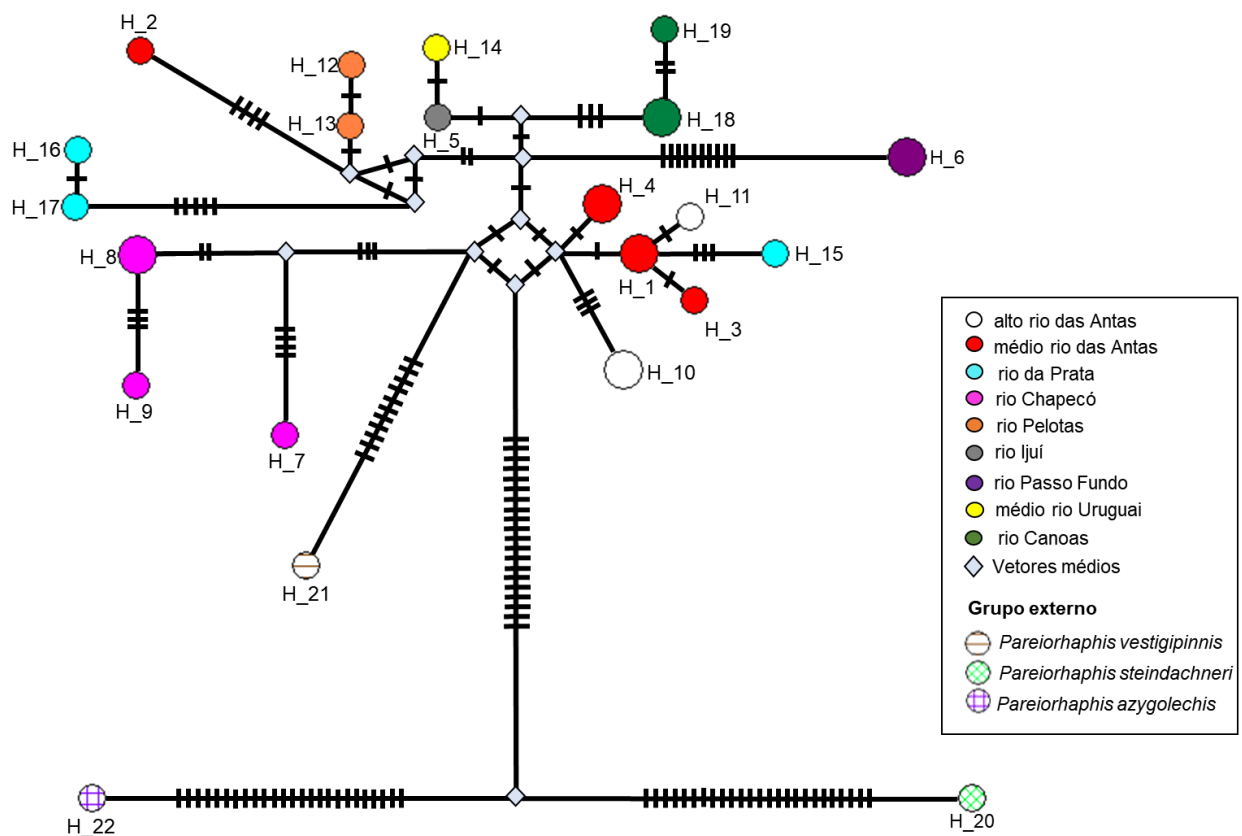


Figura 12: Rede de haplótipos concatenada (*colI*, *cytb*, 16S, 12S) entre populações de *Pareiorhaphis hystrix*. As barras entre os haplótipos indicam o número de mutações que os separam; o tamanho do círculo é proporcional ao número de exemplares agrupados em cada haplótipo; H = haplótipo; vetores médios = sequências não amostradas. Exemplos com muitos dados faltantes não foram considerados na análise.

Para o gene *colI* (Fig. 13A) observou-se um total de 12 haplótipos na rede. Há um haplótipo central compartilhado entre as diferentes bacias hidrográficas - rio Chapecó, rio Ijuí, Pelotas, médio rio Uruguai (bacia do rio Uruguai) e o alto rio das Antas (bacia do rio Taquari), do qual partem vários outros, com 1-5 passos mutacionais. Não há um padrão claro de separação por bacia hidrográfica, mas sim por área geográfica, do qual o rio Canoas, o rio Passo Fundo, o médio rio das Antas e o rio da Prata foram os únicos que não compartilharam haplótipos, apresentando somente haplótipos exclusivos.

O gene *cytb* (Fig. 13B) apresentou 23 haplótipos na rede, sendo observado uma maior estruturação genética por área, com apenas um haplótipo compartilhado entre as bacias: rio Pelotas (bacia do rio Uruguai) e o médio rio das Antas (bacia do rio Taquari) (haplótipo 17). Um único haplótipo foi compartilhado entre espécimes da mesma bacia - médio e alto rio das Antas, bacia do rio Taquari (haplótipo 6).

O gene 16S (Fig. 13C) apresentou pouca variação entre os exemplares, considerando apenas seis haplótipos na rede e as poucas mutações entre eles (1-3 passos mutacionais). A rede apresenta um haplótipo central compartilhado entre oito áreas das duas bacias hidrográficas (bacia do rio Taquari e do rio Uruguai). O rio Chapecó foi a exceção, sendo a única área a não compartilhar haplótipos e apresentar uma distância maior das demais áreas - 3 passos mutacionais.

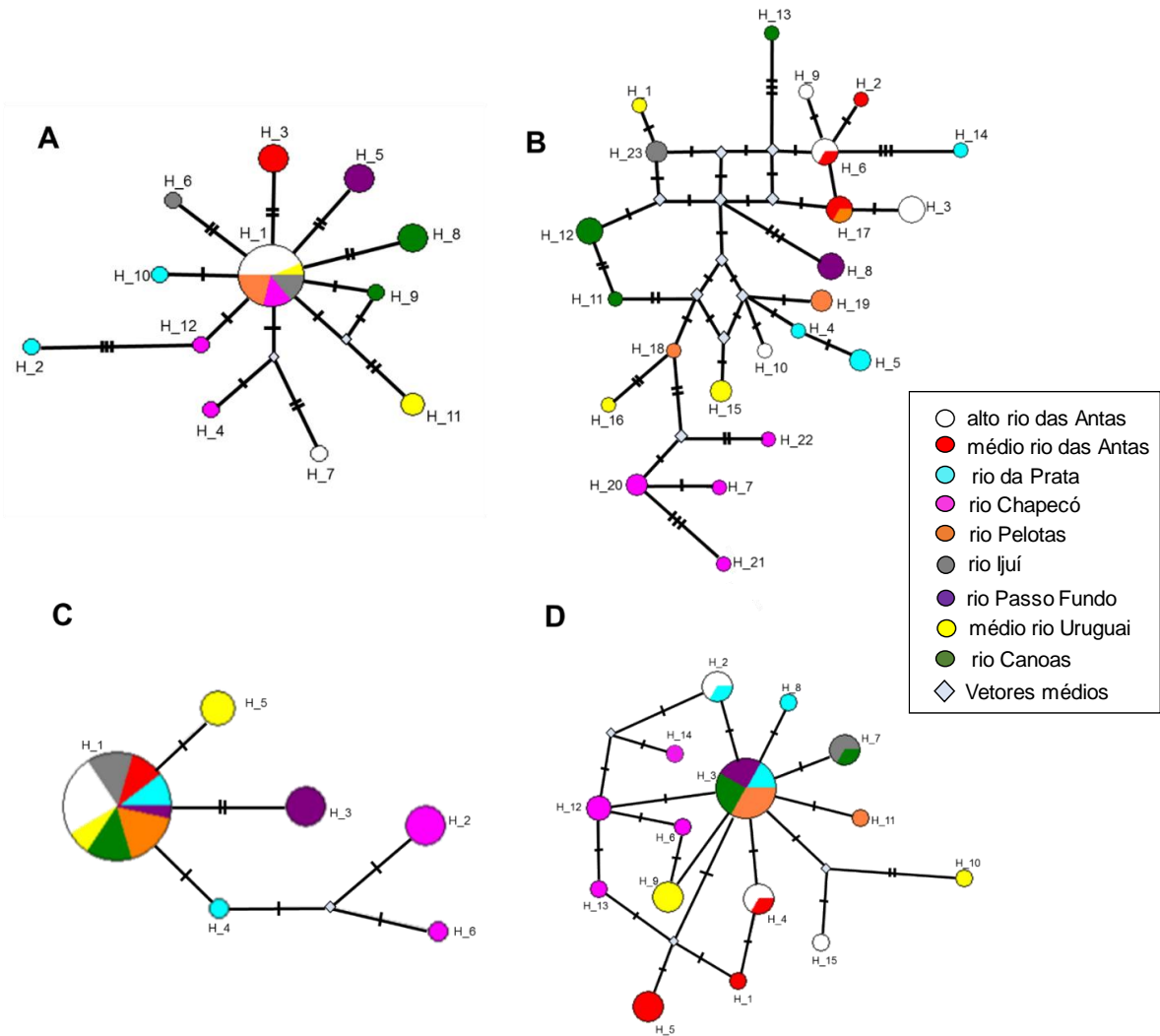


Figura 13: Rede de haplótipos por gene mitocondrial em populações de *Pareiorhaphis hystrix*: *coI* (A); *cytb* (B); 16S (C); 12S (D). As barras entre os haplótipos indicam o número de mutações que os separam; o tamanho do círculo é proporcional ao número de exemplares agrupados em cada haplótipo; H = haplótipo; vetores médios = sequências não amostradas. Exemplos com muitos dados faltantes não foram considerados nas análises.

Por fim, para o gene 12S (Fig. 13D), obteve-se 15 haplótipos, sendo o haplótipo central compartilhado entre as duas bacias hidrográficas: rio Passo Fundo, rio Canoas, rio Pelotas (bacia do rio Uruguai) e rio da Prata (bacia do rio Taquari). Do haplótipo central,

partem vários outros, em geral, com poucas mutações (1-5). O rio Chapecó e o médio rio Uruguai (bacia do rio Uruguai) apresentaram haplótipos únicos e não compartilhados. O rio da Prata compartilhou o haplótipo dois com o alto rio das Antas - bacia do rio Taquari; o haplótipo quatro foi compartilhado entre o alto e médio rio das Antas; o rio Canoas e o rio Ijuí - bacia do rio Uruguai, compartilharam o haplótipo sete.

3.2.3 Distância genética

A distância genética para os dados concatenados (Tab. 13) aponta para uma separação a nível de espécie com uma porcentagem acima de 3%, como observado para *Pareiorhaphis azygolechis* e *P. stendachneri*, ou de aproximadamente 1% para *P. vestigipinnis*. De forma geral, cada área quando comparada à outra, apresentou valores de diferenciação inferiores a 1%, com o rio Passo Fundo e o rio Chapecó apresentando maior diferença quanto às demais áreas, variando de 0,60 - 0,95 % para o rio Passo Fundo, e de 0,66 até 0,95 % para o rio Chapecó. Adicionalmente, a diferenciação genética entre as duas áreas foi a maior observada - 0,95%. O rio Pelotas (0,38-0,45-0,44%), o rio Canoas (0,44-0,49-0,49%) e o rio Ijuí (0,38-0,40-0,47%) apresentaram baixa diferenciação em relação as três áreas da bacia do rio Taquari - rio da Prata, médio rio das Antas, alto rio das Antas.

