

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

SELMA TORRES SIRIANI

**Análise molecular de *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes) do rio Piquiri, na
bacia do alto rio Paraná, e do rio Turvo Sujo, na bacia do rio Doce**

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2009

SELMA TORRES SIRIANI

**Análise molecular de *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes) do rio Piquiri, na
bacia do alto rio Paraná, e do rio Turvo Sujo, na bacia do rio Doce**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramentos, para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2009

A todos os que buscam com confiança em Deus a realização de seus ideais.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte inesgotável de vida e de luz. A Ele tudo eu devo.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (pgm), pela oportunidade de realização do Curso.

À Fundação Araucária, pela concessão de bolsa de estudos, possibilitando o desenvolvimento das pesquisas.

Ao meu orientador, professor doutor Alberto José Prioli, pela dedicada orientação.

À professora doutora Sônia Maria Alves Pinto Prioli, pelo incentivo e pela valiosa colaboração.

À minha família, por fazer parte de todas as minhas lutas, minhas vitórias, minhas derrotas, enfim, por compartilhar todos os meus momentos.

Ao Thiago Cintra Maniglia, amigo inesquecível.

À equipe do Laboratório de Genética do Nupélia, pela colaboração no desenvolvimento dos experimentos.

A todos os amigos e inimigos que participaram de minha trajetória. Com certeza, cada um deles, de alguma maneira, colaborou com minhas conquistas.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Ordem Gymnotiformes	3
2.2. A família Gymnotidae e o gênero <i>Gymnotus</i>	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS	6
3.1. Material biológico e locais de coleta	6
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
5. CONCLUSÃO	13
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14

RESUMO

SIRIANI, Selma Torres, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2009. **Análise molecular de *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes) do rio Piquiri, na bacia do alto rio Paraná, e do rio Turvo Sujo, na bacia do rio Doce.** Professor orientador: Alberto José Prioli. Coorientadores: Horácio Ferreira Júlio Júnior e Sônia Maria Alves Pinto Prioli.

O gênero *Gymnotus* tem ampla distribuição na região neotropical. Depois de mais de dois séculos de estabilidade taxonômica, *Gymnotus carapo* foi redescrita em várias outras espécies. Ainda assim, muitas dúvidas permanecem quanto à validade de muitas espécies consideradas válidas. Neste trabalho foi feita a caracterização molecular das espécies *Gymnotus paraguensis*, *Gymnotus sylvius* e *Gymnotus pantanal*, além da comparação com algumas linhagens genéticas de *Gymnotus* da bacia do rio Doce. Avaliou-se a variabilidade genética por análise da região *ATPase 6/8* do mtDNA e ampliou-se a avaliação do grau da diversidade nucleotídica encontrada entre os grupos. A diversidade nucleotídica e as árvores construídas com o modelo TrN+I demonstraram a diferenciação genética entre as espécies *G. paraguensis*, *G. sylvius* e *G. pantanal* e a linhagem genética da bacia do rio Doce. Os resultados mostram que há necessidade de avaliações adicionais, tanto genéticas quanto taxonômicas, da linhagem de *Gymnotus* da bacia do rio Doce.

Palavras-chave: Caracterização molecular, *Gymnotus*, diversidade nucleotídica.

ABSTRACT

SIRIANI, Selma Torres, M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, february, 2009. **Molecular analysis of *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes) of the Piquiri River, from the upper Paraná River basin, and of the TurvoSujo River, from the Doce River basin.** Adviser: Alberto José Prioli. Committee Members: Horácio Ferreira Júlio Júnior and Sônia Maria Alves Pinto Prioli.

The *Gymnotus* genre has wide distribution in the Neo-tropical region. After more than two centuries of taxonomic stability, *Gymnotus carapo* (banded knifefish) was re-described in several other species. However, many questions remain about the validity of many species considered valid. In this work, the molecular characterization of *Gymnotus paraguensis*, *Gymnotus sylvius* and *Gymnotus pantanal* species was done, as well as the comparison with some genetic strains of *Gymnotus* from the basin of the Doce River. We evaluated the genetic variability by analyzing the *ATPase 6/8* region of mtDNA and the evaluation of the nucleotide diversity level found among the groups was expanded. The Nucleotide diversity and the built trees with TRN + I model demonstrated the genetic differentiation among the *G. paraguensis*, *G. sylvius* and *G. pantanals* pecies and the genetic lineage from the basin of the Doce River. The results show that there is a need for further evaluation of the *Gymnotus* lineage from the basin of the Doce River, both genetic and taxonomic.

Keywords: Molecular characterization, *Gymnotus*. nucleotide diversity.

1. INTRODUÇÃO

Os peixes elétricos neotropicais pertencem à ordem Gymnotiformes. As 31 espécies desta ordem estão agrupadas em seis famílias. A distribuição dos Gymnotiformes é ampla nas Américas, ocorrendo desde a Argentina até o México (Maggo-Leccia, 1994). A família Gymnotidae possui apenas o gênero *Gymnotus* Linnaeus, 1758, que está disseminado na América do Sul e América Central (Albert, 2001).

