

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE
AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS

LILIAN QUELI FERREIRA CARDOSO

Estudos morfológicos e moleculares em populações de *Piabina* Reinhardt
(Characidae, Stevardiinae) das bacias do alto rio Paraná e rio São
Francisco, incluindo a descrição de uma nova espécie

Maringá

2011

LILIAN QUELI FERREIRA CARDOSO

Estudos morfológicos e moleculares em populações de *Piabina* Reinhardt
(Characidae, Stevardiinae) das bacias do alto rio Paraná e rio São
Francisco, incluindo a descrição de uma nova espécie

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Área de concentração: Ciências Ambientais

Orientadora: Prof^a. Dr.^a Carla Simone Pavanelli

Coorientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli

Maringá
2011

"Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)"
(Biblioteca Setorial - UEM. Nupélia, Maringá, PR, Brasil)

C268e

Cardoso, Lilian Queli Ferreira, 1984-

Estudos morfológicos e moleculares em populações de *Piabina* Reinhardt (Characidae, Stevardiinae) das bacias do alto rio Paraná e rio São Francisco, incluindo a descrição de uma nova espécie / Lilian Queli Ferreira Cardoso. -- Maringá, 2011.

51 f. : il. (algumas color.).

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais)--
Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2011.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Carla Simone Pavanelli.

Coorientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli.

1. *Piabina* Reinhardt (Characidae, Stevardiinae) "piaba" - Taxonomia integrativa -
Sistemática molecular - Região Neotropical. I. Universidade Estadual de Maringá.
Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes
Aquáticos Continentais.

CDD 22. ed. -597.48012
NBR/CIP - 12899 AACR/2

*Dedico este trabalho à minha
família, em especial à minha filha,
Lavínia e meu marido Marcos*

FOLHA DE APROVAÇÃO

LILIAN QUELI FERREIRA CARDOSO

Estudos morfológicos e moleculares em populações de *Piabina* Reinhardt
(Characidae, Stevardiinae) das bacias do alto rio Paraná e rio São
Francisco, incluindo a descrição de uma nova espécie

COMISSÃO JULGADORA

Prof.^a Dr.^a Carla Simone Pavanelli
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Ricardo Cardoso Benine
UNESP, *campus* de Botucatu

Prof. Dr. Weferson Júnio da Graça
DBI/Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 29 de julho de 2011.

Local de defesa: Anfiteatro Prof. “Keshiyu Nakatani”, Nupélia, Bloco G-90,
campus da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTOS

A todos que direta ou indiretamente participaram na realização deste trabalho, especialmente:

A Deus, pela força e coragem que me impulsionaram a não desistir dos meus objetivos, humildade para aceitar os fatos vida, que não eram da minha vontade e sabedoria para fazer.

À Dra. Carla S. Pavanelli pela orientação, confiança, incentivo e apoio constante diante das eventualidades que me roubaram muito tempo... Sua conduta diante da minha difícil situação, com apoio e carinho, foram essenciais para que eu não desistisse, um grande exemplo de bondade e compreensão... A essa pessoa especial toda minha admiração e gratidão!

Ao Dr. Alberto José Prioli, pela co- orientação, incentivo e exemplo de entusiasmo e paixão pela ciência... Agradeço sua orientação didática, paciente e esclarecedora.

À Dra. Sônia Maria A. P. Prioli, pela amizade, momentos de descontração e ajuda nos trabalhos do laboratório.

Ao Dr. Weferson Junio da Graça, pelo auxílio na produção do projeto, na dissecação dos exemplares, pelas aulas grátis de filogenia, pela paciência quando o interrompia pela centésima vez com mais uma dúvida.

Às amigas:

Msc. Vivian Nunes Gomes, por ser minha 2^a co-orientadora em genética, pelos ensinamentos passo-a-passo no laboratório e nas análises, pelas valiosas sugestões, correções! E acima de tudo isso, continuar presente, mesmo estando longe!!!

Msc. Rafaela Ota, pelo companheirismo nas atividades do MUSEU, por ajudar a me situar no “estado da arte”, quando da minha entrada na taxonomia, pelo apoio, válidas sugestões e produtivas discussões ... A amizade de vocês foi fundamental para que eu não desistisse!!!

Aos amigos do museu, Alessandro Bifi, Carlos Oliveira, Cláudio Zawadzki, Dirceu Baumgartner, Gabriel Deprá, Rafaela Ota, Milena Monaco, Renata Ota, Weferson da Graça, Renata Dias, Nadayaca e Chico por ajudarem na catalogação do material utilizado, pelas válidas sugestões e companheirismo ao longo de todo o trabalho.

Ao Dr. Cláudio Zawadzki, pelas coletas de material adicional de **Piabina argentea** e **Piabina sp.**, da bacia do rio Paranaíba, rio Ivaí e Pirapó.

À Msc. Cecília Gontijo Leal, pelas inúmeras coletas e envio de material em álcool da bacia do rio São Francisco.

À Dra. Ana Maria Gealh, pelos bons exemplos, coleta dos tipos, pelas imagens e vídeos da localidade tipo e de espécimes recém coletados, que possibilitaram a descrição do colorido em vida.

Ao Dr. Cláudio de Oliveira e Ricardo Britzke pela doação de tecido de *Piabina anhembi*, para análise molecular.

Ao Victor Frana, pela coleta de *Piabina argentea* da bacia do rio Amambai.

Ao Carlos Oliveira, pela coleta de *Piabina argentea* em álcool do rio Itapetininga.

Ao Dr. Gilmar Baumgartner, Dr. Dirceu Baumgartner, Tiago Debona “Pardal”, e demais funcionários do Gerpel (Grupo de estudos em Limnologia e Recursos Pesqueiros), pelo apoio logístico, que possibilitou a análise de material em Toledo.

À Dra. Aparecida Fernandes, seus alunos e funcionários do COMCAP pela ajuda no sequenciamento.

Aos colegas do laboratório de genética de peixes, em especial, Thaís S. Bignotto, Thiago C. Maniglia, Thatiane R. Mota e Vivian Nunes Gomes, pelo companheirismo e ajuda nos trabalhos de laboratório.

Pelo empréstimo de material agradecemos Osvaldo Oyakawa, Mário de Pinna e José Lima de Figueiredo (MZUSP), Oscar Shibatta (MZUEL), Carlos e Margarete Lucena (MCP), Francisco Langeani (DZSJRP), e Cláudio Oliveira (LBP).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, pela oportunidade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, pelos ensinamentos.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ambientes Aquáticos Continentais, Aldenir C. Oliveira e Jocemara C. dos Santos, pela eficiência nas questões burocráticas requeridas durante o curso.

Ao Programa de Pesquisa Ecológica de Longa Duração (PELD-Site 6), pela experiência de campo proporcionada.

À Maria Salete R. Arita e João Fábio Hildebrandt, da biblioteca setorial do Núpelia, pelo auxílio prestado às necessidades literárias.

Aos funcionários do DBC, especialmente ao Donizete e à Maria José, pelo grande auxílio na parte técnica das análises moleculares.

A todos os funcionários do Nupélia, pela ajuda.

A todos os amigos e colegas do PEA.

Aos meus amigos Luíza, Karen, Rafaela, Tátia e Vivian (Bibian) pela amizade, apoio e ajuda incondicional. O mestrado não seria o mesmo sem vocês!