Para o gene *colI*, individualmente (Tab. 14), a distância genética indicou uma separação a nível de espécie variando de 4-6%, com exceção de *P. vestigipinnis*, que também apresentou menor diferenciação (inferior a 2%). Nenhuma área de ocorrência de *P. hystrix* quando comparada a outra ultrapassou 2%. O rio da Prata apresentou maior diferenciação genética em relação às demais áreas, seguido do médio rio Uruguai e do rio Canoas (alguns valores superiores a 1%). Outras áreas também apresentaram valores próximos a 1%, como o rio Chapecó e o rio Passo Fundo. O rio Pelotas mostrou maior proximidade com espécimes da bacia do rio Taquari (alto e médio rio das Antas), considerando a menor diferenciação genética observada (0,20 e 0,47%).

Tabela 13: Distância genética média entre e dentro das diferentes áreas de ocorrência de *Pareiorhaphis hystrix*, para os genes mitocondriais concatenados. O desvio padrão é apresentado acima da distância genética (entre áreas) e a direita (dentro das áreas). Os valores são apresentados em %. Todos exemplares sequenciados foram considerados nessa análise.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dentro das áreas
1 alto rio das Antas		0,09	0,11	0,15	0,09	0,09	0,13	0,11	0,09	0,18	0,44	0,37	0,31±
2 médio rio das Antas	0,00		0,12	0,16	0,10	0,10	0,14	0,13	0,10	0,20	0,46	0,38	0,21±
3 rio da Prata	0,50	0,57		0,17	0,09	0,11	0,14	0,11	0,10	0,18	0,43	0,38	0,43±
4 rio Chapecó	0,71	0,74	0,80		0,14	0,16	0,17	0,16	0,15	0,19	0,43	0,38	0,36±
5 rio Pelotas	0,38	0,45	0,44	0,66		0,10	0,12	0,09	0,08	0,18	0,44	0,38	0,32±
6 rio Ijuí	0,38	0,40	0,47	0,71	0,35		0,13	0,10	0,08	0,19	0,42	0,38	0,13±
7 rio Passo Fundo	0,70	0,69	0,78	0,95	0,63	0,60		0,12	0,12	0,20	0,45	0,38	0,42±
8 médio rio Uruguai	0,52	0,63	0,60	0,81	0,42	0,44	0,75		0,10	0,18	0,46	0,38	0,40±
9 rio Canoas	0,44	0,49	0,49	0,72	0,38	0,30	0,65	0,48		0,18	0,44	0,37	0,22±
10 <i>P. vestigipinnis</i>	0,90	0,90	0,90	0,90	0,81	0,81	1,06	1,00	0,81		0,46	0,40	0,06±
11 <i>P. steindachneri</i>	3,51	3,60	3,60	3,65	3,50	3,30	3,64	3,70	3,50	3,30		0,48	0,00±
12 <i>P. azygolechis</i>	3,17	3,22	3,30	3,30	3,30	3,11	3,40	3,40	3,21	3,24	3,75		0,00±

Tabela 14: Distância genética média entre e dentro das diferentes áreas de ocorrência de *Pareiorhaphis hystrix*, considerando o gene *col*. O desvio padrão é apresentado acima da distância genética (entre áreas) e a direita (dentro das áreas). Os valores são apresentados em %.

Todos exemplares sequenciados foram considerados nessa análise.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dentro das áreas	
1	alto rio das Antas	0,32	0,43	0,19	0,14	0,23	0,32	0,29	0,43	0,60	1,53	1,24	0,33 ±	0,18
2	médio rio das Antas	0,66	0,52	0,31	0,29	0,35	0,41	0,40	0,52	0,63	1,54	1,35	0,41 ±	0,24
3	rio da Prata	1,09	1,13	0,42	0,40	0,45	0,50	0,49	0,49	0,55	1,51	1,28	0,86 ±	0,36
4	rio Chapecó	0,37	0,64	0,97	0,11	0,24	0,25	0,48	0,50	0,82	1,80	1,41	0,50 ±	0,28
5	rio Pelotas	0,20	0,47	0,89	0,16	0,18	0,28	0,26	0,41	0,58	1,52	1,28	0,16 ±	0,16
6	rio Ijuí	0,46	0,72	1,15	0,45	0,26	0,34	0,31	0,45	0,62	1,55	1,30	0,30 ±	0,21
7	rio Passo Fundo	0,49	0,78	1,18	0,39	0,29	0,55	0,39	0,50	0,66	1,57	1,31	0,68 ±	0,27
8	médio rio Uruguai	0,69	0,91	1,37	0,97	0,52	0,75	0,83	0,48	0,53	1,50	1,33	0,48 ±	0,25
9	rio Canoas	0,88	1,17	1,28	0,95	0,68	0,95	0,98	1,05	0,52	1,51	1,24	0,48 ±	0,27
10	<i>P. vestigipinnis</i>	1,03	1,28	1,19	1,28	0,82	1,10	1,13	1,09	0,92	1,38	1,29	0,00 ±	0,00
11	<i>P. steindachneri</i>	5,91	6,11	6,02	6,43	5,69	5,98	6,01	5,88	5,79	4,77	1,40	0,00 ±	0,00
12	<i>P. azygolechis</i>	4,01	4,62	4,53	4,28	4,01	4,29	4,32	4,50	4,10	4,05	4,90	0,00 ±	0,00

3.2.4 Análise filogenética

A análise filogenética para os genes concatenados indicou ramos com alta probabilidade posterior, geralmente acima de 90% (Fig. 14). Clados com probabilidade posterior baixa, como 51%, agruparam espécimes de áreas da bacia do rio Uruguai e do rio Taquari, com o menor valor para o agrupamento de espécimes do rio Pelotas (67%). Também foi observado um clado com probabilidade posterior de 55% aproximadamente, agrupando espécimes da bacia do rio Uruguai - com os menores valores para aqueles que separaram os espécimes em uma grande politomia (rio Canoas, rio Ijuí e médio rio Uruguai, probabilidade posterior = 53%).

De forma geral, a filogenia concatenada apresentou clados com valores acima de 82%. A área do rio Chapecó agrupou os espécimes em um clado exclusivo e grupo irmão de todos os demais (probabilidade posterior = 100%). O rio Passo Fundo, apesar de estar dentro do grande grupo dos espécimes de *Pareiorhaphis hystrix*, apresentou um comprimento de ramo maior quando comparado aos demais, indicando um número maior de transformações (probabilidade posterior = 100%).

A filogenia individual realizada para o gene *coI* (Fig. 15), apresentou os espécimes de *P. hystrix* agrupados em uma grande politomia. Os valores de probabilidade posterior para o gene foram altos, com poucas exceções, como, por exemplo, um agrupamento com *P. vestigipinnis* (probabilidade posterior = 73%). A maior politomia observada na árvore (probabilidade posterior = 52%) foi formada por espécimes das duas bacias hidrográficas. Alguns exemplares provenientes de diferentes áreas geográficas aparecem em ramos isolados, com agrupamentos exclusivos (alto rio das Antas, rio Passo Fundo, médio rio das Antas e médio rio Uruguai; probabilidade posterior > 82%).

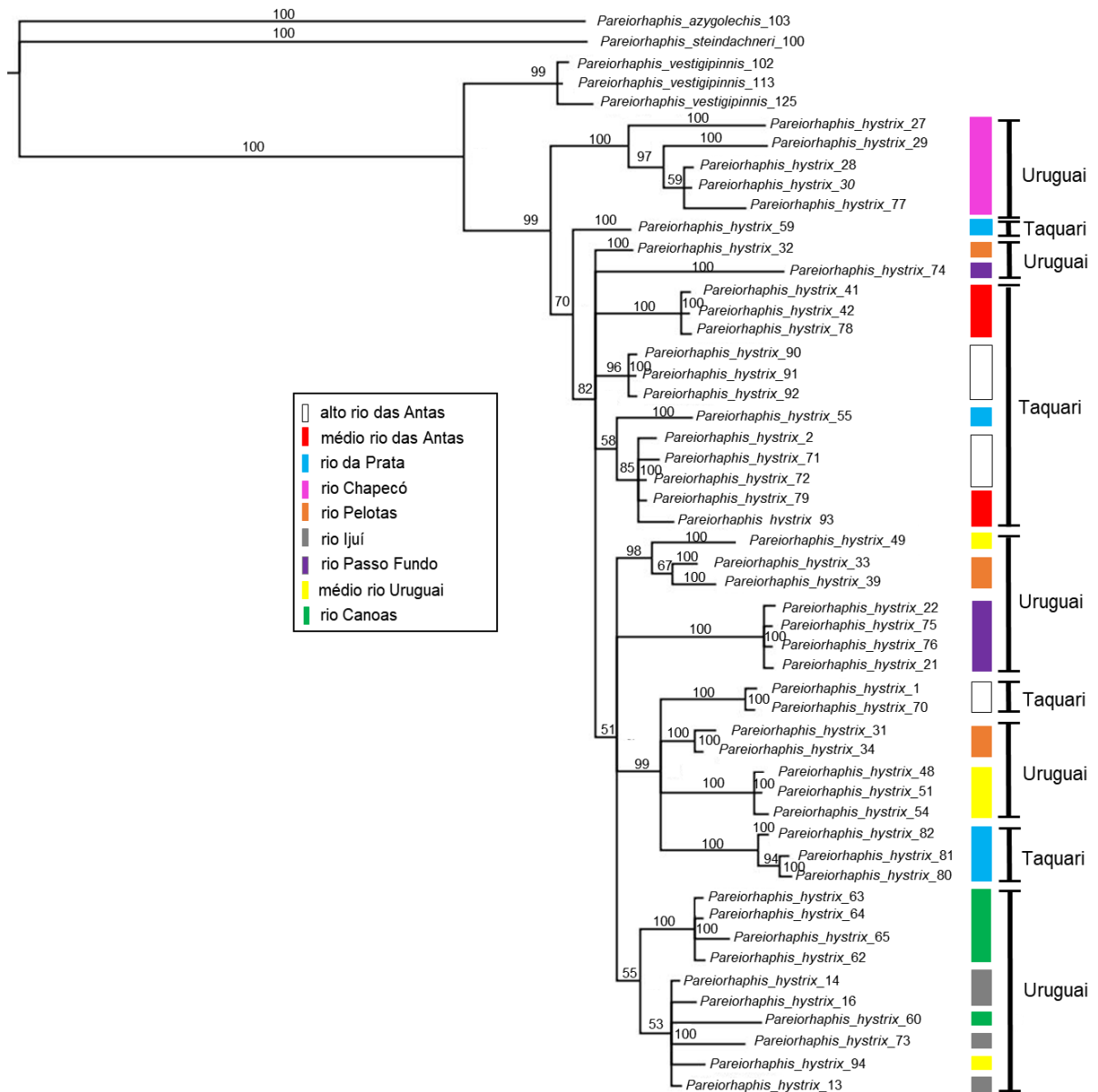


Figura 14: Reconstrução filogenética por Inferência Bayesiana (BI), com base nos genes mitocondriais concatenados para populações de *Pareiorhaphis hystrix* (*col*, *cytb*, 16S, 12S). Barras internas representam as cores das nove áreas geográficas estudadas; barras externas representam as áreas por bacia hidrográfica (Taquari ou Uruguai). Os números dos nós correspondem à probabilidade posterior em %. Todos exemplares sequenciados foram considerados na análise.