Na bacia do alto rio Paraná, coexistem quatro espécies de *Gymnotus*, conforme relatado por Graça e Pavanelli (2007) e Margarido et al. (2007). As espécies *G. paraguensis* e *G. sylvius* ocorrem naturalmente no alto rio Paraná e *G. pantanal* seria uma espécie invasora. Graça e Pavanelli (2007) relatam que não há elementos que comprovem a ocorrência natural ou a condição de invasora de *G. inaequilabiatus*. Segundo os autores, *G. pantanal* e *G. inaequilabiatus* poderiam ter colonizado o alto rio Paraná após a formação do reservatório de Itaipu e submersão dos saltos de Sete Quedas. O barramento do rio Paraná acrescentou ao alto rio Paraná cerca de 150 km do médio rio Paraná. Muitas espécies que não ocorriam acima de Sete Quedas tiveram oportunidade de se estabelecer. Uma segunda hipótese seria a transferência por pescadores que se utilizam de iscas vivas.

Carl Linnaeus descreveu *Gymnotus carapo*, no século XVIII, e poucas espécies foram acrescentadas ao gênero até o final do século XX. Em 1994, apenas nove espécies de *Gymnotus* eram reconhecidas como válidas. Houve um grande incremento na descoberta da diversidade desse gênero entre 1994 e 2005. Apesar desse progresso no conhecimento de *Gymnotus*, são freqüentes os problemas taxonômicos ainda encontrados (Albert, 2001; Albert et al., 1999; Albert et al., 2003; Fernandes-Matioli et al., 2000; Fernandes et al., 2005).

Questões dessa natureza têm sido abordadas com metodologias moleculares, baseadas em sequências de DNA (Hubert et al. (2008). Portanto, há necessidade de avanços no conhecimento das espécies de *Gymnotus* para melhor caracterização e identificação segura dos espécimes. Várias regiões do DNA mitocondrial são utilizadas para estudos populacionais. Alguns setores da molécula do mtDNA são mais adequadas para avaliação de espécies próximas. A

região controle D-Loop e os genes *ATPase 6* e *ATPase 8*, comumente referidos como *ATPase 6/8*, estão entre os mais utilizados para este propósito (Meyer,1994).

A região mitocondrial *ATPase 6/8* também têm por característica acumular substituições nucleotídicas, que permitem detectar variações genéticas entre espécies, ou até mesmo entre populações de uma mesma espécie (Bermingham e Martin 1998, Machordon e Doadrio, 2001, Perdices e Doadrio 2001; Wong et al., 2004). Apesar de ser uma região codificadora, a taxa de substituição nucleotídica da região que compreende esses genes é comparável ou, até mesmo em alguns casos, superior a da região controle (*D-loop*), considerada a porção mais variável do mtDNA (Froufe et al., 2005; Faulks et al., 2008).

Neste trabalho, foi realizada a caracterização molecular de três espécies de *Gymnotus*, que atualmente coexistem na bacia do alto rio Paraná (*G. paraguensis*, *G. sylvius* e *G. pantanal*), além de terem sido feitas comparações com linhagens genéticas da bacia do rio Doce. A variabilidade genética foi avaliada pela análise de sequências nucleotídicas da região *ATPase 6/8* do mtDNA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Durante séculos, as investigações em biologia contaram, principalmente, com abordagens baseadas na morfologia, por absoluta ausência de conhecimentos e tecnologia. Com o desenvolvimento da física e da química, foi possível implementar metodologias de maior resolução e ampliar o horizonte do conhecimento biológico, com análises de microscopia e fisiologia/bioquímica, por exemplo.

A taxonomia e a sistemática também se beneficiaram desses avanços. Na década de 60, foram desenvolvidas metodologias de análise filogenética. Ao mesmo tempo, iniciou-se a utilização de isoenzimas no estabelecimento das relações de parentesco entre indivíduos e espécies (Hillis et al., 1996). Nos anos 80 e 90, foram desenvolvidas técnicas baseadas em fragmentos e em sequências de DNA, que foram empregadas intensivamente na análise da diversidade genética dos organismos. Evidentemente, todo esse progresso científico atingiu também as pesquisas de peixes em todo o mundo, incluindo os peixes neotropicais. Inicialmente a citogenética e, mais recentemente, a biologia molecular têm impulsionado de forma vigorosa o conhecimento dos grupos e relações entre grupos de peixes neotropicais, com reflexos em sua sistemática (Awise, 2004; Hillis et al., 1996; Nei e Kumar, 2000).

2.1. Ordem Gymnotiformes

Os representantes da ordem Gymnotiformes são de peixes de água doce da região neotropical. As espécies desta ordem estão amplamente distribuídas na região Neotropical, ocorrendo desde a Argentina até o México. São predadores noturnos encontrados da Argentina até o México. As 31 espécies compõem as famílias Apterontidae, Eletrophoridae, Gymnotidae, Hypoponidae, Rhamphichthyidae e Sternopygidae (Maggo-Leccia, 1994).