À minha eterna amiga Adriana Rempel por poder contar sempre com você!

Ao meu marido Marcos por me apoiar em todas as etapas do desenvolvimento do trabalho, cuidando com carinho de nossa filha, nos muitos dias em que estive ausente!

Aos meus familiares, por entender minha ausência, minha constante falta de tempo! Em especial à minha mãe (Maurezeni) por muitas vezes suportar sozinha dor, tristeza e desânimo para que eu pudesse me concentrar nos estudos! Ao meu irmão (Rafael) pela cumplicidade, força, ajuda nos cuidados com a mãe! Meus sogros (Maria e Augusto), e minhas cunhadas Marli e Márcia, pelo amor, carinho, compreensão e principalmente por cuidarem com tanto zelo e carinho de minha filha Lavínia!

À equipe do Jardim Zoobotânico de Toledo “Parque das Aves” Angélica, Célia, Bruno, Marcos e Evaldo pela amizade, apoio, por me suprirem nas minhas muitas idas a Maringá e cuidarem com zelo e carinho do plantel...

A toda equipe da Secretaria Municipal de Meio Ambiente, em especial a Karim, Lilian e Tânia, pelo apoio, por suprirem minha ausência e facilitarem a minha adaptação em Toledo.

À minha amiga homônima, Lilian Rigon, pelo carinho e amparo em Toledo.

Ao Secretário Municipal de Meio Ambiente, Delmar Marino Hoffmann, por permitir minhas compensações cumulativas, compreender minhas revoltas com o “sistema” e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.

A minha filha Lavínia por dar sentido à minha vida!

Estudos morfológicos e moleculares em populações de *Piabina* Reinhardt (Characidae, Stevardiinae) das bacias do alto rio Paraná e rio São Francisco, incluindo a descrição de uma nova espécie

RESUMO

As espécies do gênero *Piabina* Reinhardt (1867) das bacias do alto rio Paraná e São Francisco foram caracterizadas molecularmente pela sequência do citocromo *c* oxidase subunidade I (COI) e analisadas taxonômica e filogeneticamente. A análise molecular resultou na formação de três clados distintos: clado A (*Piabina anhemi*, sub-bacia do rio Tietê), clado B (*Piabina argentea*, bacia do rio São Francisco e alto rio Paraná) e clado C (*Piabina sp. n.*, bacia do alto rio Paraná). As populações de *P. argentea* da bacia do alto rio Paraná e São Francisco compartilharam o mesmo haplótipo. *Piabina anhemi*, espécie endêmica das cabeceiras do rio Tietê, apresentou haplótipo distinto das demais, porém, como só houve um indivíduo sequenciado, o polimorfismo intra-específico não foi analisado. Uma nova espécie das drenagens dos rios Ivaí, Pirapó e Pitangui, bacia do alto rio Paraná foi descoberta. A nova espécie, aqui descrita, apresentou amplo polimorfismo intra-específico, observado pela formação de nove haplótipos na população estudada. As distâncias genéticas interespecíficas variaram de 3,0 a 6,7%, sendo 6,7% entre *Piabina sp. n.* e *P. anhemi* juntamente com *P. argentea*, e 3,0% entre *P. anhemi* e *P. argentea*. A análise filogenética demonstrou que *Piabina sp. n.* apresenta as duas sinapomorfias congruentes com a hipótese de monofiletismo do gênero. A grande maioria dos 57 caracteres analisados encontram-se no mesmo estado de *P. argentea* e *P. anhemi*. Os caracteres: 19 (ângulo-articular horizontalmente encurtado), 29 (porção anterior do canal látero-sensorial no primeiro infraorbital alcançando ou estendendo-se além da margem anterior do corpo principal da ossificação), 30 (porção posterior do primeiro infraorbital sobrepondo-se à porção anterior do segundo infraorbital), 34 (dentição do terceiro infra-faringobranquial presente) e 55 (presença de duas epurais) foram divergentes. A nova espécie aqui descrita pode ser facilmente diferenciada de suas congêneres pela combinação dos seguintes caracteres: dente anterior da tríade parcialmente inserido entre o primeiro e o segundo dente da primeira série (vs. dente anterior da tríade não inserido no espaço entre o primeiro e segundo dente da primeira série), maior porcentagem da distância da origem da nadadeira dorsal à origem da nadadeira anal em relação ao comprimento padrão (31,1-35,3 vs. 26,6-28,9 e 24,7-32,8 em *P. anhemi* e *P. argentea* respectivamente), maior porcentagem da distância entre a origem da nadadeira dorsal a origem da nadadeira pélvica (29,3-33,9, vs. 23,3-25,7 e 24,3- 30,8) e lobo inferior da nadadeira caudal mais fortemente enegrecida que o lobo superior (vs. lobos da mesma coloração).

Palavras-chave: Taxonomia integrativa. Citocromo oxidase subunidade I (COI). Sistemática molecular. Filogenia. Peixe neotropical.

Morphological and molecular studies of *Piabina* Reinhardt (Characidae, Stevardiinae) from the basins of the upper Rio Paraná and Rio São Francisco, with description of a new species

ABSTRACT

Species of *Piabina* Reinhardt (1867) from the upper rio Paraná and rio São Francisco basins were molecularly characterized by the cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) sequence and were taxonomic and phylogenetically analyzed. Molecular analysis resulted in the formation of three distinct clades: clade A (*Piabina anhembi*, rio Tietê basin), clade B (*Piabina argentea*, rio São Francisco and upper rio Paraná basins) and clade C (*Piabina sp. n.*, upper rio Paraná). Populations of *P. argentea* from the upper rio Paraná and rio São Francisco basins shared the same haplotype. *Piabina anhembi*, an endemic species from the rio Tietê headwaters presented distinct haplotype from the others, however, as only one individual was sequenced, intraspecific polymorphism was not analyzed. A new species of Pirapó and Pitangui rivers, upper rio Paraná basin, was discovered. The new species, herein described, showed wide intra-specific polymorphism, observed by the formation of nine haplotypes in the studied population. The interspecific genetic distances ranged from 3.0 to 6.7% and 6.7% between *Piabina sp. n.* and *P. anhembi* with *P. argentea*, and 3.0% between *P. anhembi* and *P. argentea*. Phylogenetic analysis showed that *Piabina sp. n.* has two synapomorphies consistent with the hypothesis of the genus monophyly. Most of the 57 analyzed characters are in the same state as *P. argentea* and *P. anhembi*. The characters: 19 (anguloarticular horizontally shortened), 29 (anterior portion of the laterosensorial canal in the first infraorbital reaching or extending beyond the edge of the main body of the ossification), 30 (posterior portion of the first infraorbital overlapping the anterior portion the second infraorbital), 34 (third infraorbital teeth present) and 55 (presence of two epurals) were divergent. The new species described herein can be easily distinguished from its congeners by the combination of the following characters: anterior tooth of the triad partially inserted between the first and second teeth of the first series (*vs.* anterior tooth of the triad not inserted into the space between the first and second teeth of the first series), largest percentage of the distance from the dorsal-fin origin to the anal-fin origin in relation to standard length (*vs.* 31.1-35.3, 26,6-28,9 and 24,7-32,8), higher percentage of the distance between the dorsal-fin origin to the pelvic-fin origin (29.3-33.9, *vs.* 23,3-25,7 and 24,3- 30,8) and lower lobe of caudal fin more strongly blackish than that upper lobe (*vs.* lobes with the same coloration).