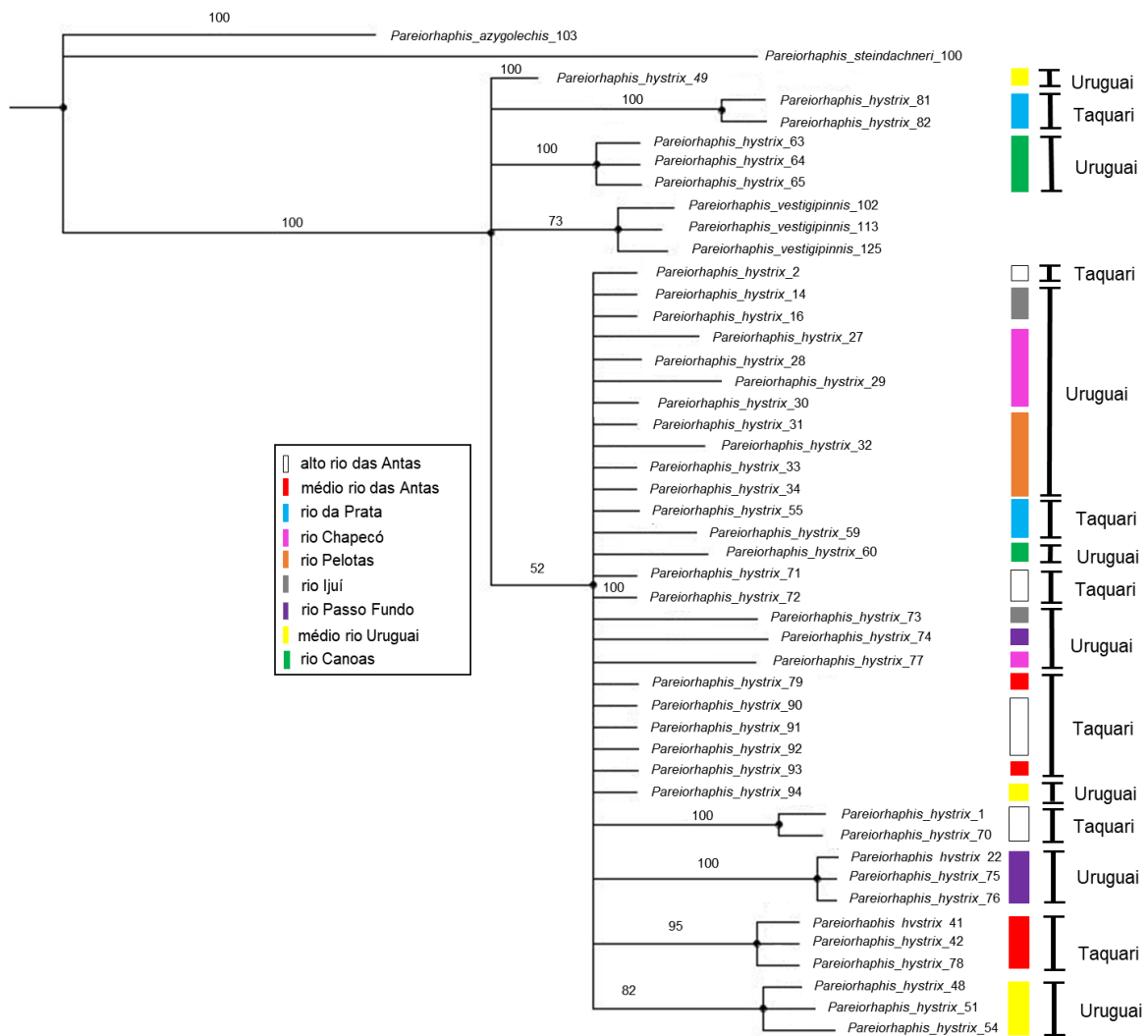


Figura 15: Reconstrução filogenética por Inferência Bayesiana (BI) - gene *col*, para populações de *Pareiorhaphis hystrix*. Barras internas representam as cores das nove áreas geográficas estudadas; barras externas representam as áreas por bacia hidrográfica (Taquari ou Uruguai). Os números dos nós correspondem a probabilidade posterior em %. Todos exemplares sequenciados foram considerados na análise.

3.2.5 Análise de delimitação de espécie por coalescência

A análise de delimitação de espécie por coalescência (GMYC), para o gene *cytb*, sugere cinco OTUS, a primeira representada por espécimes do rio Taquari (alto rio das Antas e rio da Prata) mais espécimes da bacia do rio Uruguai (rio Pelotas e médio rio Uruguai); a segunda OTU por espécimes do rio Uruguai (rio Ijuí, médio rio Uruguai, rio Canoas, rio Passo Fundo e Pelotas); a terceira OTU por espécimes do grupo externo - *Pareiorhaphis vestigipinnis* (comum da bacia do rio Uruguai), e por exemplares do grupo interno, ocorrentes no rio Uruguai (rio Passo Fundo e rio Chapecó); a quarta OTU por

espécimes das duas bacias, do rio Taquari (alto rio das Antas, médio rio das Antas, rio da Prata) e do rio Uruguai (rio Canoas); a quinta e última OTU por espécimes do rio Taquari (alto rio das Antas, médio rio das Antas e rio da Prata) e do rio Uruguai (Pelotas). A análise estimou um tempo limite de $-0,007256552$, representando o tempo antes de todos os nós refletirem a diversificação, e após todos os nós refletem os eventos coalescentes. A máxima verossimilhança para o modelo nulo (ou seja, que todas as sequências pertençam à mesma espécie) foi de 391,48 e a máxima verossimilhança para o modelo GMYC foi de 393,231 (ou seja, que indique a presença de diferentes espécies), sendo a diferença encontrada não significativa (0,17).

Uma segunda análise, realizada com o *cytb*, retirou as duas espécies do grupo externo geneticamente mais distantes (*P. azygolechis* e *P. steindachneri*), uma vez que é relatado que representantes consideravelmente distantes podem causar conflito na análise. Ainda assim, se manteve as cinco OTUS. Outras tentativas retirando um membro do grupo externo de cada vez resultou no mesmo número de OTUS, com valores de diferenciação similares entre os modelos (por exemplo, retirando *P. steindachneri*; modelo nulo = 386,02, modelo GMYC = 389,80; Fig. 16).

A coalescência para o gene *coI* sugeriu 14 OTUS, quando mantidas todas as espécies do grupo externo. Foi estimado um tempo limite de $-0,004866722$, a máxima verossimilhança para o modelo de 344,29 e a máxima verossimilhança para o GMYC de 349,436, com a diferença encontrada significativa (0,005*). Quando retirada a espécie mais distante do grupo externo (*P. steindachneri*) a árvore foi reduzida para três OTUS (Fig. 17), sendo a primeira representada por espécimes das diferentes áreas e bacias; a segunda por exemplares do médio rio Uruguai; a terceira e última por *P. vestigipinnis* e *P. hystrix* - exemplares do rio Canoas e do médio rio Uruguai (bacia do rio Uruguai), e do rio da Prata (bacia do rio Taquari). A máxima verossimilhança para o modelo nulo foi de 337,37, e de 345,52 para o modelo GMYC, com a diferença significativa (0,0002**). Ainda, quando retirados os dois membros mais distantes do grupo externo (*P. steindachneri* e *P. azygolechis*) se manteve o mesmo número de OTUS e agrupamentos, com diferença ainda significativa (0,02*).

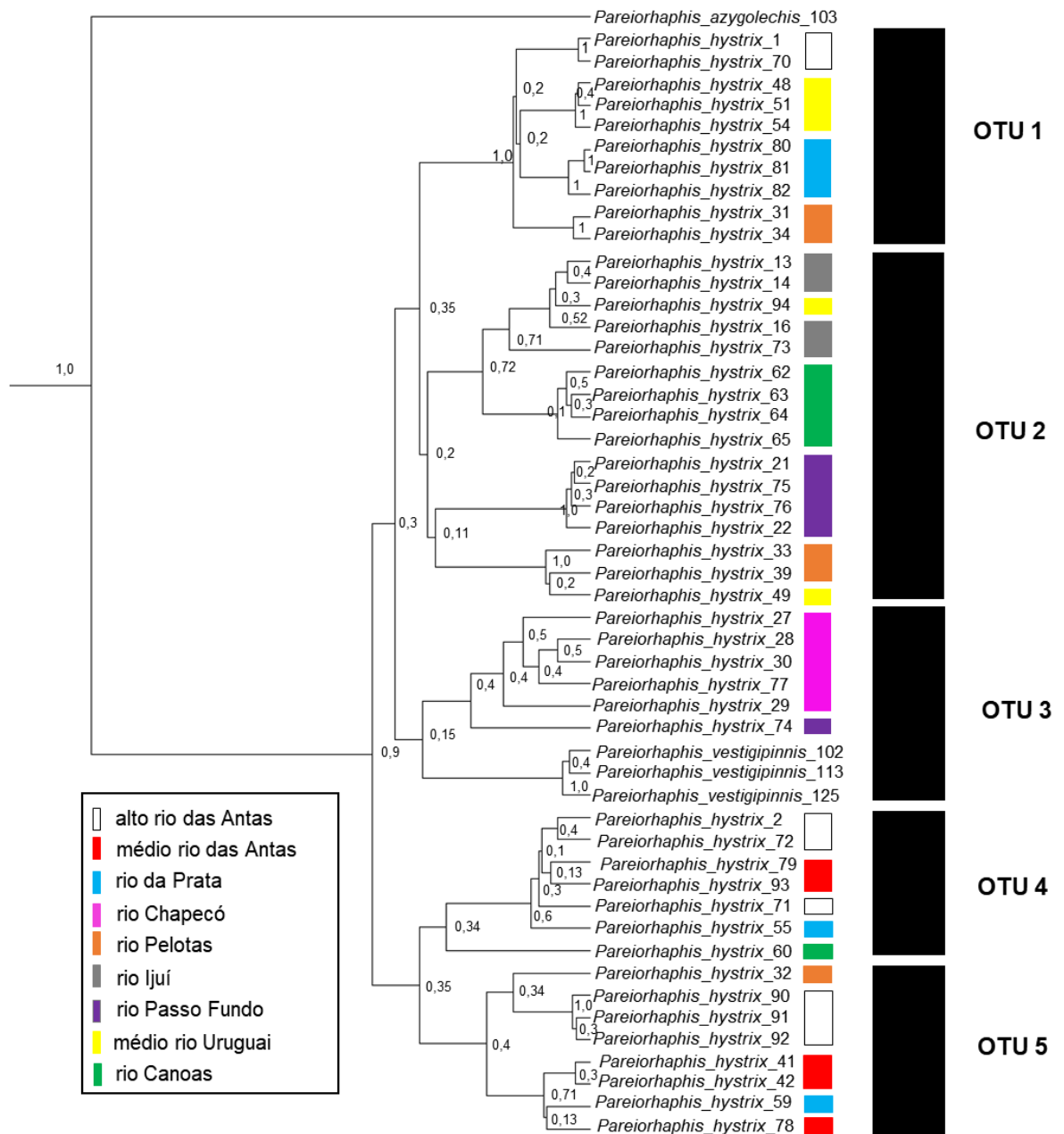


Figura 16: Resultado do método de delimitação de espécie por coalescência (GMYC) através de análise Bayesiana - gene *cytb*, para populações de *Pareiorhaphis hystrix*. Barras internas na filogenia representam as cores das nove áreas geográficas estudadas; barras externas pretas representam as possíveis OTUS. Os valores de probabilidade posterior (0-1) são apresentados nos ramos. OTU = unidade taxonômica operacional. Todos exemplares sequenciados foram considerados na análise.