As adaptações desenvolvidas ao longo da evolução tornam os Gymnotiformes altamente diferenciados em relação aos outros grupos de peixes. O corpo é alongado e comprimido, semelhante a uma faca. Os membros desse grupo não possuem nadadeira dorsal e pélvica e têm a nadadeira anal muito

longa (Maggo-Leccia, 1994). Uma característica dos Gymnotiformes é a presença de órgãos eletrogênicos, que lhes conferem a capacidade de emissão de campos elétricos; e a de órgãos eletrorreceptores, que permitem a detecção de sinais elétricos. A emissão/recepção de pulsos elétricos têm função na comunicação, eletrolocalização e orientação no escuro e em águas turvas (Crampton e Albert, 2006). As descargas elétricas dos Gymnotiformes são fracas, não passando de milivolts. No entanto, a espécie *Electrophorus electricus*, conhecido como poraquê e outros nomes populares, pode originar descargas de 600 V (Hopkins, 2009).

2.2. A família Gymnotidae e o gênero *Gymnotus*

A família Gymnotidae possui apenas o gênero *Gymnotus* Linnaeus, 1758. Por outro lado, entre os Gymnotiformes, Gymnotidae é a família com a maior distribuição geográfica, sendo encontradas de 18° N até 36° S. Na América do Sul, só não é encontrado no Chile e na América Central não ocorre em Belize (Albert, 2001; Reis et al., 2003).

Algumas adaptações pouco comuns em peixes são encontradas entre as espécies de *Gymnotus*. Como possuem respiração aérea acessória, podem ser encontradas em ambientes em que a maioria das espécies não sobrevivem (Liem et al., 1984). Essa capacidade de sobrevivência em ambientes praticamente anóxicos torna os Gymnotídeos atrativos para uso como isca viva na pesca esportiva, pois podem sobreviver por longos períodos em recipientes de pequeno porte. Como todos os Gymnotiformes, os Gymnotídeos possuem a capacidade de descargas elétricas (Sierra et al., 2005). Essas descargas elétricas têm sido muito estudadas em *Gymnotus*, tanto enfocando a formação de imagens eletrosensoriais (Caputti et al., 2003) quanto objetivando elucidar a comunicação por eletrolocação no escuro (Schuster, 2002; Schuster e Otto, 2002).

Apesar da ocorrência freqüente, as espécies de *Gymnotus* não integram o grupo utilizado em grande escala na alimentação humana. Contudo, são consideradas importantes integrantes intermediários da cadeia alimentar. São predadores noturnos agressivos e eficientes de peixes e outros animais aquáticos e, ao mesmo tempo, são presas de peixes maiores (Fernandes-Matioli, et al., 1997). Muitas espécies são territorialistas e os machos de várias espécies de

Gymnotus constroem e guardam os ninhos. Os ninhos podem ser construídos em depressões ou em raízes de macrófitas aquáticas (Crampton e Hopkins, 2005).

Algumas espécies de *Gymnotus* são encontradas na região central e sudeste do Brasil. *Gymnotus Inaequilabratu*s (Valenciennes 1847) é proveniente da bacia Paraná/Paraguai e algumas drenagens costeiras do Uruguai e sudeste do Brasil. A espécie *G. sylvius* (Albert et al., 1999) é nativa de drenagens costeiras do estado de São Paulo e bacia do rio Paraná. A espécie *Gymnotus paraguensis* (Albert e Crampton, 2003) é encontrada na bacia Paraná/Paraguai, enquanto *G. pantanal* (Fernandes et al., 2005) é do sistema Paraná/Paraguai e rio Chaparé/Mamoré da Bolívia.

Após um período prolífico de estudos de *Gymnotus*, atualmente, estão descritas e reconhecidas como válidas, pelo menos, 33 espécies de *Gymnotus*. Além disso, muitas espécies ainda estão sendo formalmente redescritas, com a resolução de muitas questões taxonômicas (Albert et al., 1999; Fernandes-Matioli et al., 2000; Crampton e Albert, 2006; Crampton et al., 2005).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material biológico e locais de coleta

Indivíduos do gênero *Gymnotus* foram coletados no bairro rural de Barrinha, município de Viçosa (MG). Foi realizada uma coleta no rio Turvo Sujo (Figura 01), pertencente à bacia do rio Doce, e uma coleta no rio Piquiri (Figura 03).

Indivíduos do gênero *Gymnotus* foram coletados no bairro rural de Barrinha, município de Viçosa (MG). Foi realizada uma coleta no rio Turvo Sujo (Figura 01), pertencente à bacia do rio Doce, e uma coleta no rio Piquiri (Figura 02). As localizações geográficas aproximadas dos pontos de coleta são 20° 44´S - 42° 45´ W, na bacia do rio Doce; e 24° 20´S - 53° 16´W, na bacia do rio Piquiri. Os indivíduos, assim que foram coletados, tiveram amostras do tecido muscular retiradas. Para sua preservação, os setores de tecido muscular retirados foram fixados em álcool etílico comercial, alojados em laboratório e mantidos a -20°C. Foram analisados três indivíduos do rio Turvo Sujo e oito do rio Piquiri.