Keywords: Integrative taxonomy. *Citocromo oxidase subunit I* (COI). Molecular systematics. Filogeny. Neotropical fish.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Árvores filogenéticas de máxima verossimilhança (esquerda) e neighbor-joining (direita) obtidas com o modelo HKY, a partir da sequência parcial do gene citocromo c oxidase subunidade I. Números acima das ramificações representam os valores de bootstrap. _____ 27
- Figura 2** - Árvore filogenética neighbor-joining obtida com o modelo K2P, a partir da sequência parcial do gene citocromo c oxidase subunidade I. Números acima das ramificações representam os valores de bootstrap. _____ 28
- Figura 3** - *Piabina sp. n.* MZUSP (a catalogar), holótipo, 68,6 mm CP; bacia do rio Tibagi, alto rio Paraná, município de Ponta Grossa, Paraná, Brasil. a. colorido de exemplar recém fixado, b. dois anos de fixação. _____ 29
- Figura 4** - *Piabina sp. n.*, parátipo, NUP 6397, 68,5 mm CP. Pré-maxilar (a), lado esquerdo, vista ventral. Maxilar (b), lado esquerdo, vista lateral. Região anterior do dentário (c), lado esquerdo, vista lateral. As letras correspondem às séries de dentes (A: segunda série (tríade), B: primeira série (principal), C: terceira série). _____ 32
- Figura 5** - *Piabina sp. n.*, parátipo, NUP 6397, 68,5 mm CP. Raios da nadadeira anal, detalhe dos ganchos. _____ 33
- Figura 6** - Localidade-tipo de *Piabina sp. n.*, rio Pitangui, ponto acima da usina Pitangui, município de Ponta Grossa (25°01'35"S 50°03'59"W). _____ 38
- Figura 7** - Mapa parcial da região sul-sudeste do Brasil, evidenciando a bacia do alto rio Paraná no Estado do Paraná, mostrando a distribuição de *Piabina sp. n.* O quadrado representa a localidade-tipo (rio Pitangui) e os círculos os parátipos (rios Ivaí, Pirapó e Tibagi). Cada localidade pode estar representada por mais de um lote. _____ 38
- Figura 8** - Mapa parcial do Brasil apresentando a distribuição geográfica das espécies válidas de *Piabina*, aqui analisadas genética e taxonomicamente. Os símbolos em preto representam a distribuição de *Piabina sp. n.*, os em amarelo de *P. anhemi*, e em vermelho de *P. argentea*. _____ 39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Lista das espécies das quais foram obtidas as sequências nucleotídicas do gene mitocondrial citocromo c oxidase I (N: número de indivíduos analisados). A sequência nucleotídica de *Bryconamericus iheringii*, outgroup, foi retirada do Genbank, com número de acesso FJ749041. _____ 17
- Tabela 2** - Polimorfismo nucleotídico de 410 pares de base das sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I de espécies de *Piabina*. A coluna código faz referência ao ponto de coleta dos exemplares (RDV: rio das Velhas; RPB: rio Paranaíba; RPT: rio Paraitinga; RCO: ribeirão Colorado; RDF: ribeirão das Frutas; RPI: rio Pitangui; RAI: rio Amambaí, RMA: ribeirão Maringá). Entre parênteses o número de indivíduos que compartilharam o referido haplótipo. _____ 24
- Tabela 3** - Valores médios de distâncias genéticas, em porcentagem, obtidas com o modelo K2P de sequências parciais do gene citocromo c oxidase subunidade I das espécies do gênero *Piabina*. Destacado em negrito, valores das distâncias intra-específicas, quando possível cálculo. _____ 25
- Tabela 4** - Dados morfométricos e merísticos de *Piabina sp. n.* N=85, 6 d&c utilizados para a contagem de vértebras, medidas 1 a 14 expressas em porcentagem do comprimento padrão e 15 a 19 expressas em relação ao comprimento da cabeça. _____ 35
- Tabela 5** - Estados dos caracteres de *Piabina sp. n.*, para os 57 caracteres apresentados por Vari & Harold (2001) na filogenia do gênero. Os caracteres estão listados em ordem decrescente, organizados por grupos, separados por colunas. _____ 36

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica Neotropical Ichthyology. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/ni/>.
Obs.: O epíteto específico será apresentado na versão a ser submetida à Revista, pois, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, este trabalho não é considerado uma publicação formal, sendo aqui tratado como *Piabina* sp. n.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	133
2	MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1	Material biológico e locais de coleta	16
2.2	Caracterização Molecular	17
2.2.1	Extração e quantificação do DNA	17
2.2.2	PCR do DNA mitocondrial	18
2.2.3	Sequenciamento e análise	19
2.3	Caracterização morfológica	19
3	RESULTADOS	22
3.1	Caracterização Molecular	22
3.2	Caracterização Morfológica	28
4	DISCUSSÃO	42
5	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A ictiofauna da região neotropical é considerada a mais diversa do mundo (Reis *et al.*, 2003). Dentre os peixes de água doce, a ordem Characiformes é considerada a terceira mais diversa, compreendendo 19 famílias e 3.244 espécies (Eschmeyer & Fricke, 2011). Além disso, esta ordem abrange a família Characidae, a mais numerosa entre os peixes, com 1125 espécies válidas (Eschmeyer & Fricke, *op cit.*).

Characidae inclui vários grupos de peixes, os quais constituem uma grande e heterogênea assembléia, incluindo espécies de pequeno a grande porte. Devido à grande diversidade e por não apresentar uma origem monofilética comprovada, esta família é considerada uma das mais complexas dentro da ordem (Britski *et al.*, 2007, Mirande, 2010). Muitos gêneros encontravam-se *Incertae Sedis* em Characidae desde Reis *et al.* (2003), devido à ausência de informações que comprovassem seu monofiletismo. Mais recentemente, Mirande (2009, 2010) realizou estudos filogenéticos desta família e ressuscitou ou redefiniu algumas subfamílias com base em sinapomorfias, incluindo o gênero *Piabina* Reinhardt, 1867 em Stevardiinae.

Este gênero é composto por espécies de pequeno porte, de coloração prateada em vida, que habitam águas rápidas, com fundo arenoso e são conhecidos popularmente como piabas (Vari & Harold, 2001). As espécies deste grupo apresentam três séries de dentes no pré-maxilar, com notável sobreposição deste em relação ao dentário, uma peculiaridade compartilhada pelo gênero *Creagrutus* Günther, 1864. Além disso, *Piabina* apresenta, somando a esta, muitas outras similaridades com este gênero.