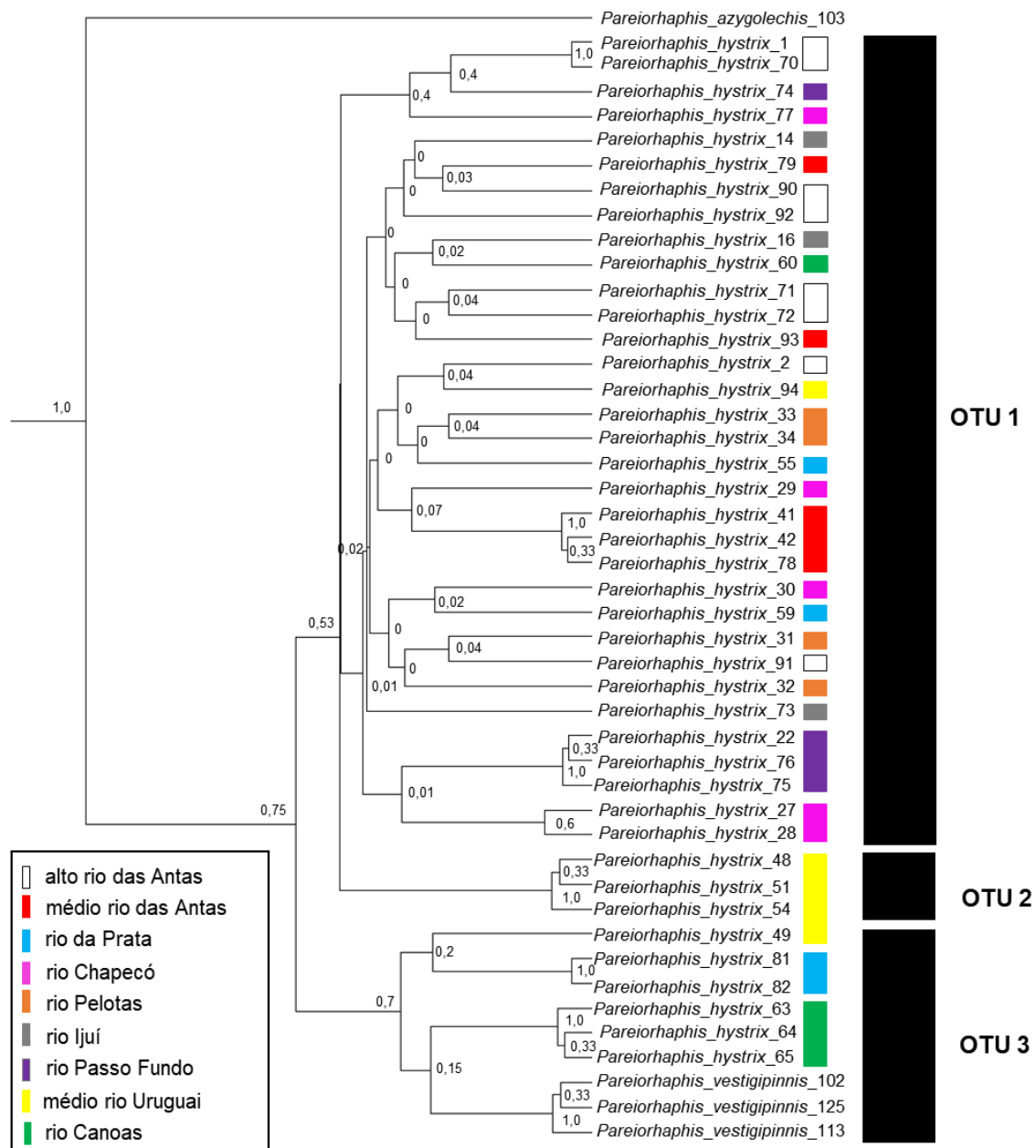


Figura 17: Resultado do método de delimitação de espécie por coalescência (GMYC) através de Inferência Bayesiana - gene *colI*, para populações de *Pareiorhaphis hystrix*. Barras internas na filogenia representam as cores das nove áreas geográficas estudadas; barras pretas externas representam as possíveis OTUS. Os valores de probabilidade posterior (0-1) são apresentados nos ramos. OTU = unidade taxonômica operacional. Todos exemplares sequenciados foram considerados na análise.

3.2.6 Análise de variância molecular e de F_{ST}

Para a AMOVA, considerando o gene *cytb*, quando analisadas as nove áreas em um único grupo hierárquico, no intuito de verificar os níveis de diferenciação genética entre todas áreas amostradas individualmente, observou-se uma maior variação entre as áreas (50,56%), com um valor de F_{ST} significativo (0,5*), apesar da variação dentro das

áreas apresentar diferença mínima (49,44%) (Tab. 15). De forma secundária, buscou-se analisar a AMOVA baseada nos dados obtidos morfológicamente, considerando as duas bacias como grupos distintos, juntando o rio Pelotas com os espécimes da bacia do rio Taquari. Observou-se que a variação entre os grupos foi baixa e não significativa (7,07%), enquanto que entre as áreas foi de 43,47%, e dentro das áreas de 49,46%, de forma bastante significativa (Tab. 16).

Por fim, uma terceira análise para o *cytb* teve como base o agrupamento de espécimes do rio Taquari e do rio Uruguai: médio e alto rio das Antas mais o rio Pelotas - como um grupo (1), o rio da Prata - como outro grupo (2), e as demais áreas da bacia do rio Uruguai (rio Chapecó, rio Ijuí, rio Passo Fundo, médio rio Uruguai e rio Canoas) - como o terceiro grupo (3). AMOVA ainda indicou uma baixa variação entre os grupos (8,35%), enquanto que a variação de áreas dentro dos grupos foi significativa (42,07%), assim como dentro das áreas (49,59%) (Tab. 17).

Os valores de F_{ST} par-à-par, de forma geral, foram altos e significativos (Tab. 18), sugestivos de estruturação genética por área. Foi observado, por exemplo, altos valores de diferenciação geográfica entre os espécimes do rio Chapecó e do rio Passo Fundo em relação as demais áreas. Foram poucas as exceções de falta de estruturação, sendo os menores valores observados para os seguintes pares - alto rio das Antas x médio rio das Antas ($F_{ST} = 0,03$) - médio rio Uruguai x rio Pelotas ($F_{ST} = 0,01$) - rio Pelotas x rio da Prata ($F_{ST} = 0,1$) - rio Ijuí x rio Canoas ($F_{ST} = 0,2$) - rio Pelotas x rio Canoas ($F_{ST} = 0,2$) - médio rio Uruguai x rio Ijuí ($F_{ST} = 0,2$) - rio Canoas x rio Ijuí ($F_{ST} = 0,2$) - rio Canoas x médio rio Uruguai ($F_{ST} = 0,2$). Na filogenia concatenada é possível observar a proximidade dos pares anteriormente mencionados.

Tabela 15: Análise de variância molecular (AMOVA), considerando o gene *cytb*. VT (%) = variação total. F_{ST} = índice de fixação; *valor significativo. Exemplares com muitos dados faltantes não foram considerados na análise.

Fonte de variação	VT (%)	F_{ST}
Entre áreas	50,56%	0,5*
Dentro de áreas	49,44%	

Tabela 16: Análise de variância molecular (AMOVA) com base nos agrupamentos obtidos na morfologia, considerando o gene *cytb*. VT (%) = variação total; Φ_{ct} = variação entre os grupos; Φ_{sc} = variação entre áreas; Φ_{st} = variação dentro de áreas; *valores significativos. Exemplos com muitos dados faltantes não foram considerados na análise.

Fonte de variação	VT (%)	
Entre os grupos - 2 bacia do rio Taquari (incluindo rio Pelotas) + bacia do rio Uruguai	7,07%	$\Phi_{ct} = 0,07$
Entre áreas dentro de grupos	43,47%	$\Phi_{sc} = 0,46^*$
Dentro das áreas	49,46%	$\Phi_{st} = 0,50^*$

Tabela 17: Análise de variância molecular (AMOVA) com base nos agrupamentos obtidos na morfologia, considerando o gene *cytb*. VT (%) = variação total; Φ_{ct} = variação entre os grupos; Φ_{sc} = variação entre áreas; Φ_{st} = variação dentro de áreas; *valores significativos. Exemplos com muitos dados faltantes não foram considerados na análise.

Fonte de variação	VT (%)	
Entre os grupos (3) alto rio das Antas, médio rio das Antas, rio Pelotas + rio da Prata + bacia do rio Uruguai	8,35%	$\Phi_{ct} = 0,08$
Entre áreas dentro de grupos	42,07%	$\Phi_{sc} = 0,45^*$
Dentro das áreas	49,59%	$\Phi_{st} = 0,50^*$

Tabela 18: Análise de F_{ST} par-à-par para as nove áreas geográficas de *Pareiorhaphis hystrix*, considerando o gene *cytb*. *valores significativos. Indivíduos com muitos dados faltantes não foram considerados na análise.

Áreas	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 alto rio das Antas	0,00								
2 médio rio das Antas	0,03	0,00							
3 rio da Prata	0,45*	0,53*	0,00						
4 rio Chapecó	0,56*	0,63*	0,54*	0,00					
5 rio Pelotas	0,34*	0,44	0,17	0,40*	0,00				
6 rio Ijuí	0,52*	0,77*	0,49*	0,69*	0,43	0,00			
7 rio Passo Fundo	0,70*	0,87*	0,66*	0,76*	0,61*	0,30	0,00		
8 médio rio Uruguai	0,42*	0,48*	0,25*	0,45*	0,01	0,24	0,55*	0,00	
9 rio Canoas	0,46*	0,53*	0,41*	0,54*	0,27*	0,20	0,64*	0,21	0,00

Quando analisado o gene *coI*, AMOVA gerou valores similares aos do *cytb*, contudo, a variação dentro das áreas (59,90%) foi maior do que a variação entre as áreas (40,12%), apesar de ambos os valores serem altos, com F_{ST} de 0,4 significativo ($p < 0,05$; Tab. 19). Os valores par-à-par de F_{ST} , de forma geral, não foram significativos, apesar de serem altos (Tab. 20). O rio Canoas apresentou alguns valores estatisticamente significativos (Variação do F_{ST} : 0,25-0,76); outras áreas como o médio rio Uruguai (Variação do F_{ST} : 0,31-0,75), o rio Passo Fundo (Variação do F_{ST} : 0,60-0,80) e o médio rio das Antas (Variação do F_{ST} : 0,60-0,80) apresentaram alguns valores altos e significativos.

Tabela 19: Análise de variância molecular (AMOVA), considerando o gene *coI*. VT (%) = variação total; F_{ST} = índice de fixação; *valor significativo. Exemplos com muitos dados faltantes não foram considerados na análise.

Fonte de variação	VT (%)	F_{ST}
Entre áreas	40,12%	0,4*
Dentro de áreas	59,90%	

Tabela 20: Análise de F_{ST} par-à-par para as nove áreas geográficas de *Pareiorhaphis hystrix*, considerando o gene *col*. *valores significativos. Indivíduos com muitos dados faltantes não foram considerados na análise.