O DNA total foi extraído com base no método fenol-clorofórmio, conforme Sambrook et al. (1989), com algumas modificações. Após a extração, o DNA foi quantificado, em gel de agarose 0,8%, por comparação com DNA do fago λ de concentração de 25, 50 e 100 ng. As amostras de DNA, após a extração, foram armazenadas em freezer a -4°C.

A seqüência *ATPase 6/8* e parte dos genes *tRNA^{Lys}* e *COIII* foram amplificados via PCR com as mesmas condições de amplificação proposta por Prioli et al. (2002). Os padrões de temperatura de amplificação foram os seguintes: um ciclo inicial de 94 °C, por quatro minutos, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 59 °C e dois minutos a 72 °C, finalizando com um ciclo de 10 minutos, a 72 °C. A amplificação foi confirmada em eletroforese em gel de agarose 1% por comparação com quantidades conhecidas de DNA *ladder* 100 bp (Invitrogen). O par de *primers* utilizados para a amplificação foi o L8331 (5'-AAAGCRTYRGCCTTTTAAGC-3') e H9236 (5'-GTTAGTGGTCAKGGGCTTG-GRTC-3').

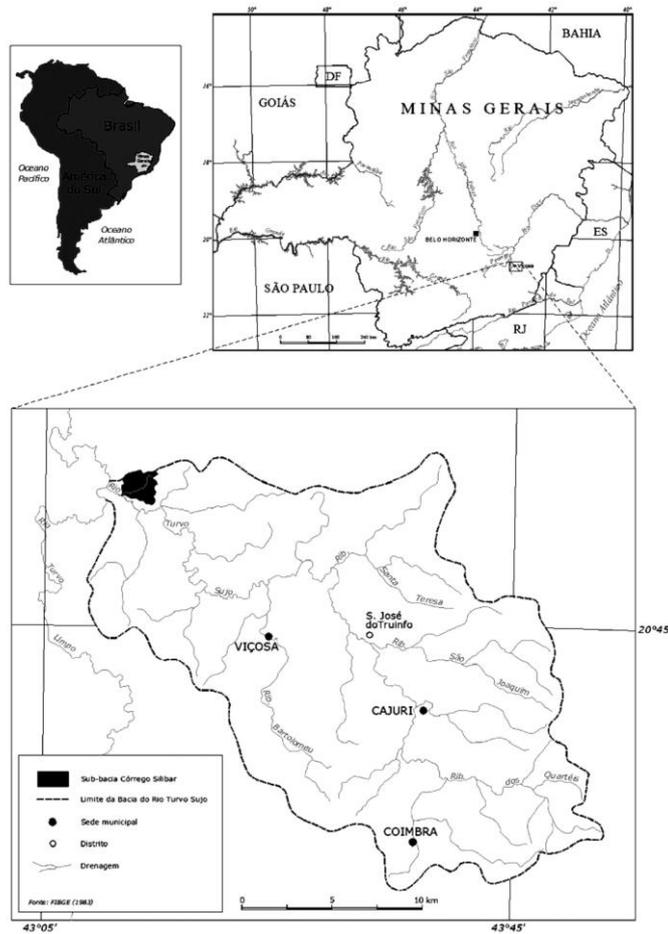


Figura 01 - Local de coleta de *Gymnotus* no Rio Turvo Sujo.



Figura 02- Local de coleta de *Gymnotus* no Rio Piquiri.

Após a amplificação o fragmento, foi novamente amplificado com o primer L8331 para a reação de seqüenciamento. Aproximadamente, 50 ng de DNA de cada reação foram utilizados diretamente em reações de seqüenciamento em seqüenciador automático MegaBace (Amersham), seguindo instruções do fabricante.

As seqüências foram alinhadas com o programa Clustal W (Amersham) e editadas com o programa Bioedit (Hall, 1999). A partir das comparações entre os pares, foram realizadas as análises filogenéticas. Pontos de deleções ou inserções (indels) nas seqüências alinhadas de DNA não foram incluídos nas análises, seguindo o consenso de que não existe nenhum modelo apropriado para os mecanismos evolucionários que os produzem (Nei e Kumar, 2000). A escolha do modelo evolutivo, utilizando-se os procedimentos *Akaike Information Criterion* corrigido (AICc) e *Bayesian Information Criterion* (BIC), foi realizada com os programas Paup 4.0b4 (Swofford, 2002) e Modeltest 3.0 (Posada & Crandall 1998). A matriz de diversidade nucleotídica e os dendrogramas neighbor-joining e Máxima Verossimilhança foram construídos com o programa Paup 4.0b4. O índice de fixação molecular (F_{ST}) foi calculado com o programa Arlequin 3.11 (Excoffier et al., 2005).