Piabina foi descrita por Reinhardt (1867), com base em exemplares coletados em Lagoa Santa, no rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil, sendo *P. argentea* a espécie-tipo do gênero. Desde sua criação até os dias atuais, seis espécies já foram citadas neste gênero: *Piabina peruana* Steindachner, 1875, descrita de Monterico no Peru, *Piabina piquira* Eigenmann (1910) do rio Piracicaba, *P. analis* Eigenmann, Henn & Allen. (1914) da bacia do alto rio Paraguai, *P. beni* Pearson, 1924, do rio Popoi, alto rio Beni, Bolívia e *P. anhembi* Silva & Kaefer 2003, das cabeceiras do rio Tietê, alto rio Paraná. No entanto, somente duas são atualmente consideradas válidas, *P. argentea* e *P. anhembi*. *P. peruana* foi transferida para *Creagrutus* (Gunther, 1876). *Piabina piquira* foi considerada um *nomem nudum*, pois não foi encontrada sua descrição formal, nem material-tipo. Além disso, foi confirmada a

ocorrência de *P. argentea* no rio Piracicaba, acarretando na sinonimização de *P. piquira* com *P. argentea* (Vari & Harold, 2001). *Piabina analis* foi transferida para o gênero *Piabarchus* por Myers (1928), e *P. beni* foi transferida para *Creagrutus* como *C. pearsoni* por Mahnert & Géry (1988), devido a este epíteto específico já estar ocupado por outra espécie.

Devido às similaridades entre *Creagrutus* e *Piabina*, este último foi por diversas vezes sinonimizada e revalidada (ver detalhes em Vari & Harold, 2001). Entretanto, estas realocações foram realizadas com base em critérios arbitrários, como comprimento da nadadeira anal (Géry, 1977), sem explorar as relações filogenéticas entre as espécies.

Desta forma, a falta de um estudo sistemático e filogenético que apontasse sinapomorfias para suportar a validade de *Piabina* levou ictiólogos a desenvolverem um amplo estudo abrangendo os dois gêneros supracitados (Harold & Vari, 1994; Vari & Harold, 1998; Vari & Harold, 2001). Tais estudos revelaram uma alta diversidade em nível específico não detectada anteriormente em *Creagrutus*, que os gêneros são próximos, monofiléticos e diferenciam-se principalmente por caracteres osteológicos não visualizados externamente, como a presença do quarto osso infraorbital quadrilateral em *Creagrutus* e aproximadamente triangular, com ângulo posterior agudo em *Piabina* (sinapomorfia do gênero). Estes estudos, somados a outros posteriores, geraram novas hipóteses de relações filogenéticas e biogeográficas entre as espécies destes dois gêneros. Estes culminaram com a validação apenas de *P. argentea*, a qual foi considerada espécie mais basal do clado, com ampla distribuição geográfica, ocorrendo nas bacias dos rios Itapirucu, São Francisco, Paraíba, Itapemirim e alto rio Paraná. *Piabina beni* foi mantida em *Creagrutus*, como *C. pearsoni*, como já mencionado anteriormente.

Na bacia do alto rio Paraná, em especial no Estado do Paraná, exemplares identificados como *P. argentea* são muito frequentes, mas têm sido encontradas divergências entre as populações durante sua identificação. Ressalta-se ainda que alguns destes exemplares são muito similares a outras possíveis novas espécies de *Bryconamericus* do grupo *iheringii*, *Knodus* ou mesmo *Creagrutus*, que ocorrem na região, fato que gera muita confusão na identificação. Além disso, é válido ressaltar que, no estudo desenvolvido por Vari & Harold (2001), nenhum lote de *P. argentea* coletado em afluentes no Estado do Paraná foi analisado. Esta informação trouxe novas perspectivas para investigação deste grupo nesta região, devido principalmente à diversidade de ambientes encontrados neste trecho da bacia do alto rio Paraná. Considerando as semelhanças entre as espécies destes gêneros e as dificuldades em se

delimitar espécies crípticas, buscou-se, neste trabalho, contribuir para o reconhecimento da diversidade deste gênero, utilizando uma abordagem sistemática.

Nesse sentido, a taxonomia, no seu contexto atual, tem buscado reconhecer a diversidade biológica através de perspectivas múltiplas e complementares. A associação de novas teorias, métodos e dados provenientes de disciplinas como genética populacional, filogeografia e ecologia tem como intuito contribuir sobremaneira na difícil tarefa de delimitar entidades biológicas similares. A utilização de tais informações para a descrição de espécies tem sido considerada um grande desafio para os taxonomistas (Padial & De La Riva, 2010). Esta nova abordagem conhecida como “Taxonomia Integrativa” baseia-se no fato de que cada espécie possui uma história evolutiva única. Desta forma, o conjunto de diversas informações obtidas de diferentes coleções de uma mesma espécie deve ser congruente, fornecendo ampla evidência biológica para suportar a determinação de um nome oficial (Dayrat, 2005).

Concomitantemente aos trabalhos taxonômicos baseados na morfologia, estudos genéticos têm sido utilizados como importante ferramenta para estudos filogenéticos (Javonillo *et al.* 2010), bem como para identificação de espécies crípticas (Lima *et al.*, 2005; Benine *et al.*, 2009). Estes últimos trabalhos ressaltam que eventualmente caracteres morfológicos podem não ser suficientes para afirmar se determinados indivíduos pertencem a espécies diferentes ou não, assim estudos com análises da variabilidade genética têm contribuído significativamente para o entendimento da diversidade de peixes. Há décadas que marcadores moleculares, associados a outros estudos, mostraram-se capazes de contribuir fortemente no reconhecimento da diversidade de vários grupos taxonômicos (*e.g.* Avise, 1994; Johnson & Clayton, 2000; Pons *et al.*, 2006, Melo *et al.* 2011).

A análise de marcadores moleculares do DNA mitocondrial (mtDNA) tem mostrado grande eficiência em estudos de caracterização de espécies, variação geográfica e estrutura populacional (*e.g.* Agnése *et al.*, 1997; Sivasundar *et al.*, 2001; Prioli *et al.*, 2002). Entre os marcadores estudados, o gene citocromo *c* oxidase I (COI) destaca-se por possuir inúmeras vantagens como a possibilidade de utilização de um *primer* universal para a maioria dos animais, e maiores taxas de sinal filogenético e evolução que auxiliam na discriminação de grupos muito próximos (Hebert *et al.*, 2003). Uma porção de 648 pares de base (pb) do gene COI foi selecionada como marcador molecular padrão, denominado de *DNA barcoding*, através de uma proposta elaborada por Hebert *et al.* (*op cit.*) conhecida como *Consortium for the Barcodes of Life* (CBoL). O objetivo do programa é padronizar e automatizar a

identificação e descrição de toda biodiversidade. Para isso, a separação dos espécimes é realizada com base nos valores de distância genética das sequências, sendo estabelecido um limiar de dez vezes para tomada de decisão. Em princípio, dois haplogrupos seriam considerados como pertencentes a espécies distintas se o polimorfismo nucleotídico intergrupos for pelo menos dez vezes maior que as diferenças intragrupos (Hebert *et al.*, 2004).

No entanto, um estudo recente conduzido por Ward (2009), de revisão dos trabalhos de divergência genética em peixes utilizando a metodologia DNA *barcode*, revelou que o limiar proposto por Hebert *et al.* (2003) para considerar uma unidade biológica distinta não está adequado para um expressivo número de espécies. Os autores verificaram que dentre os estudos analisados 17% dos valores de divergência genética entre congêneres foi inferior a 3%. Além disso, sugeriram que, se entre dois morfotipos ocorrer uma divergência maior que 2%, existe uma probabilidade maior que 95% que sejam espécies diferentes.