Áreas	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 alto rio das Antas	0,00								
2 médio rio das Antas	0,74*	0,00							
3 rio da Prata	0,37*	0,60	0,00						
4 rio Chapecó	-0,03	0,68*	0,11	0,00					
5 rio Pelotas	-0,17	0,80	0,25	-0,09	0,00				
6 rio Ijuí	0,05	0,75	0,14	-0,00	0,00	0,00			
7 rio Passo Fundo	0,75*	0,80	0,60	0,68*	0,80	0,75	0,00		
8 médio rio Uruguai	0,49	0,75	0,31	0,37	0,50	0,37	0,75	0,00	
9 rio Canoas	0,49*	0,76*	0,25	0,40	0,51	0,41	0,76*	0,52	0,00

4. DISCUSSÃO

4.1 Análise Morfológica

A espécie em estudo é descrita do alto rio Pelotas, bacia do rio Uruguai, com a presença de odontódeos delicados sobre o focinho, geralmente mais desenvolvidos na porção anterior do focinho e nas laterais da cabeça (Pereira, Reis, 2002). A análise de espécimes de diferentes áreas possibilitou a observação mais detalhada desses padrões. De maneira geral, apesar de alguns exemplares de diferentes localidades apresentarem odontódeos também sobre o focinho, esses se mostram mais desenvolvidos nas laterais da cabeça dos machos, concordando com o estudo de descrição da espécie (Pereira, Reis, 2002).

Pareiorhaphis hystrix não é descrita com a presença de odontódeos bem desenvolvidos na região anterior da cabeça, carácter analisado de forma mais detalhada nesse estudo, com uma amostragem maior e considerando as diferentes localidades de ocorrência. É possível observar tanto odontódeos grandes e desenvolvidos, como odontódeos pequenos e delicados junto a intumescência lateral, essa também mostrando variação quanto ao seu tamanho. Quando a intumescência desses espécimes se mostra bem desenvolvida, os odontódeos costumam ser pouco visíveis, considerando que são estruturas fixadas ao osso, emergindo através da intumescência.

Apesar de alguns pesquisadores sugerirem que a presença de odontódeos desenvolvidos em machos estaria associada com à época reprodutiva, são comumente observados espécimes de *P. hystrix* com odontódeos ao longo de diferentes épocas do ano. Feltrin (2005, dados não publicados) estudou a dinâmica populacional de duas espécies de *Pareiorhaphis*, *P. nudula* (Reis & Pereira, 1999) e *P. stomias* (Pereira & Reis, 2002), descobrindo que as espécies não apresentaram período específico de reprodução e desova. O autor destaca que, possivelmente, alguns ambientes podem não apresentar fatores limitantes ao longo de um período, possibilitando que a reprodução se prolongue por vários meses, o que seria o caso dessas duas espécies. Dessa forma, esses e outros fatores poderiam justificar a ausência de um período reprodutivo específico também para *P. hystrix* e a explicação para a ocorrência de espécimes com odontódeos evidentes ao longo do ano.

Apesar das diferentes suposições discutidas, não há estudos que confirmem que o desenvolvimento de odontódeos, na região do focinho de espécimes de *P. hystrix*, esteja diretamente associado à reprodução, o que torna importante pesquisas que busquem

estudar aspectos ecológicos no gênero *Pareiorhaphis*. Em Siluriformes do gênero *Hoplosternum* e *Callichthys*, por exemplo, observou-se que os odontódeos encontrados no espinho da nadadeira peitoral se desenvolvem notavelmente na época de reprodução (Py-Daniel, COX Fernandes, 2005). Este não parece ser o caso de *P. hystrix*, que não mostrou, de forma geral, um padrão bem desenvolvido nessa região, onde os odontódeos estão estáveis e na maioria das vezes menores ao longo de todo ano. Esse padrão tende a variar dentro do gênero, onde por exemplo, *P. stephanus* (Oliveira & Oyakawa, 1999) desenvolve longos odontódeos ao longo do espinho da nadadeira peitoral, similares aqueles presentes na lateral da cabeça de *P. hystrix*. Alguns machos de *P. hystrix* podem apresentar odontódeos mais visíveis no espinho da nadadeira peitoral, comumente quando os odontódeos na região lateral da cabeça também estão desenvolvidos, contudo, não é uma regra para espécie, não sendo observado de forma contínua, considerando os machos adultos com odontódeos analisados nesse estudo.

Assim como as variações no desenvolvimento de odontódeos e da intumescência lateral de machos, as variações observadas no colorido da espécie não indicam apenas um padrão em cada área ou dentro das diferentes áreas estudadas, provavelmente tratando-se de variações intrapopulacionais. As variações melhor observadas foram quanto a padrões de pontuações ao longo da superfície dorsal do corpo de alguns espécimes. Ainda, o colorido é mais evidente em espécimes mais jovens, como já observado por Pereira, Reis (2002), mas neste estudo a análise é realizada especificamente em exemplares adultos.

Há vários estudos com espécies de peixes que relataram variações intra e interpopulacionais, quanto ao padrão de colorido. Por exemplo, Chavez *et al.* (2006) relatam variações no padrão de colorido abdominal do loricarídeo *Pterygoplichthys disjunctivus* (Weber, 1991), coletado ao longo da Laguna de Bay, nas Filipinas, ilha de Luzón, do qual foram observados diferentes padrões manchados nos espécimes. Ainda, outro estudo similar foi realizado por Silva *et al.* (2010), com *Cambeva iheringi* (Eigenmann, 1917), um siluriforme da família Trichomycteridae, comum na região sudeste do Brasil. Alguns autores sugerem que o padrão de colorido é uma característica importante para o diagnóstico de espécies de Trichomycteridae, contudo, nesse estudo os autores relatam tratar apenas variações intraespecíficas entre os espécimes - que apresentaram distintos padrões de pigmentação corporal.

Pereira, Reis (2002), ao descreverem a espécie, não apontaram a presença de placas na região abdominal como uma característica em *P. hystrix*, mas destacaram um abdômen completamente nu. Dessa forma, a presença de placas nessa região se trata de

uma novidade para a espécie. No gênero *Pareiorhaphis* algumas espécies como *P. nasuta* Pereira, Vieira & Reis, 2007 e *P. scutula* Pereira, Viera & Reis, 2010, descritas da bacia do rio Doce, *P. ruschii* Pereira, Lehmann & Reis, 2012, descrita de afluentes dos rios Piraquê-Açu e Reis Magos, e *P. parmula* Pereira, 2005, da bacia do rio Paraná, apresentam placas abdominais. Essas espécies possuem algumas placas distribuídas em cada lado da cintura peitoral, logo após a abertura das brânquias, com exceção de *P. scutula*, que também pode apresentar placas espalhadas ao longo de toda região abdominal, desde a cintura peitoral até a inserção da nadadeira pélvica.

Pareiorhaphis hystrix apresenta poucas placas na região abdominal, assim como a maioria das espécies de *Pareiorhaphis* destacadas anteriormente. A função dessas placas ainda é desconhecida, podendo apresentar algum importante papel ecológico, ou não. Sugestivamente, espécimes que apresentam uma grande concentração de placas no abdômen podem possuir maior facilidade na fixação em pedras, ambiente comum para Loricariidae. Contudo, para a maioria das espécies do gênero, o número de placas na região é muito pequeno e restrito a uma porção do abdômen (Pereira, 2005; Vieira *et al.*, 2007; Pereira, Reis, 2012). Ainda, para a espécie estudada, as placas não são observadas em todos os exemplares adultos analisados.

Dentre as análises morfológicas, a análise de variância (ANOVA) permitiu uma observação mais detalhada nos padrões merísticos, identificando tendências geográficas nos espécimes de *P. hystrix*. Na ANOVA, a variação significativa encontrada para algumas contagens, como por exemplo, no número de dentes do pré-maxilar e do dentário, pode ser devido ao fato dos espécimes perderem e reporem seus dentes frequentemente (Py-Daniel, Fernandes, 2005), podendo assim, ter apresentado variação entre os exemplares que estavam em diferentes etapas de reposição. Apesar de ainda serem observados outros valores significativos, as diferenças entre as contagens são mínimas e se enquadram dentro da variação esperada para a espécie (Pereira, Reis, 2002).

Ainda, é possível observar uma tendência de separação por bacia hidrográfica, com a exceção do rio Pelotas, que mostrou maior proximidade aos espécimes da bacia adjacente - do rio Taquari. A análise discriminante linear (LDA), utilizada para os dados morfométricos, apresentou maior divergência entre as bacias em relação à análise de componentes principais (PCA). Ainda, a LDA corroborou os dados merísticos anteriores, indicando uma maior proximidade do rio Pelotas à bacia do rio Taquari, assim como com a presença de placas abdominais encontradas nos espécimes do rio Uruguai, com exceção do rio Pelotas.

4.2 Análise Molecular

De forma geral, o formato das redes de haplótipos obtidas é característico de uma rede estrelar, com um haplótipo central, e os demais partindo deste com poucas mutações (Genes *coI*, 16S, 12S), sugestivo de uma expansão recente do haplótipo parental (Arnaud *et al.*, 1999; Vasconcellos *et al.*, 2008; Joy *et al.*, 2016, Subburaj *et al.*, 2017). Ainda, foi possível observar um número de haplótipos alto, considerando o número amostral em algumas áreas geográficas, seguido pela pequena diversidade de nucleotídeos - poucas mutações entre os haplótipos, também corroborando para uma expansão recente (Grant, Bowen 1998; Mondin *et al.*, 2018). Há pequenas variações entre os espécimes das diferentes áreas, com as duas bacias, de forma geral, compartilhando o haplótipo central entre si.

O gene *cytb* foi mais informativo quando comparado aos outros genes nas redes de haplótipos obtidas, com a maioria das localidades portando seus próprios haplótipos e com um número de mutações um pouco maior as separando. A rede concatenada, quando considerado todos os genes, perdeu o padrão estrelar observado individualmente, com as áreas apresentando haplótipos próprios e uma maior distância entre eles. Os valores de distância genética, considerando os dados concatenados, apontam para uma maior separação dos espécimes do rio Chapecó e do rio Passo Fundo das demais áreas, mostrando concordância com as redes e com a filogenia obtida.

Para *Pareiorhaphis*, existe apenas um estudo envolvendo análise populacional com dados moleculares (Lima *et al.*, 2017), juntamente com o desenvolvimento de rede haplotípica, para *P. garbei* (Ihering, 1911), encontrada na bacia do rio Macaé, sudeste do Brasil. Neste estudo, com base na rede de haplótipos gerada (*coI* e *cytb* separadamente), nenhum haplótipo encontrado nas diferentes populações foi compartilhado com a outra, mostrando ainda, um grande número de passos mutacionais. O gene *cytb* sugeriu maior diferenciação entre as áreas, aparentemente como no presente estudo. Essa estruturação populacional entre as áreas foi confirmada pelas reconstruções filogenéticas dentro de *P. garbei*. Adicionalmente, uma das populações estudadas (Macaé) apresentou alta estruturação genética, quando comparada às demais, sugerindo fortemente que os espécimes desses dois grupos representam espécies diferentes, considerando ainda, análises morfológicas prévias.

Outro estudo similar, realizado com diferentes populações de *Diapoma itaimbe* (Malabarba & Weitzman, 2003), um lambari comum das drenagens do sul do Brasil, mostrou evidência de estruturação dos espécimes por área geográfica, facilmente

observável pela rede de haplótipos gerada, considerando dois genes mitocondriais concatenados (*col+NAD2*) (Hirschmann *et al.*, 2015). As análises moleculares indicaram três grupos evolutivos que divergiram um do outro com uma estimativa de 1.600.000 e 450.000 de anos.