Com o intuito de ampliar a avaliação do grau da diversidade nucleotídica encontrado entre os grupos estudados nesse trabalho, foi feita uma seleção de todas as seqüências *ATPase 6/8* para os gêneros de Characiformes que possuem seqüências de pelo menos duas espécies disponíveis no GenBank, para obtenção das distâncias genéticas entre espécies do mesmo gênero. A diversidade nucleotídica entre as espécies foram calculadas com o mesmo modelo evolutivo e a mesma seqüência *ATPase 6/8* utilizada nas análises para *Gymnotus*. O programa Statistica 7.1 foi utilizado para construção do gráfico de barras das médias das diversidades nucleotídicas das espécies obtidas no GenBank e os exemplares de *Gymnotus*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação da seqüência *ATPase 6/8* produziu um fragmento de aproximadamente 1000 pares de base (pb) (Figura 03). Entretanto, após a edição das seqüências, foi obtido um fragmento parcial de 384 pb para todos os indivíduos. Esse fragmento corresponde a uma seqüência de 128 aminoácidos. Foram observados 60 pontos de substituições nucleotídicas, o qual resultou em 29 substituições de aminoácidos. Dentre as substituições nucleotídicas, 24 foram exclusivas dos exemplares de *G. paraguensis*, cinco dos exemplares de *G. sylvius*, nove para *G. pantanal* e seis para os exemplares de *Gymnotus sp.* de Viçosa.

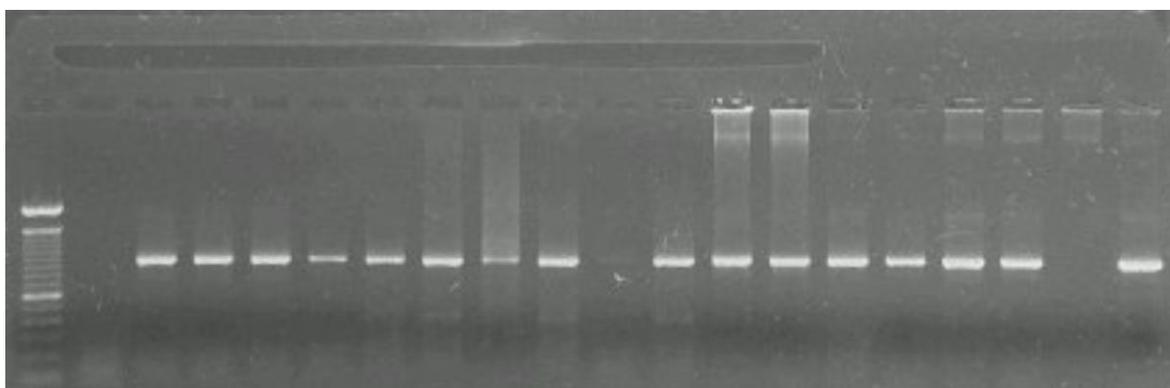


Figura 03 - Gel de agarose. Fragmentos de segmentos *ATPase 6/8*, amplificados com o par de *primers* L8331 e H9236, para os exemplares de *Gymnotus*.

A freqüência nucleotídicas foi de: A = 0,3073, C = 0,2985, G = 0,0853 e T = 0,3089. A taxa de transição/transversão foi de 3,076. A proporção de sítios invariáveis foi de 0,4818 e o NST = 6. Dessa forma, o modelo evolutivo selecionado a partir de uma análise de máxima verossimilhança foi o TrN+I.

O Quadro 01 contém os valores das médias das diversidades nucleotídicas calculadas com o modelo TrN+I, entre as quatro espécies de *Gymnotus* e o grupo externo *Bryconamericus emperador*. O maior valor de diversidade nucleotídica intra-específica foi observado para *G. pantanal* e a menor para *Gymnotus sp.* Os valores de diversidade interespecífica para as espécies de *Gymnotus* variaram de 0,045 e 0,11, entre as espécies *G. sylvius* e *Gymnotus sp.*

e *G. pantanal* e *G. paraguensis*, respectivamente. Os valores de distância genética entre *Gymnotus sp.* e as demais espécies de *Gymnotus* não permitiram classificar esta espécie em nenhuma outra estudada, ficando impossível identificar especificamente esta espécie.

As médias das diversidades nucleotídicas das quatro espécies de *Gymnotus* e das espécies disponíveis no GenBank estão representadas na figura 04. É possível observar que a média da distância genética entre as quatro espécies de *Gymnotus* é semelhante à media das distâncias genéticas das espécies disponíveis no GenBank.