Nesse sentido o presente estudo teve como escopo verificar se as populações de *P. argentea*, encontradas nas bacias do alto rio Paraná e rio São Francisco, constituíam espécies distintas, reconhecer relações interespecíficas preliminares das espécies de *Piabina* com base em caracteres morfológicos e realizar a descrição formal da nova espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material biológico e locais de coleta

O material analisado neste estudo foi obtido, em grande parte, através de excursões científicas realizadas pela equipe da Coleção Ictiológica do Nupélia – UEM. Outros pesquisadores também colaboraram com este estudo através de coleta e doação de amostras de tecidos e/ou exemplares inteiros. Para as análises genéticas foram utilizadas amostras do tecido muscular fixadas em álcool comercial puro no momento da coleta e armazenadas sob refrigeração a -20°C.

Ao todo foram analisadas sequências nucleotídicas do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase I (COI) de 18 espécimes, pertencentes a três espécies (*Piabina argentea*, *Piabina anhembi* e *Piabina sp. n.* (aqui descrita). A determinação do gênero foi realizada de acordo com Vari & Harold (2001). Na Tabela 1 encontram-se os locais de ocorrência, incluindo sub-

bacia e bacia hidrográfica, material testemunho e número dos exemplares estudados. A espécie *Bryconamericus iheringii* (Boulenger, 1887) foi considerada grupo externo e adicionada no trabalho a partir das sequências COI disponíveis no *Genbank* com número de acesso FJ749041 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Sempre que possível, um exemplar de cada espécie que tenha sido coletado preferencialmente junto ao material aqui estudado foi catalogado como material testemunho na Coleção Ictiológica do Nupélia (NUP).

Tabela 1. Lista das espécies das quais foram obtidas as sequências nucleotídicas do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase I (N: número de indivíduos analisados). A sequência nucleotídica de *Bryconamericus iheringii*, grupo externo, foi retirada do *Genbank*, com número de acesso FJ749041.

Espécie	N	Localidade	Sub-bacia	Bacia	Testemunho
<i>Piabina anhembi</i>	1	rio Paraitinga	rio Tietê	alto rio Paraná	LBP 4622
<i>Piabina argentea</i>	2	rio das Velhas	rio das Velhas	rio São Francisco	NUP7270
	1	rio São Francisco	rio Paranaíba	alto rio Paraná	NUP 8912
<i>Piabina sp. n.</i>	4	rio Pitangui	rio Tibagi	alto rio Paraná	NUP6397
	2	ribeirão Colorado	rio Pirapó	alto rio Paraná	NUP6484
	3	ribeirão Maringá	rio Pirapó	alto rio Paraná	NUP6388
	3	ribeirão das Frutas	rio Ivaí	alto rio Paraná	a catalogar
	2	rio Amambaí	rio Amabaí	alto rio Paraná	a catalogar
<i>Bryconamericus iheringii</i>	1				UFRGS10002

2.2 Caracterização Molecular

2.2.1 Extração e quantificação do DNA

Para extração do DNA seguiu-se o protocolo de Monesi *et al.* (1998), com algumas modificações (Prioli *et al.*, 2002). Foram macerados em nitrogênio líquido cerca de 100 mg de tecido muscular. Em seguida as amostras foram homogeneizadas em 500 µL de tampão TH (Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, sacarose 5% e espermina 0,15 mM) mais 500 µL de tampão PS (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e sacarose 5%) e 5 µL de

proteínase K (20 µg/µL) em banho-maria com agitação a 37°C por aproximadamente duas horas. O DNA foi purificado com lavagens fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio e precipitado através de solução salina (0,2M NaCl) e etanol absoluto gelado e mantido a -20°C por 24 horas. O precipitado foi submetido a lavagens com etanol 70% e 100% por centrifugação de 5 minutos a 12.000 rpm. Posteriormente o *pellet* obtido foi ressuspendido em 50 µL de tampão TE (1 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA), com RNase (20 mg/mL) e estocado a -20°C.

A quantificação do DNA presente em cada amostra foi realizada por meio visual pela comparação com quantidades conhecidas de DNA do fago λ (Invitrogen). Foi utilizado gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídeo (20 µg/100 mL) e fotografado sob luz ultravioleta utilizando o *software* Kodak EDAS-290.

2.2.2 PCR do DNA mitocondrial

DNA individual foi utilizado para amplificação de fragmentos do gene COI com os *primers* FishF1-5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3' e FishR1-5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3', descritos por Ward *et al.* (2005) e termociclador MJ Research PT100. As condições para a reação de PCR foram descritas por Prioli *et al.* (2002). A mistura de reação para PCR foi constituída de Tris-KCl (20 mM Tris-HCl pH 8,4 com 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 2,5 mM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 15 ng de DNA e água millique para completar o volume para 25 µL. Para cada exemplar foram realizadas duas reações independentes e um controle negativo em cada experimento, consistindo de reação de PCR sem DNA. A programação foi 94°C por 2 minutos, seguidos de 34 ciclos a 94°C por 30 segundos, 52 a 56°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

A quantificação dos produtos de PCR foi realizada em gel de agarose (1%) e os comprimentos foram determinados através de comparação com o padrão *Ladder* 100 pb (Invitrogen). Em seguida, as amostras foram purificadas usando-se polietileno glicol (PEG) para eliminação do excesso de *primers* e resíduos de nucleotídeos de acordo com protocolo de Rosenthal *et al.* (1993) e armazenadas a -20°C.

2.2.3 Sequenciamento e análise filogenética

O produto final obtido de cada reação de PCR foi utilizado diretamente para o sequenciamento em plataforma MegaBace (Amersham), de acordo com as instruções do fabricante. As sequências nucleotídicas foram editadas manualmente e alinhadas em *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994), com o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.1* (Hall, 1999). As sequências que apresentaram nível de confiabilidade inferior a 90% foram excluídas da análise, com objetivo de diminuir as chances de erro.

Para o cálculo das distâncias, os indivíduos de cada espécie formaram grupos diferenciados. As diversidades intra-específicas foram obtidas pela média dentre todos os indivíduos de cada espécie, as distâncias interespecíficas foram estimadas entre os diferentes grupos de espécies e analisaram-se todos os possíveis pares formados dentro de cada gênero. As sequências foram analisadas através do modelo de substituição nucleotídica selecionado com auxílio dos programas *Modeltest 3.7* (Posada & Crandal, 1998) e *PAUP 4.0 beta 10* (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*; Swofford, 2002), utilizando os critérios de Akaike (*Corrected Akaike Information Criterion -AICc*) e bayesiano (*Bayesian Information Criterion - BIC*).

As análises filogenéticas basearam-se nos algoritmos *neighbor-joining* (“união-de-vizinhos”; NJ) com suporte de 10.000 *bootstraps* (reamostragens) e *maximum-likelihood* (“máxima-verossimilhança”; ML) com 1.000 *bootstraps*. A construção das árvores *neighbor-joining* e de máxima-verossimilhança foi realizada com os programas *Mega 4.0* e *PhyML 3.0* (Guindon & Gascuel, 2003), respectivamente.