Apesar do presente estudo apresentar haplótipos exclusivos entre as áreas estudadas, assim como para as populações de *P. garbei* e do lambari *D. itaimbe*, o número de mutações que as separam ainda é menor, sendo ainda observada bastante variabilidade interna por área geográfica. Contudo, já é relatada diferenciação por área geográfica, observada por testes de estruturação genética - AMOVA, e ainda, outras análises moleculares. O rio Passo e o rio Chapecó apresentaram maior número de mutações e separação nas análises moleculares, mas ainda não há evidência suficiente na morfologia para sugerir a existência de uma espécie separada, restrita à porção média-superior da bacia do rio Uruguai.

Apesar da análise de delimitação de espécies por coalescência (GMYC - *cytb* e *col*) sugerir a existência de diferentes OTUS, essa separação não é observada nas demais análises moleculares e morfológicas. Para o gene *col*, a distância genética não indica a existência de mais de uma espécie, uma vez que quando utilizado na identificação de novas espécies sugere-se um limite de 2%, considerando os indivíduos em análise (Ward *et al.*, 2009; Jumawan *et al.*, 2011; Roxo *et al.*, 2015b; Shimabukuro-Dias *et al.*, 2016; Ribolli *et al.*, 2017, dentre outros). Assim, os resultados sugerem a presença de apenas uma espécie, considerando as pequenas variações entre as áreas estudadas, com apenas algumas ultrapassando 1% de diferenciação genética - o rio da Prata e o rio Canoas, o que pode ter influenciado nas OTUS.

Sugere-se que a inclusão de espécies distantes geneticamente (como grupos externos) na filogenia gerada, pode vir a comprimir eventos coalescentes em direção às pontas das árvores, tornando difícil a diferenciação de espécies próximas para o modelo (Michonneau, 2016). Contudo, é importante destacar que mesmo após a retirada de espécies distantes, os agrupamentos que foram mantidos e a sugestão de três OTUS - gene *col*, ainda é pouco provável. O rio Canoas foi a área mais diferenciada em dados merísticos, na morfologia e em algumas análises moleculares. Contudo, é observado que nem todos os espécimes da área apresentaram o mesmo padrão de diferenciação. Os resultados obtidos para o gene *cytb*, com ou sem o grupo externo (*P. steindachneri* e *P. azygolechis*), indicaram os mesmos agrupamentos e as quatro OTUS, apesar deste padrão também não ser corroborado pelos demais dados desse trabalho.

Uma espécie do grupo externo, *Pareiorhaphis vestigipinnis*, apresentou muita proximidade aos espécimes de *P. hystrix*, o que sugere que ela é pouco diferenciada da espécie estudada, principalmente com base em dados moleculares. A principal característica distintiva desta espécie na morfologia é a ausência da nadadeira adiposa (Pereira, Reis, 1992), a qual está presente em *P. hystrix*. Pereira, Reis (2017) ao estudarem a filogenia de Neoplecostominae, com dados morfológicos, observaram a proximidade das duas espécies, agrupadas em um mesmo ramo na filogenia.

Quanto à distância genética, apesar de *P. vestigipinnis* apresentar valores maiores quando comparado aos espécimes de *P. hystrix*, os valores ainda são consideravelmente baixos, uma vez que *P. azygolechis* e *P. steindachneri*, também pertencentes ao grupo externo, mostram uma variação acima de 3% dos espécimes de *P. hystrix*. Na filogenia e na análise por coalescência (GMYC) realizada com o *col*, é possível observar a espécie proximamente relacionada com espécimes do rio Canoas, do rio da Prata e do médio rio Uruguai. Contudo, apesar da similaridade com o grupo interno, há uma separação das espécies na filogenia com os genes concatenados, na qual *P. vestigipinnis* é recuperada como grupo-irmão de *P. hystrix*, assim como na rede de haplótipos concatenada, onde é possível observar, de forma geral, uma separação maior da espécie, considerando o número de mutações em relação ao grupo interno.

Aparentemente, os genes *col* e *cytb* são os que melhor contribuem a nível de diferenciação interespecífica, considerando as demais espécies de *Pareiorhaphis*. Esses dois genes apresentam uma variação de 2-10%, separando *P. hystrix* de espécies como *P. parmula*, *P. splendens* (Bizerril, 1995), *P. eurycephalus* (Pereira & Reis, 2002) e *P. bahianus* (Gosline, 1947) enquanto o 16S e o 12S apresentam uma diferenciação menor, de 1-6% (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). *Pareiorhaphis vestigipinnis*, de forma geral, apresenta uma diferenciação menor, corroborando os presentes dados, para os quatro genes mitocondriais utilizados nesse estudo (1-2%). A diferenciação a nível de gênero, dentro de Neoplecostominae, corrobora a maior contribuição do *col* e do *cytb*, onde para *P. hystrix* há valores de diferenciação de aproximadamente 6-8% comparado a *Neoplecostomus ribeirensis* Langeani, 1990 e *Neoplecostomus* sp.

O padrão geral de diferenciação genética, com base nos dados do GenBank, está acima de 2% como visto para os dados deste estudo, com raras exceções, como *P. vestigipinnis*. Entre os espécimes deste estudo, a variação entre áreas não chegou a 1% para os genes concatenados, com alguns poucos valores ultrapassando 1% apenas para o *col*, e a variação na morfologia não foi eficiente a nível interespecífico. Ainda, é possível

observar a baixa diferenciação da espécie considerando suas áreas geográficas na filogenia, onde os espécimes estão em uma grande politomia (gene *coI*). Contudo, o limiar de 2% de diferenciação interespecífica, comumente utilizado para o gene *coI*, parece não se aplicar a todas espécies de *Pareiorhaphis*. *Pareiorhaphis vestigipinnis*, por exemplo, apresentou divergências genéticas, com valores de diferenciação até mesmo inferiores a 1% quando comparada a outras áreas com espécimes de *P. hystrix*. Um número amostral maior e uma análise mais detalhada para *P. vestigipinnis* seria necessária, para assim chegar a conclusões mais precisas.

Os dados da morfologia, indicando uma tendência de separação por bacia hidrográfica, com exceção do rio Pelotas, não foram corroborados pelos dados moleculares. Foi observado um compartilhamento de haplótipos entre as duas bacias e poucas mutações separando os haplótipos entre si. Contudo, alguns espécimes do rio Pelotas apresentaram maior proximidade com os da bacia do rio Taquari, como observado mais especificamente na rede de haplótipos concatenada e com o gene *cytb*, e ainda na distância genética com o *coI*.

AMOVA não mostra de forma clara a relação do rio Pelotas com a bacia do rio Taquari. Enquanto alguns exemplares do rio Pelotas estão mais relacionados à bacia adjacente, outros estão mais próximos à própria bacia, ou até mesmo a ambas as bacias. Em algumas redes (*coI*, 12S e 16S) pode ser observado o compartilhamento de haplótipos entre o rio Pelotas e espécimes de ambas as bacias hidrográficas. Uma maior proximidade de espécimes de bacias adjacentes, poderia ser explicado por eventos de captura de cabeceira, muito comum e bem relatado na dispersão em peixes (Lucena *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013; Roxo *et al.*, 2015a; Silva *et al.*, 2016). Esses eventos são conhecidos biogeograficamente por alterar o curso d'água de uma bacia hidrográfica para outra, e dessa forma misturar diferentes grupos de espécies, elevando consideravelmente os níveis regionais de riqueza interespecífica (Albert, Reis, 2011).

Roxo *et al.* (2014) estudou Neoplecostominae, no sudeste do Brasil, sugerindo que a captura da cabeceira tenha influenciado as distribuições de peixes ancestrais ao longo das drenagens adjacentes, permitindo que os ancestrais desse grupo atinjam a bacia do alto Paraná, corroborando com estudos anteriores (Roxo *et al.*, 2012). Dessa forma, observa-se que eventos naturais podem influenciar na atual distribuição das espécies e explicar a similaridade interespecífica de áreas geograficamente distintas.

Por fim, apesar da AMOVA ser sugestiva de estruturação genética entre as áreas geográficas, com valores de F_{ST} altos e alguns significativos, essa estruturação não é

corroborada pelos dados de forma geral. Ainda, valores altos e significativos também foram observados dentro das áreas analisadas, caracterizando a variabilidade de cada uma das localidades amostradas internamente. Essa variação interna poderia ser explicada pela presença de mais de um haplótipo por área, agrupando somente um indivíduo, garantindo assim maior variabilidade entre os espécimes por unidade amostral. Um número amostral maior de exemplares por área geográfica seria mais eficiente para esse tipo de análise, podendo assim chegar a conclusões mais precisas e testar se o padrão alto de diferenciação seria mantido ou se haveria uma estabilização entre as localidades.

4.3 Baixa diversidade do gênero em áreas comuns à *Pareiorhaphis hystrix*

Apesar de *Pareiorhaphis* ser amplamente distribuído em várias regiões do Brasil, é observada a baixa diversidade de espécies compartilhando a mesma área de ocorrência de *P. hystrix*, nas bacias do alto e médio rio Uruguai e no rio Taquari. No sul do Brasil, apenas duas espécies dividem a mesma área geográfica com *P. hystrix*: *P. vestigipinnis* e *P. eurycephalus*, ambos da bacia do rio Uruguai, ocorrentes no rio Canoas e seus afluentes.

Muitas coletas foram realizadas ao longo do tempo por pesquisadores da PUCRS, nas bacias do rio Uruguai e do rio Taquari, e a diversidade de espécies do gênero nessas áreas é baixa. O oposto é observado em outro gênero de Loricariidae, amplamente distribuído no sul do Brasil, *Eurycheilichthys*, membro de Hypoptopomatinae. A espécie-tipo, *E. pantherinus* (Schaefer & Reis, 1992), foi descrita há 27 anos do curso superior do rio Uruguai, no sul do Brasil, e alguns anos após a descoberta *E. limulus* Reis & Schaefer, 1998 foi descrita da porção superior do rio Jacuí, principal afluente do sistema da laguna dos Patos. Após essas descrições, uma grande diversidade anteriormente não detectada na bacia do rio Taquari foi descoberta, e proporcionou o reconhecimento de sete novas espécies (Reis, 2017). Atualmente, o gênero é composto por nove espécies, e apresenta uma alta diversidade na mesma área geográfica de *P. hystrix*.

Ao contrário de *Eurycheilichthys*, a história evolutiva de *Pareiorhaphis* parece ser mais recente no sul do Brasil. Segundo Reis (2017), dentro da bacia do rio Taquari, apenas *E. paucidens* Reis, 2017 e *E. luisae* Reis, 2017 são simpátricas a outras espécies, enquanto que cada uma das cinco espécies restantes é endêmica de um único riacho ou microbacia, sendo os habitats de corredeiras usados por *Eurycheilichthys* isolados uns dos outros, por trechos profundos, que atuam como barreiras à sua dispersão. Reis (2017) acredita que o padrão de distribuição, isolamento e diversificação do gênero na região pode ter ocorrido

por capturas de riachos de cabeceira entre os tributários superiores dos rios Uruguai, Jacuí e Taquari e entre os afluentes tributários do próprio rio Taquari.

As análises deste estudo indicam que *P. hystrix* ainda conserva haplótipos antigos comuns às duas bacias hidrográficas, considerando alguns genes mitocondriais, mostrando pouca diferenciação entre seus espécimes quanto às áreas geográficas. Se esses espécimes estivessem separados por tempo suficiente, provavelmente haveria diferentes espécies do gênero distribuídas ao longo das duas bacias hidrográficas.