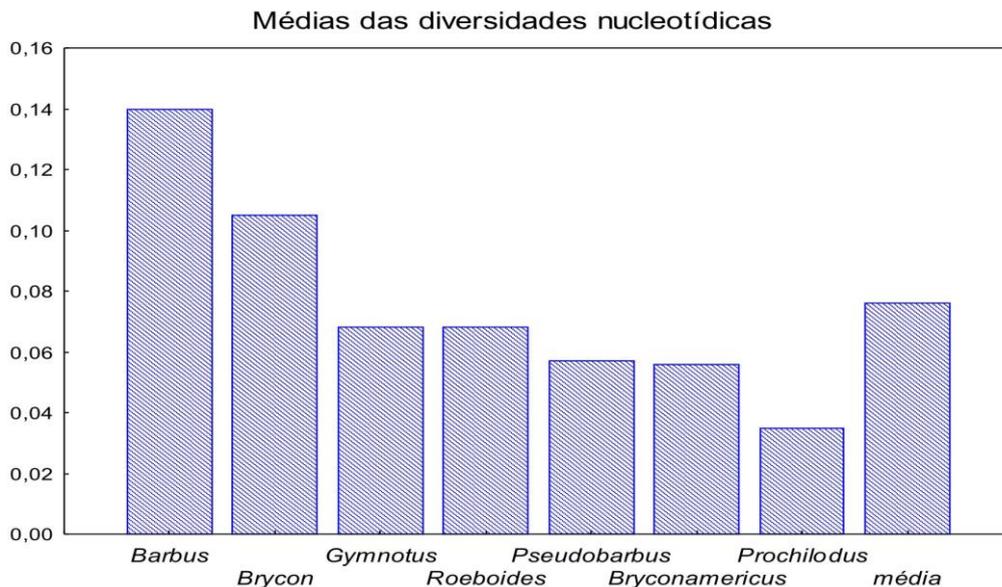


Figura 04 - Valores médios das diversidades nucleotídicas, calculados com o modelo HKY+G a partir do fragmento parcial de 384 pb de seqüências *ATPase 6/8* para diferentes espécies dos gêneros *Barbus*, *Brycon*, *Gymnotus*, *Roeboides*, *Pseudobarbus* e *Prochilodus*, calculados com o modelo TrN+I.

Os agrupamentos Neighbor-Joining e Máxima Verossimilhança confirmaram a discriminação genética entre as três espécies e a linhagem genética da bacia do rio Doce (Figura 05). Os resultados demonstraram que a espécie *G. paraguensis* é a mais basal e as outras duas espécies e a linhagem do rio Doce formam outro agrupamento. Os altos valores de *bootstrap* conferem consistência a esses agrupamentos. A linhagem genética do rio Doce não está associada intimamente a nenhuma das espécies avaliadas, mas está geneticamente mais próxima de *G. sylvius*.

Quadro 01 - Matriz das médias das diversidades nucleotídicas calculadas com o modelo TrN+I, entre as quatro espécies de *Gymnotus* e o grupo externo *Bryconamericus emperador*, a partir do fragmento parcial de 384 pb de seqüência *ATPase 6/8*

	<i>G. sylvius</i>	<i>G. pantanal</i>	<i>G. paraguensis</i>	<i>Gymnotus</i> sp. VC
<i>G. sylvius</i>	0,008			
<i>G. pantanal</i>	0,067	0,016		
<i>G. paraguensis</i>	0,100	0,110	0,008	
<i>Gymnotus</i> sp. VC	0,045	0,062	0,102	0,003
<i>Outgroup</i>	0,393	0,385	0,415	0,390

O valor do índice de fixação molecular F_{st} entre os quatro grupos de *Gymnotus* foi de 0,882. Este valor indica que 88,2% da diversidade genética foram encontradas entre indivíduos de espécies diferentes e apenas 11,8% entre indivíduos de uma mesma espécie, demonstrando, dessa forma, a diferenciação genética entre as espécies de *Gymnotus* estudadas neste trabalho.