Também foram realizadas análises com o modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-Parâmetros (K2P; Kimura, 1980), utilizando o algoritmo *neighbor-joining* (NJ) com suporte de 10.000 *bootstraps*. Esses parâmetros foram propostos por Hebert *et al.* (2003) como metodologia padrão para as análises do *DNA barcoding*, por serem eficientes e rápidos em análises de espécies em larga escala (Nei & Kumar, 2000; Kumar & Gadagkar, 2000).

2.3 Caracterização Morfológica

Os dados morfométricos foram obtidos com auxílio de paquímetro digital com precisão de 0,1 mm e as contagens realizadas sob estereomicroscópio com aumento de 50X, do lado esquerdo do corpo do peixe, sempre que possível. A metodologia utilizada seguiu a

descrita por Vari & Harold (2001), incluindo os caracteres anatômicos, exceto a largura da boca, que seguiu Silva & Kaefer (2003). As medidas foram expressas em porcentagem do comprimento padrão (CP), exceto as realizadas em subunidades da cabeça, as quais foram expressas como porcentagem da cabeça (CC). A contagem das séries de dentes do pré-maxilar foi realizada considerando três componentes maiores (Vari e Harold, 2001). Componente A ou segunda série: formado por um agrupamento de três grandes dentes localizados medialmente à série principal. Componente B ou primeira série: formado pela série principal, curvada transversalmente, disposta entre a região anterior da sínfise e a região pósterolateral do pré-maxilar. Componente C ou terceira série: dois dentes, similares morfologicamente aos da série principal, localizados lateralmente entre o terceiro e o quarto dente da série principal. As fotos do dentário, pré-maxilar, maxilar e nadadeira anal foram obtidas com câmera fotográfica Sony Cyber-shot, acoplada a ocular de microscópio estereoscópico num aumento de 50X.

Na contagem de escamas das séries horizontais entre a origem da nadadeira dorsal e a linha lateral não foi incluída a série de escamas pré-dorsais, localizada imediatamente anterior à origem do primeiro raio da nadadeira dorsal. O número de séries de escamas horizontais abaixo da linha lateral foi contado até a origem da nadadeira anal, sem considerar as escamas que recobrem seus primeiros raios. Da mesma maneira, a contagem das escamas da linha lateral não considerou as escamas que recobrem a base da nadadeira caudal. Seis exemplares foram diafanizados e corados (d&c) de acordo com Taylor & van Dyke (1985) para análise de caracteres osteológicos. Vértebras do aparato de Weber foram contadas como quatro elementos e a fusão PU1 + U1 da região caudal como um único elemento, todos incluídos na contagem total de vértebras.

A análise dos caracteres filogenéticos foi realizada seguindo a matriz publicada de Vari & Harold (2001). A terminologia para os caracteres osteológicos e da anatomia dos sistemas não ósseos seguiu Alexander (1964), Weitzman (1974), Winterbottom (1980) e Vari & Harold (2001). Na descrição, cada contagem é seguida por sua frequência entre parênteses. Na lista de exemplares examinados, o número de espécimes total do lote é dado primeiro, seguido pelo número de exemplares analisados do lote (quando diferente do número total de espécimes) e pelo número daqueles diafanizados e corados (d&c) entre parênteses. As medidas e contagens foram apresentadas separadamente entre as sub-bacias dos rios Pirapó e Tibagi, pois as populações diferiram quanto à coloração do lobo inferior da nadadeira caudal e ganchos ósseos nadadeira anal (ver Discussão). A determinação do sexo e da maturação

sexual dos exemplares abertos seguiu o proposto por Vazzoler (1996). As abreviações institucionais estão de acordo com:

<http://researcharchive.calacademy.org/research/Ichthyology/catalog/collections.asp>

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização Molecular

Foram analisadas sequências nucleotídicas do gene COI de 18 indivíduos pertencentes ao gênero *Piabina* (Tabela 2), além do *outgroup*, *Bryconamericus iheringii*, obtido no *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Após o alinhamento e edição manual, foi selecionado para análise um fragmento de 410 pares de bases (pb). Esse fragmento foi escolhido devido à maior porcentagem de confiança encontrada nesse intervalo. A confirmação da sequência foi realizada por similaridade, através de acessos disponíveis no *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Em relação ao polimorfismo genético (Tabela 2), observou-se que não houve compartilhamento de haplótipos entre espécies distintas. Os indivíduos de *P. argentea*, provenientes tanto das bacias do rio São Francisco (2 ex.) como do alto rio Paraná (1 ex., rio São Francisco, afluente do Paranaíba) compartilharam um único haplótipo. *Piabina anhembí* não compartilhou haplótipo com nenhuma das outras espécies do gênero. Enquanto que uma população diferenciada, denominada aqui de *Piabina sp. n.*, do alto rio Paraná, apresentou elevado polimorfismo, formando na população estudada nove haplótipos. Nesta espécie ocorreu inclusive a formação de haplótipos distintos em indivíduos coletados em uma mesma localidade, como exemplo o rio Pitangui.

Em relação às distâncias genéticas intra e interespecíficas (Tabela 3), nos indivíduos de *P. argentea*, a distância intra-específica foi nula, enquanto *Piabina sp. n.* apresentou 1% de diversidade. Para *P. anhembí*, não foi possível o cálculo da distância intra-específica, pois somente um indivíduo foi analisado. Quanto à distância interespecífica, *P. argentea* apresentou menores valores quando comparada a *P. anhembí* (3,0%) e maiores com *Piabina sp. n.* (6,7%), e *Bryconamericus iheringii* (8,7%). Entre *P. anhembí* e *Piabina sp. n.* foi encontrada distância de 6,7%, e entre esta e *B. iheringii* 8,7%. Entre *Piabina sp. n.* e *B. iheringii* foi de 9,4%. Não foram observados *indels* ao longo das sequências.

A proporção das bases nitrogenadas adenina+timina (25,9+32,9) foi maior do que guanina+citosina (24,4+16,6) em todas as espécies (Tabela 2). A proporção de sítios invariáveis (I) foi de $I = 0.7886$ e a razão de transições/transversões foi de 5,87. Foram observados 46 sítios de transição e 16 de transversões, a maioria na terceira posição do códon.

Como esperado, as mudanças nessa posição não resultaram em troca de aminoácidos. Apenas seis alterações aminoacídicas foram verificadas nos exemplares analisados. Cinco ocorreram em decorrência de trocas na primeira posição do códon, observadas uma no outgroup (*B. iheringii*) e uma em *Piabina sp. n.* da sub-bacia do rio Tibagi, com substituição de isoleucina na posição 181, e três em *Piabina sp. n.* da sub-bacia do Pirapó (afluente do Paranapanema), com substituição de triptofano na posição 289. Na segunda posição do códon foi encontrada apenas uma alteração que resultou em troca de aminoácidos, com substituição de glicina, na posição 8, a qual ocorreu em um espécime também da sub-bacia do Pirapó. Ressalta-se que estes resultados culminaram para o reconhecimento da nova espécie de *Piabina*, que é descrita abaixo.

Tabela 2. Polimorfismo nucleotídico de 410 pares de base das sequências do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase subunidade I de espécies de *Piabina*. A coluna código faz referência ao ponto de coleta dos exemplares (RDV: rio das Velhas; RPB: rio Paranaíba; RPT: rio Paraitinga; RCO: ribeirão Colorado; RDF: ribeirão das Frutas; RPI: rio Pitanguí; RAI: rio Amambá, RMA: ribeirão Maringá). Entre parênteses o número de indivíduos que compartilharam o referido haplótipo.