5. Conclusões

Os resultados moleculares, de maneira geral, apontam para uma leve estruturação populacional de *Pareiorhaphis hystrix*, considerando as áreas de ocorrências analisadas no sul do Brasil. As bacias do rio Uruguai e do rio Taquari não apresentaram grandes diferenciações. Os dados indicam que áreas geograficamente próximas não são necessariamente aquelas mais similares, a exemplo do rio Passo Fundo e do rio Chapecó, ambas na porção oeste da bacia do rio Uruguai superior. Quanto à morfologia, há uma separação dos espécimes com base na sua bacia hidrográfica, com exceção do rio Pelotas, que é mais próximo ao Taquari do que ao restante da bacia do rio Uruguai, sugestivo de eventos de captura de cabeceira, já relatados para a subfamília. A seleção natural parece estar atuando de forma diferencial na morfologia e na genética dos espécimes de *P. hystrix*.

De forma geral, os dados desse estudo sugerem que *P. hystrix* é composto por uma espécie biológica, de forma a não refutar a hipótese nula. Esse trabalho vem a contribuir para a melhor compreensão entre as diferentes populações de *P. hystrix*, com base nas suas áreas de ocorrência no sul do Brasil.

6. Referências Bibliográficas

- Albert JS, Reis RE. Introduction to Neotropical Freshwaters. Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes. London: University of California Press, Berkeley and Los Angeles; 2011.
- Almeida FFM. O planalto basáltico da bacia do Paraná. BPG. 1956; 24:3-34.
- ANA, Agência Nacional de Águas. Região Hidrográfica do Uruguai [Internet]. ANA: Brasília – DF; 2018 [citado em 24 de outubro de 2018]. Disponível em: <http://www2.ana.gov.br/> .
- Aquino A, Schaefer SA. Revision of *Oxyropsis* Eigenmann and Eigenmann, 1889 (Siluriformes, Loricariidae). Copeia. 2002; 2:374-390.
- Armbruster JW. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. Zool J Linn Soc. 2004; 141(1):1-80.
- Arnaud S, Bonhomme F, Borsa P. Mitochondrial DNA analysis of the genetic relationships among populations of scad mackerel (*Decapterus macarellus*, *D. macrosoma*, and *D. russelli*) in South-East Asia. Mar Biol. 1999; 135(4):699-707.
- Arratia G. Catfish head skeleton and the siluriform postcranial skeleton. In: Arratia G, Kapoor BG, Chardon M, Diogo R, editores. Catfishes. Enfield: Science Publisher; 2003. p. 121-157.
- Avise JC. Molecular Markers, Natural History and Evolution. New York: Chapman & Hall; 1994.
- Avise JC. Phylogeography: The History and Formation of Species. Massachusetts: Harvard Univ. Press, Cambridge; 2000.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol Biol Evol. 1999; 16(1):37-48.
- Becker FG; de Fries LCC, Ferrer J, Bertaco VA, Luz-Agostinho KDG, Silva JFP, Cardoso AR, Lucena ZMS, Lucena CAS. Fishes of the Taquari-Antas river basin (Patos Lagoon basin), southern Brazil. Braz. J. Biol. 2013; 73(1):79-90.
- Bizerril CRSF. Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste brasileiro. Acta biol. leopoldensia. 1994; 16(1):51-80.
- Boore JL. Animal mitochondrial genomes. Nucleic Acids Res. 1999; 27(8):1767-1780.
- Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu CH, Xie D, Drummond, A. J. BEAST 2: A software platform for bayesian evolutionary analysis. PLOS Comput. Biol. 2014; 10(4):1-6.
- Calcagnotto D. Taxas de evolução e o relógio molecular. In: Matioli SR (ed.). Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos Editora; 2004.
- Calegari BBC, Lehmann PA, Reis RE. Two new species of cascudinhos of the genus *Otothyropsis* (Siluriformes: Hypoptopomatinae) from the rio Paraná basin, Brazil. Zootaxa. 2013. 3619(2):130-144.
- Carvalho PH, Lima SMQ, Zawadzki CH, Oliveira C, de Pinna M. Phylogeographic patterns in suckermouth catfish *Hypostomus ancistroides* (Loricariidae): dispersion, vicariance and species complexity across a Neotropical biogeographic region. Mitochondrial DNA B Resour. 2016; 27(5):3590-3596.
- Chavez JM, de La Paz RM, Manohar SK, Pagulayan RC, Carandang JR. New Philippine record of south american sailfin catfishes (Pisces: Loricariidae). Zootaxa. 2006; 1109:57-68.

- Chiachio MC, Oliveira C, Montoya-Burgos JI. Molecular systematic and historical biogeography of the armored neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Mol Phylogenet Evol.* 2008; 49(2):606-617.
- Collins RA, Bifi AG, de Oliveira RR, Ribeiro ED, Lujan NK, Py-Daniel LHR, Hrbek T. Biogeography and species delimitation of the rheophilic suckermouth catfish genus *Pseudolithoxus* (Siluriformes: Loricariidae), with the description of a new species from the Brazilian Amazon. *Syst Biodivers.* 2018; 16(6):538–550
- Cramer CA, Liedke AMR, Bonatto SL, Reis RE. The phylogenetic relationships of the Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae) as inferred from mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences. *Bull. Fish Biol.* 2007; 9(1):51-59.
- Cramer CA, Sousa LM. A New Species of Tiger Pleco *Panaqolus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Xingu Basin, Brazil. *PLOS One.* 2016; 11(11):1-19.
- D'Anatro A, Giorello F, Feijoo M, Lessa EP. Testing for the Occurrence of Selective Episodes During the Divergence of Otophysan Fishes: Insights from Mitogenomics. *J. Mol. Evol.* 2017; 84(4):162-173.
- De Queiroz K. Species concepts and species delimitation. *Syst Bio.* 2007; 56(6):879-886.
- Dias TS, Fialho CB. Comparative dietary analysis of *Eurycheilichthys pantherinus* and *Pareiorhaphis hystrix*: two Loricariidae species (Ostariophysi, Siluriformes) from Campos Sulinos biome, southern Brazil. *Iheringia, Sér. Zool.* 2011; 101(1-2):49-55.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(5):1792–1797.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics.* 1992; 131(2):479-491.
- Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010; 10:564-567.
- Feltrin CRM. Dinâmica populacional de *Pareiorhaphis nudulus* (Reis & Pereira, 1999) e *Pareiorhaphis stomias* (Pereira & Reis, 2002), em um trecho do rio Mãe Luzia, Treviso, Santa Catarina, Brasil. [Tese para obtenção do título em Bacharel em Ciências biológicas]. Criciúma, Santa Catarina: UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2005.
- FEPAM, Fundação Estadual de Proteção Ambiental. Qualidade das águas da bacia hidrográfica do rio das Antas e do rio Taquari - Descrição da área. GT [Internet]. Porto Alegre - RS [citado em 5 nov 2018]. Disponível em: <http://www.fepam.rs.gov.br/>.
- Fricke R, Eschmeyer WN, Fong JD. Catalog of fishes: Family/Subfamily/Genera/Species [Internet]. São Francisco (CA): California Academy of Sciences; 2019 [atualizado em 4 fev 2019; citado em 26 fev 2019]. Disponível em: <https://www.calacademy.org/scientists/projects/catalog-of-fishes>.
- Fujisawa T, Barraclough TG. Delimiting Species Using Single-Locus Data and the Generalized Mixed Yule Coalescent Approach: A Revised Method and Evaluation on Simulated Data Sets. *Syst Biol.* 2013; 62(5):707-724.
- Grant WS, Bowen BW. Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights From Sardines and Anchovies and Lessons for Conservation. *J Hered.* 1998; 89(5):415-426.

- Guimarães EC, de Brito PS, Feitosa LM, Carbalho-Costa LF, Ottoni FP. A new species of *Hyphessobrycon* Durbin from northeastern Brazil: evidence from morphological data and DNA barcoding (Characiformes, Characidae). *ZooKeys*. 2018; 765:79-101.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001; 4(1):1-9.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc.* 2003a; 270:S96–S99.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc.* 2003b; 270:313-321.
- Hirschmann A, Malabarba LR, Thomaz AT, Fagundes NJR. Riverine habitat specificity constrains dispersion in a Neotropical fish (Characidae) along Southern Brazilian drainages. *Royal Swedish Acad.* 2015; 44(4):374-382.
- Isbrücker IJH. Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). Amsterdam: Verslagen en Technische Gegevens, Instituut voor Taxonomische Zoölogie Universiteit; 1980.
- Ivanova NV, Zemlak TS, Hannr RH, Hebert N. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Mol Ecol Notes*. 2007; 7:544-548.
- Joy L, Mohitha C, Divya RP, Gopalakrishnan A, Basheer VS, Jena JK. Weak genetic differentiation in cobia, *Rachycentron canadum* from Indian waters as inferred from mitochondrial DNA ATPase 6 and 8 genes. *Mitochondrial DNA A*. 2016; 27(4):2819-2821.
- Jumawan JC, Vallejo BM, Herrera AA, Buerano CC, Fontanilla IKC. DNA barcodes of the suckermouth sailfin catfish *Pterygoplichthys* (Siluriformes: Loricariidae) in the Marikina River system, Philippines: Molecular perspective of an invasive alien fish species. *Philipp J Sci.* 2011; 4(2):103-113.
- Kearse M, Moir R, Wilson M, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012; 28(12):1647-1649.
- Lanfear R, Calcott B, Ho SYW, Guindon S. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Mol Biol Evol.* 2012; 29(6):1695–1701.
- Lévêque C, Oberdorff T, Paugy D, Stiassny MLJ, Tedesco PA. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*. 2008; 595:545-567.
- Lima SMQ, Berbel-Filho WM, Araújo TFP, Lazzarotto H, Tatarenkov A, Avise JC. Headwater Capture Evidenced by Paleo-Rivers Reconstruction and Population Genetic Structure of the Armored Catfish (*Pareiorhaphis garbei*) in the Serra do Mar Mountains of Southeastern Brazil. *Front Genet.* 2017; 199(8):1-8.
- Lucena ALM, Renesto E, Oliveira C, Mateus RP, Zawadzki CH. Genetic differentiation among ten populations of the genus *Neoplecostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the upper Paraná River basin. *Biochem Syst Ecol.* 2012; 44:325-332.
- Lujan NK, Armbruster JW, Lovejoy NR, López-Fernández H. Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. *Mol Phylogenet Evol.* 2015; 82:269-288.