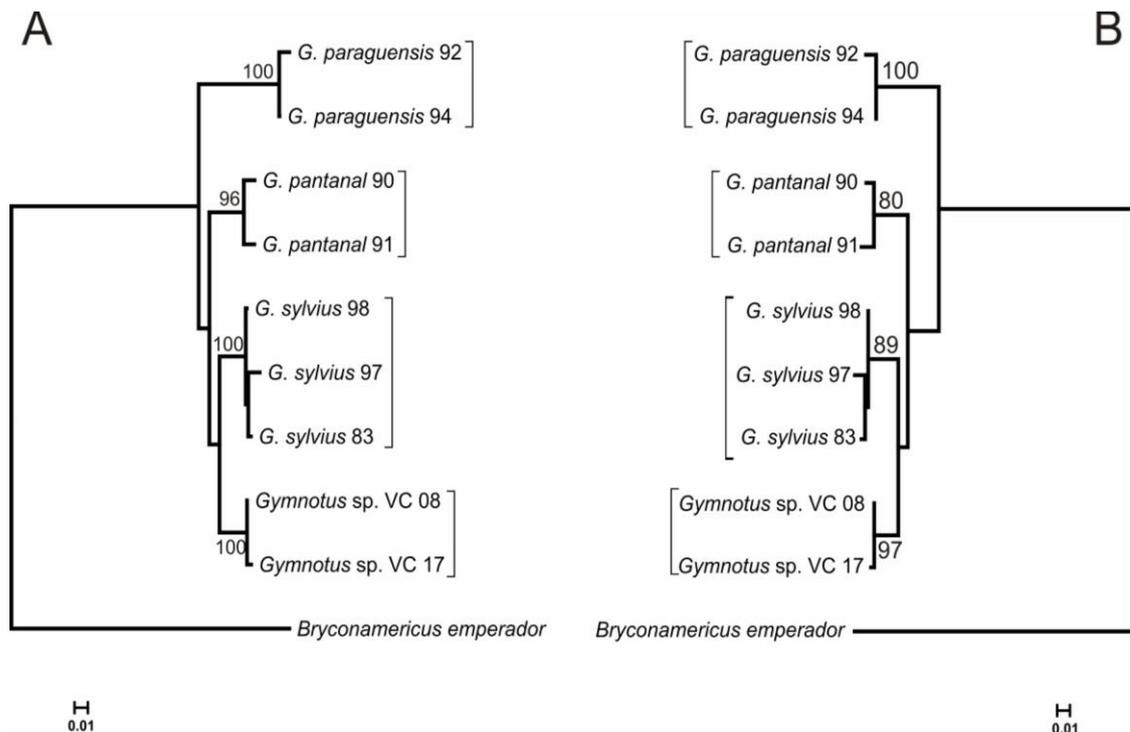


Figura 05 - Dendrogramas Neighbor-Joining (A) e Máxima Verossimilhança (B), construídos com o modelo TrN+I, a partir de seqüências nucleotídicas de seqüências *ATPase 6/8* de indivíduos de *Gymnotus*. Um indivíduo *Bryconamericus emperador* foi incluído na análise como grupo externo. As análises de *bootstrap* foram baseadas em 10.000 reamostragens.

Portanto, os resultados evidenciam que há necessidade de análises adicionais da condição taxonômica da linhagem genética de *Gymnotus* presente na bacia do rio Doce. A linhagem do rio Doce difere das outras espécies em magnitude usualmente encontrada entre espécies diferentes. É possível que análises morfológicas detalhadas sustentem a descrição de uma nova espécie de *Gymnotus*.

5. CONCLUSÃO

Ficou evidenciado que a região mitocondrial *ATPase 6/8* é eficiente na detecção da diversidade genética entre espécies próximas de peixes, inclusive quando apenas caracteres morfológicos não são suficientes para correta identificação. Na bacia do rio Doce, ocorre uma linhagem genética de *Gymnotus* com diferenças compatíveis com diferenças interespecíficas. Provavelmente, análises complementares darão suporte para a descrição de uma nova espécie de *Gymnotus* na bacia do rio Doce.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, J.S. Species diversity and phylogenetic systematics of American knifefishes (Gymnotiformes, Teleostei). **Museum of Zoology of University of Michigan**, 190:1-127, 2001.

ALBERT, J.S.; FERNANDES-MATIOLI, F.M.C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. A New species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Teleostei) from Southeastern Brazil: Towards the deconstruction of *Gymnotus carapo*. **Copeia**, 1:410-421, 1999.

ALBERT, J.S.; CRAMPTON, W.G.; THORSEN, D.H.; LOVEJOY, N.R. Phylogenetic systematics and historical biogeography of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotidae). **Systematic and Biodiversity**, 2:375-417, 2003.

AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history, and evolution**. Sunderland: Sinauer Associates, 2004. 684p.

BERMINGHAM, E.; MARTIN, A.P. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. **Molecular Ecology**, 7:499-517, 1998.

CAPUTTI, A.A.; AGUILERA, P.A.; CASTELLO, M.E. Probability and amplitude of novelty responses as a function of the change in contrast of the reafferent image of *G. carapo*. **Journal of Experimental Biology**, 206:999-1010, 2003.

CRAMPTON, W.G.R.; THORSEN, D.H.; ALBERT, J.S. Three new species from a diverse sympatric assemblage of *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) in the lowland Amazon basin, with notes on ecology. **Copeia**, 2005:82-89, 2005.

CRAMPTON, W.G.R.; ALBERT, J.S. Evolution of electric signal diversity in gymnotiform fishes. In: LADICH, F.; COLLIN, S.P.; MOLLER, P.; KAPOOR, B.G. (eds). **Communication in fishes**. Enfield: Science Publishers Inc., 2006. p. 641-725.

CRAMPTON, W.G.R.; HOPKINS, C.D. Nesting and parental care in the weakly electric fish *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) with descriptions of larval and adult electric organ discharges of two species. **Copeia**, 1:48-60, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, 1:47–50, 2005.

FERNANDES-MATIOLI, F.M.C.; ALMEIDA-TOLLEDO, L.F.; Toledo-FILHO, S.A. Extensive nucleolus Organizer Regions polymorphism in *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotidae). **Cell Genetic**, 78:236-239, 1997.