Espécie	Código (N)	Haplótipo	Sítios nucleotídicos	Bacia
			111111111111111122222222222233333333344 124455667788990013344456778913477888899900013355600 8272814396817062518927932471261939238914734953947958	
<i>Piabina argentea</i>	RDV (2) RPB (1)	Hapl-1	CTCAAGTTCGTCGTCATATCCTCCACGGCTGCCCTGACTTTGCTCCCATC	rio São Francisco alto rio Paraná
<i>Piabina anhembi</i>	RPT (1)	Hapl-2C..C....TG..C.A.....A...C.....A.....T..G.T	alto rio Paraná
	RCO (2)	Hapl-3	...G..CC..GTA..TG.G.TA.ATG..AT.AC.....GA...ATCTTTG..	
	RDF (3)	Hapl-4	...G..CC..C.A..TG.G.TA.ATG..AT.AC.....GA...AT.TT.G..	
	RPI (1)	Hapl-5	...G..CC..C.A..TG.G.TA.ATG..AT.AC.....GA.C.AT.TTTG..	
	RAI (2)	Hapl-6	...G...CT.C.A..TG.G.TA.ATG..AT.AC.....GA...AT.TTTG..	
<i>Piabina sp. n.</i>	RPI (1)	Hapl-7	...G..CC..C.A..TG.G.TA.ATG.AAT.AC.....GA...AT.TTTG..	alto rio Paraná
	RPI (2)	Hapl-8	...G..CC..C.A..TG.G.TA.ATG..AT.AC....AGA.C.AT.TTT...	
	RMA (1)	Hapl-9	...G..CC..GTA..TG.G.TA.ATG..AT.AC....TGA...ATCTTTG..	
	RMA (1)	Hapl-10	...G...C..G.A..TG.G.TA.ATG..AT.AC....TGA...AT.TTTG.A	
	RMA (1)	Hapl-11	G..G..CC..GTA..TG.G.TA.ATG..AT.AC....TGA...ATCTTTG..	
<i>Bryconamericus iheringii</i> (1)	Outgroup	Hapl-12	.CT.TA.C.A..ACT..C.CTGAT..T.ATGACTTTC.GGACCA..T...C.	

Tabela 3. Valores médios de distâncias genéticas, em porcentagem, obtidas com o modelo K2P de sequências parciais do gene citocromo *c* oxidase subunidade I das espécies do gênero *Piabina*. Destacado em negrito, valores das distâncias intra-específicas, quando possível cálculo.

Espécies	Distância			
	1	2	3	4
1. <i>Piabina argentea</i>	0			
2. <i>Piabina anhemi</i>	3,0	n/c		
3. <i>Piabina sp.n.</i>	6,7	6,7	1,0	
4. <i>Bryconamericus iheringii</i>	8,7	8,7	9,4	

Com o intuito de examinar a divergência genética entre as espécies foram realizadas análises filogenéticas. As árvores foram construídas a partir do modelo de substituição Kimura-2-Parâmetros (K2P) com algoritmo NJ (Hebert et al., 2004) bem como pelo modelo evolutivo HKY + I ($-\ln L = 903.1159$, $AICc = 1895.1207$), considerado como o que melhor explicou os dados da região COI. Sua escolha ocorreu, com ambos os critérios Akaike ($AICc$) e Bayesiano (BIC) sob os parâmetros $Nst = 2$; $TRatio = 5.8772$; $Rates = \text{gamma}$, $Shape = 0.0165$; $Pinvar = 0$.

As árvores NJ e ML geradas pelo modelo evolutivo HKY+I e a árvore NJ obtida com o modelo K2P foram congruentes na separação das espécies e divisão dos clados (Figs. 1 e 2). As análises culminaram com a formação de três grupos, aqui foram denominados em Clado A, B e C. O Clado A foi composto por *P. anhemi*, endêmica das cabeceiras do rio Tietê, este Clado apresentou baixa distância genética (3,0%) e maior similaridade molecular com o Clado B. Neste Clado foram agrupados os indivíduos de *P. argentea* provenientes da bacia do rio São Francisco, localidade de onde a espécie foi descrita, bem como indivíduos da sub-bacia do rio Paranaíba, alto rio Paraná. Um terceiro grupo, o Clado C, foi formado pelos indivíduos previamente identificados como *P. argentea*, provenientes da bacia do alto rio Paraná, coletados em diversas sub-bacias nos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul (Tabela1), aqui determinados como a nova espécie *Piabina sp. n.* Este Clado apresentou uma alta

diversidade genética intra-específica, e valores de *bootstrap* suficientes para apoiar a sustentação dos clados.