- Magalhães MGP, Moreira DA, Furtado C, Parente TE. The mitochondrial genome of *Hypancistrus zebra* (Isbrücker & Nijssen, 1991) (Siluriformes: Loricariidae), an endangered ornamental fish from the Brazilian Amazon. *Conserv Genet Resour.* 2017; 9(2):319-324.
- Melo BF, Benine RC, Mariguela TC, Oliveira C. A new species of *Tetragonopterus* Cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae: Tetragonopterinae) from the Jari river, Amapá, northern Brazil. *Neotrop Ichthyol.* 2011; 9(1):49-56.
- Meyer A. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *Trends Ecol Evol.* 1994; 9(8):278-280.
- Michonneau F. 2016. Using GMYC for species delimitation. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.838260>.
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. Gateway Computing Environments Workshop (GCE); 2010:1-8.
- Mondin LAC, Machado CB, Resende EK, Marques DKS, Galetti Jr PM. Genetic Pattern and Demographic History of *Salminus brasiliensis*: Population Expansion in the Pantanal Region during the Pleistocene. *Front Genet.* 2018; 9(1):1-8.
- Moré JJ. The Levenberg-Marquardt algorithm: Implementation and theory. In Watson GA (ed.) *Numerical Analysis. Lecture Notes in Mathematics.* Berlin: Springer; 1978.
- Moritz C, Patton JL, Schneider CJ, Smith TB. Diversification of rainforest faunas: An integrated molecular approach. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 2000; 31:533-563.
- Nelson J S. *Fishes of the World.* New Jersey (EUA): John Wiley & Sons; 2006.
- Nelson JS, Grande TC, Wilson MVH. *Fishes of the world.* Hoboken (NY): John Wiley & Sons; 2016.
- Oliveira JC, Oyakawa OT. Two new species of *Hemipsilichthys* (Teleostei: Loricariidae) from Serra do Espinhaço, Minas Gerais, Brazil. *Ichthyol Explor Freshwat.* 1999; 10:73-80.
- Pereira EHL, Reis RE. *Hemipsilichthys vestigipinnis* sp. N. (Teleostei, Siluriformes) a new loricariid catfish from the river Uruguay basin, Southern Brazil. *Rev Fr Aquariol.* 1992; 4:111-116.
- Pereira EHL, Reis RE. Revision of the loricariid genera *Hemipsilichthys* and *Isbrueckerichthys* (Teleostei: Siluriformes), with descriptions of five new species of *Hemipsilichthys*. *Ichthyol. Explor. Freshw.* 2002; 13(2):97-146.
- Pereira EHL. Resurrection of *Pareiorhaphis* Miranda Ribeiro, 1918 (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae), and description of a new species from the rio Iguaçu basin, Brazil. *Neotrop Ichthyol.* 2005; 3(2):271-276.
- Pereira EHL, Vieira F, Reis RE. A new species of sexually dimorphic *Pareiorhaphis* Miranda Ribeiro, 1918 (Siluriformes: Loricariidae) from the river Doce basin, Brazil. *Neotrop Ichthyol.* 2007; 5(4):443-448.
- Pereira EHL, Lehmann PA, Reis RE. A new species of the Neoplecostomine catfish *Pareiorhaphis* (Siluriformes: Loricariidae) from the Coastal basins of Espírito Santo, Eastern Brazil. *Neotrop Ichthyol.* 2012; 10(3):539-546.
- Pereira EHL, Zanata AM. A new species of the armored catfish genus *Pareiorhaphis* Miranda Ribeiro (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Paraguaçu, Bahia State, northeastern Brazil. *Neotrop Ichthyol.* 2014; 12(1):35-42.

- Pereira EHL, Lehmann PA, Schvambach LJ, Reis RE. A new species of *Pareiorhaphis* (Siluriformes: Loricariidae) from the headwaters of the Arroio Garapiá, coastal drainage of Rio Grande do Sul state, Brazil. *Biotaxa*. 2015; 4034(3):556-564.
- Pereira EHL, Lehmann A, Reis RE. *Pareiorhaphis vetula*, a new armored catfish from the headwaters of the Rio Doce basin, Brazil (Siluriformes: Loricariidae). *Zootaxa*. 2016; 4144(3): 443-450.
- Pereira EHL, Pessali TC, Andrade F, Reis RE. Description of a new species of *Pareiorhaphis* (Loricariidae: Neoplecostominae) from the river Jequitinhonha basin, Minas Gerais, eastern Brazil. *Neotrop Ichthyol*. 2017;15(3):1-10.
- Pereira EHL, Reis RE. Morphology-based phylogeny of the suckermouth armored catfishes, with emphasis on the Neoplecostominae (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae). *Zootaxa*. 2017; 4264(1):01–104.
- Pereira EHL, Pessali TC, Reis RE. A New Species of *Pareiorhaphis* (Loricariidae: Neoplecostominae) from the Mucuri River Basin, Minas Gerais, Eastern Brazil. *Copeia*. 2018; 106(4):632-640.
- Piorski NM, Sanches A, Carvalho-Costa LF, Hatanaka T, Carrillo-Avila M, Freitas PD, Galetti Jr PM. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. *Braz. J. Biol*. 2008; 68(4):1039-1050.
- Ponzetto JM, Britzke R, Nielsen DTB, Parise-Maltempi PP, Alves AL. Phylogenetic relationships of *Simpsonichthys* subgenera (Cyprinodontiformes, Rivulidae), including a proposal for a new genus. *Zool Scri*. 2016; 45(4)394-406.
- Ponzetto JM, Alves AL, Varela ES, Vilela LCV, Caetano AR, Leonardez E. Molecular Phylogeny Inferred from the Concatenated Genes of Two Neotropical Catfish Species and Implications for Conservation. *J Phylogenetics Evol Biol*. 2017; 5(1):2-9.
- Porter ML, Dittmar K, Pérez-Losada M. how long does evolution of the troglomorphic form take? estimating divergence times in *Astyanax mexicanus*. *Acta Carsologica*. 2007; 36(1):173-182.
- Potter PE. The Mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South America: a natural history. *J South Am Earth Sci*. 1997; 10(5-6):331-344.
- Prizon AC, Bruschi DP, Borin-Carvalho LA, Cius A, Barbosa LM, Ruiz HB, Zawadzki CH, Fenocchio AS, Portela-Castro ALDB. Hidden Diversity in the Populations of the Armored Catfish *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Hypostominae) from the Paraná River Basin Revealed by Molecular and Cytogenetic Data. *Front Genet*. 2017; 185(8):1-13.
- Py-Daniel LHR, COX Fernandes C. Dimorfismo sexual em Siluriformes e Gymnotiformes (Ostariophysi) da Amazônia. *Acta Amaz*. 2005; 35(1):97-110.
- R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna; 2017.
- Rambaut A., Drummond A. Treeannotator v2.3.0. Edinburgh, UK: University of Edinburgh, Institute of Evolutionary Biology and Auckland, NZ: University of Auckland, Department of Computer Science; 2015.
- Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Syst Biol*. 2018; 67(5):901-904.
- 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.

- Reis RE. Unexpectedly high diversity in a small basin: A taxonomic revision of *Eurycheilichthys* (Siluriformes: Loricariidae), with descriptions of seven new species. *Neotrop Ichthyol.* 2017; 15(1): e160068[1]- e160068[28].
- 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. *Neotrop Ichthyol.* 2006; 4(2):225-246.
- Ribolli J1, Scaranto BM, Shibatta OA, Bombardelli RA, Zaniboni-Filho E. DNA barcoding confirms the occurrence of *Rhamdia branneri* and *Rhamdia voulezi* (Siluriformes: Heptapteridae) in the Iguaçu River Basin. *Neotrop Ichthyol.* 2017; 15(1):e160147[1]-e160147[8].
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck J. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Syst Biol.* 2012; 61(3):539-542.
- Roxo FF, Zawadzki CH, Alexandrou MA, Costa Silva GJ, Chiachio MC, Foresti F, Oliveira C. Evolutionary and biogeographic history of the subfamily Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Ecol. Evol.* 2012; 2(10):2438-2449.
- Roxo FF, Albert JS, Silva GSC, Zawadzki CH, Foresti F, Oliveira C. Molecular Phylogeny and biogeographic History of the Armored Neotropical Catfish Subfamilies Hypoptopomatinae, Neoplecostominae and Otothyriinae (Siluriformes: Loricariidae). *PLOS ONE.* 2014; 9(8):1-17.
- Roxo FF, Ochoa LE, Silva GSC, Oliveira C. *Rhinolekos capetinga*: a new cascudinho species (Loricariidae, Otothyriinae) from the rio Tocantins basin and comments on its ancestral dispersal route. *Zookeys.* 2015a; 481:109-130.
- Roxo FF, Ochoa LE, Silva GJC, Oliveira C. Species delimitation in *Neoplecostomus* (Siluriformes: Loricariidae) using morphologic and genetic approaches. *DNA Barcodes.* 2015b; 3:110-117.
- Schaefer SA. Osteology of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus), with a phylogenetic analysis of the loricariid subfamilies (Pisces: Siluroidei). *Contributions in Science of the Natural History Museum of Los Angeles County.* 1987; 394:1-31.
- SEMA, Secretaria do ambiente e desenvolvimento sustentável, editores. *Bacias hidrográficas do Rio Grande do Sul* [Internet]. Porto Alegre – RS; 2018 [citado em 26 de outubro de 2018]. Disponível em: <http://www.sema.rs.gov.br>.
- Souza-Shibatta L, Tonini JFR, Abrahão VP, Jarduli LR, Oliveira CO, Malabarba LR, Sofia SH, Shibatta OA. Reappraisal of the systematics of *Microglanis cottoides* (Siluriformes, Pseudopimelodidae), a catfish from southern Brazil. 2018. *PLOS ONE*; 13(7):1-20.
- Shimabukuro-Dias CK, Costa Silva GJD, Ashikaga FY, Foresti F, Oliveira C. Molecular identification of the fish fauna from the pantanal flood plain area in Brazil. *Mitochondrial DNA A.* 2016. 28(4):588-592.
- Silva CCF, da Matta SLSF, Hilsdorf AWS, Langeani F, Marceniuk AP. Color pattern variation in *Trichomycterus iheringi* (Eigenmann, 1917) (Siluriformes: Trichomycteridae) from rio Itatinga and rio Claro, São Paulo, Brazil. *Neotrop Ichthyol.* 2010; 8(1):49-56.
- Silva GSC. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. *Estud. Biol., Ambiente Divers.* 2012; 34(83):157-163.
- Silva GSC, Roxo FF, Oliveira C. *Pareiorhina hyptiorhachis*, a new catfish species from Rio Paraíba do Sul basin, southeastern Brazil (Siluriformes, Loricariidae). *Zookeys.* 2013; 315:65-76.

- Silva GSC, Roxo FF, Ochoa LE, Oliveira C. Description of a new catfish genus (Siluriformes, Loricariidae) from the Tocantins River basin in central Brazil, with comments on the historical zoogeography of the new taxon. *Zookeys*. 2016; 598:129-157.
- Subburaj J, Barathkumar TR, Thangaraj M. Genetic Fitness and Bottleneck of Threadfin (Sea Catfish), *Arius arius* (Hamilton, 1822) in South Indian Coastline. *Proc Natl Acad Sci*. 2017; 87(3):815-825.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013; 30(12):2725-2759.
- Taylor WR, Van-Dyke GC. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybio*. 1985; 9(2):107-11.
- Vasconcelos 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. *J Genet Mol Bio*. 2008; 31(1):308-316.
- Villwock JA, Tomazelli LJ. Geologia Costeira do Rio Grande do Sul. *Notas Técnicas do CECO-IG-UFRGS, Porto Alegre*. 1995; 8:1-45.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2005; 360:1847-1857.
- Ward RD, Hanner R, Hebert PDN. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *J Fish Biol*. 2009; 74(2):329-356.
- Will KW, Mishler BD, Wheeler QD. The Perils of DNA Barcoding and the Need for Integrative Taxonomy. *Syst Biol*. 2005; 54(1):844-851.
- Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*. 1965; 19:395-420.
- Yeates DK, Seago A, Nelson L, Cameron SL, Joseph L, Trueman JWH. Integrative taxonomy, or iterative taxonomy? *Syst Entomol*. 2011; 36(2):209-217.
- Zhang J, Kapli P, Pavlidis P, Stamatakis A. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*. 2013; 29(22):2869-2876.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br