FERNANDES-MATIOLI, F.M.C.; MATIOLI, S.R.; ALMEIDA-TOLLEDO, L.F. Species diversity and geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes) by nuclear (GGAC)_n microsatellite analysis. **Genetics and Molecular Biology**, 23:803-807, 2000.

FERNANDES, F.M.C.; ALBERT, J.S.; DANIEL-SILVA, M.F.Z; LOPES, C.; CRAMPTON, W.G.R.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. A new *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotiformes: Gymnotidae) from the Pantanal Matogrossense of Brazil and adjacent drainages: continued documentation of a cryptic fauna. **Zootaxa**, 933:1-14, 2005.

FAULKS, L.K.; GILLIGAN, D.M.; BEHEREGARAY, L.B. Phylogeography of a threatened freshwater fish (*Mogurnda adspersa*) in eastern Australia: conservation implications. **Marine and Freshwater Research**, 59:89–96, 2008.

FROUFE, E.; ALEKSEYEV, S.; KNIZHIN, I.; WEISS, S. Comparative mtDNA sequence (control region, *ATPase 6* and *NADH-1*) divergence in *Hucgo taimen* (*Pallas*) across four Siberian river basins. **Journal of Fish Biology**, 67:1040-1053, 2005.

GRAÇA, W.J.; Pavanelli, C.S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Maringá: Eduem, 2007. 241p.

- HALL, T.A. BioEdit: A User-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, 41:95-98, 1999.
- HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. **Molecular systematics**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1996. 655p.
- HOPKINS, C.D. Electrical perception and communication. **Encyclopedia of Neuroscience**, 3:813-831, 2009.
- HUBERT, N.; HANNER, R.; HOLM, E.; MANDRAK, N.E.; TAYLOR, E.; BURRIDGE, M.; WATKINSON, D.; DUMONT, P.; CURRY, A.; BENTZEN, P.; ZHANG, J.; APRIL, J.; BERNATCHEZ L. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. **PLoS ONE**, 3:e2490, 2008.
- LIEM, K.F.; ECLANCHER, B.; FINK, W.L. Aerial respiration in the banded knife fish *Gymnotus carapo* (Teleostei: Gymnotoidei). **Physiological Zoology**, 57:185-195, 1984.
- MACHORDOM, A.; DOADRIO, I. Evidence of a Cenozoic Betic-Kabilian connection based on freshwater fish phylogeography (*Luciobarbus*, Cyprinidae). **Journal of Heredity**, 93:140-147, 2001.
- MAGO LECCIA, F. Electric fishes of the continental waters of America. **Biblioteca de la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales**, XXIX:1-229, 1994.
- MACHORDOM, A.; DOADRIO, I. Evolutionary history and speciation modes in the cyprinid genus *Barbus*. **Proceedings of the Royal Society London B**, 268:1297-1306, 2001.
- MARGARIDO, V.P.; BELLAFRONTE, E.; MOREIRA-FILHO, O. 2007. Cytogenetic analysis of three sympatric *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) species verifies invasive species in the upper Paraná River basin, Brazil. **Journal of Fish Biology**, 70:155-164.

MEYER, A. DNA technology and phylogeny of fish. In: BEAUMONT, A.R. (ed.) **Genetics and evolution of aquatic organisms**. London: Chapman & Hall, 1994. p. 219-249.

NEY, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. New York: Oxford University Press, 2000. 333p.

PERDICES, A.; DOADRIO, I. The molecular systematics and biogeography of the european cobitids based on mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 19:468–478, 2001.

POSADA, D.; CRANDALL, K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, 14:817-818, 1998.

PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J.; JÚLIO JR, H.F.; PAVANELLI, C.S.; OLIVEIRA, A.V.; CARRER, H.; CARRARO, D.M.; PRIOLI, L.M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, 25:421-430, 2002.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: PUCRS, 2003. 742p.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. Laurel Hollow: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 626p.

SCHUSTER, S. Behavioral evidence for post-pause reduced responsiveness in the electrosensory system of *Gymnotus carapo*. **Journal of Experimental Biology**, 205:2525-2533, 2002.

SCHUSTER, S.; OTTO, N. Sensitivity to novel feedback at different phases of a Gymnotid electric organ discharge. **Journal of Experimental Biology**, 205:3307-3320, 2002.

SIERRA, F.; COMAS, V.; BUÑO, W.; MACADAR, O. Sodium-dependent plateau potentials in electrocytes of the electric fish *Gymnotus carapo*. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, 191:1-11, 2005.

SWOFFORD, D.L. **Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)**. Version 4.0b10. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

WONG, B.B.M.; KEOGH, J.S.; JENNIONS, M.D. Mate recognition in a freshwater fish: geographical distance, genetic differentiation, and variation in female preference for local over foreign males. **Journal of Evolutionary Biology** 17:701-708. 2004.