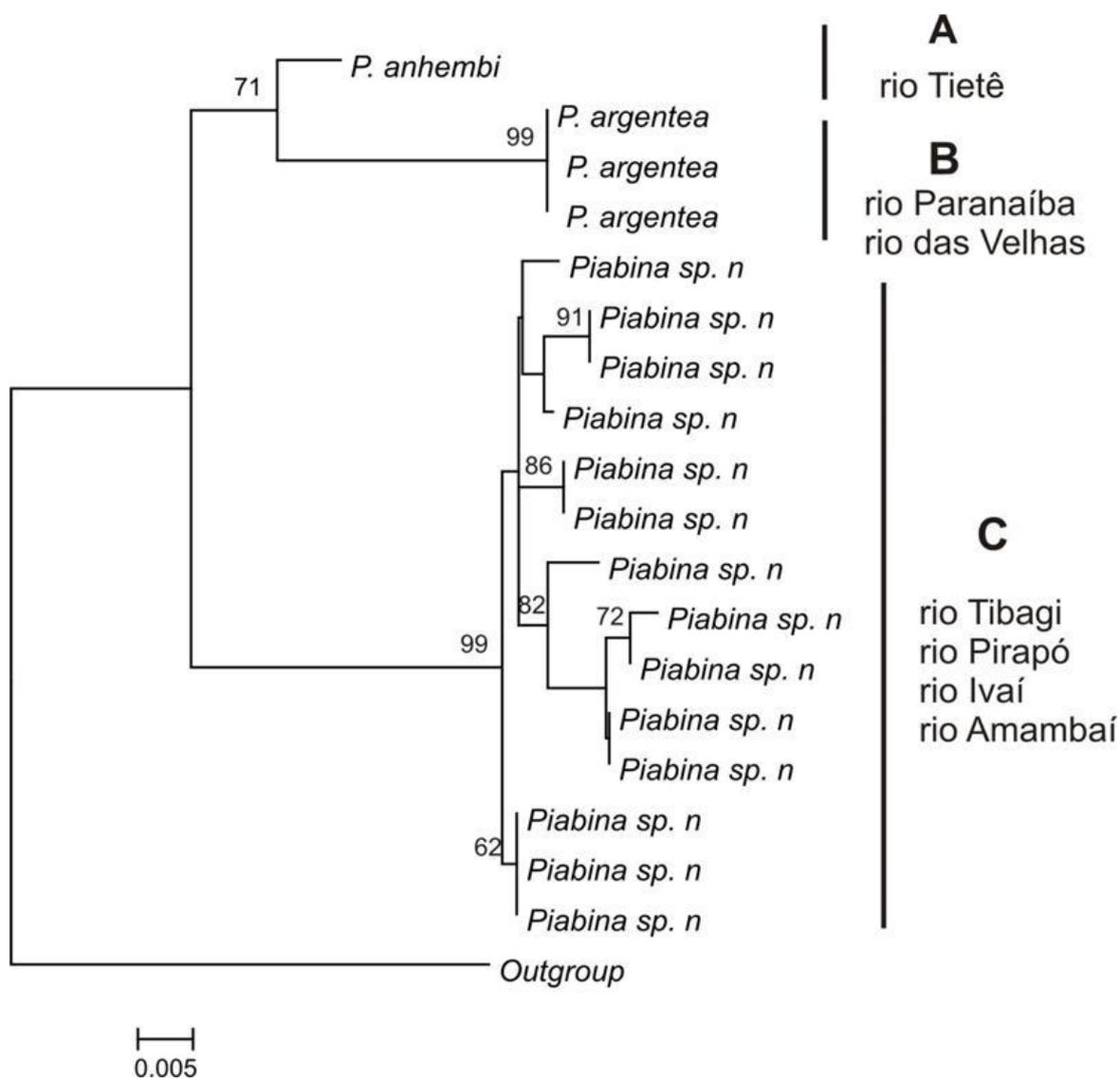


Fig. 2. Árvore filogenética *neighbor-joining* obtida com o modelo K2P, a partir da sequência parcial do gene citocromo *c* oxidase subunidade I. Números acima das ramificações representam os valores de *bootstrap*.

3.2 Caracterização Morfológica

Os estudos moleculares descritos acima permitiram o reconhecimento de uma espécie nova para a Ciência, e sua descrição formal é

Piabina sp. n. nova espécie

Figs 3-5

Piabina argentea.- Hoffmann *et al.* 2005 (rio das Cinzas) — Galves *et al.*, 2007:255 (bacia do rio Taquaral; afluyente Tibagi) — Shibatta *et al.*, 2007:130 (bacia do médio e alto Tibagi).



Fig. 3. *Piabina sp. n.* MZUSP (a catalogar), holótipo, 68,6 mm CP; bacia do rio Tibagi, alto rio Paraná, rio Pitangui, município de Ponta Grossa, Paraná, Brasil. a. colorido de exemplar do mesmo lote do holótipo recém fixado, b. Holótipo.

Holótipo. MZUSP (a catalogar), 68,6 mm CP, Brasil, Paraná, município de Ponta Grossa, rio Pitangui (foz do rio Verde), afluyente do rio Tibagi, bacia do alto rio Paraná, 25°2'20,0"S 50°7'40"W, 15 Nov 2008, coletora Ana Maria Gealh.

Parátipos. Todos coletados no Brasil, Estado do Paraná, bacia do alto rio Paraná. NUP 6155, 3, 66,5-71,6 mm CP, mesmos dados do holótipo, 15 Nov 2007; NUP 6156, 1, 65,8 mm CP, mesmos dados do holótipo, 10 Fev 2007; NUP 6157, 1, 67,8 mm CP, mesmos dados do holótipo, 18 Fev 2007; NUP 6159, 1, 74,6 mm CP, município de Ponta Grossa, rio Pitangui (usina), afluyente do rio Tibagi, 25°01'35"S 50°03'59"W, 05 Ago 2007, Gealh, A.M.; NUP 6160, 4, 64,2-68,6 mm CP, mesmos

dados do holótipo, 15 Abr 2007; NUP 6161, 6, 65,0-72,3 mm CP, município de Ponta Grossa, rio Pitanguí (Sanepar), afluente do rio Tibagi, 25°02'05"S 50°07'39"W, 02 Mar 2008, Gealh, A.M.; NUP 6163, 6(3), 64,0-77,7 mm CP, mesmos dados NUP 6161, 09 Abr 2007; NUP 6164, 1, 68,2 mm CP, mesmos dados do NUP6161, 10 Fev 2008; NUP 6166, 1, 68,5 mm CP, mesmos dados do NUP 6159, 08 Jul 2007; NUP 6168, 1, 69,0 mm CP, mesmos dados do holótipo, 09 Dez 2007; NUP 6397, 30(3), 64,1-69,6 mm CP, coletados com o holótipo; NUP 6484, 7, 55,7-67,6 mm CP, município de Flórida (divisa entre Lobato), ribeirão Colorado, afluente do rio Pirapó, 23°03'37"S 51°57'00"W, 16 Dez 2008, Pavanelli, C.S. *et al.*; NUP 6602, 4, 35,1-61,0 mm CP, município de Maringá, ribeirão Maringá, afluente do rio Pirapó, 23°22'28"S 51°58'09"W, 20 Out 2005, coletor Nupélia; NUP 6396, 9, 64,2-68,3 mm CP, mesmos dados do holótipo, 28 Out 2008; NUP 10092, 10, 11, 56,9-67,2, município de Marialva, ribeirão Alegre, afluente do rio Pirapó, 23°26'34"S 51°46'11"W, 17 de Set de 2004, coletor Zawadzki, C.H.

Parátipos não utilizados na descrição. Todos coletados no Brasil, Estado do Paraná, bacia do alto rio Paraná. MZUEL 1232, 3, 29,1-53,4 mm CP, município de Londrina, ribeirão Três Bocas, afluente do rio Tibagi, 23°37'00"S 51°02'00"W, 15 de Fev de 1995; MZUSP 86162, 22(3), 33,4-35,2, mm CP, município de Telêmaco Borba, córrego próximo à ilha do saltinho, sub-bacia do rio Tibagi, 24°12'31"S 50°39'17"W, 11 Dez 2004; NUP 3962, 21, 29,4-61,3 mm CP, município de Mandaguaçu, córrego Iler, afluente do rio Atlântico, sub-bacia do rio Pirapó, 23°19'52"S 52°00'26"W, 05 Dez 2006, Pavanelli, C.S. *et al.*; NUP 5855, 2, 33,9-37,2 mm CP, município de Marialva, rio Keller, afluente do rio Ivaí, 23°38'30"S 51°51'33"W, 12 Abr 2008, Zawadzki, C.H.; NUP 5882, 1, 28,2 mm CP, município de Marialva, rio Keller, afluente do rio Ivaí, 23°38'30"S 51°51'33"W, 12 Abr 2008, Zawadzki, C.H.; NUP 5976, 2, 24,4-59,6 mm CP, município de Campo Mourão, rio Mourão, afluente do rio Ivaí, 24°02'21"S 52°16'22"W, 04 Dez 2006, Pavanelli, C.S. *et al.*; NUP 7066, 1, 46,3 mm CP, município de Campo Mourão, rio Mourão, afluente do rio Ivaí, 24°02'23"S 52°16'22"W, 07 Abril 2009, Zawadzki, C.H. *et al.*

Diagnose. *Piabina sp. n.* difere das demais congêneres pela combinação dos seguintes caracteres: dente anterior da tríade parcialmente inserido entre o primeiro e o segundo dente da primeira série (vs. dente anterior da tríade inserido posteriormente ao primeiro e segundo dente da primeira série) (Fig. 4A), maior porcentagem da distância da origem da dorsal à origem da nadadeira anal em relação ao comprimento padrão (31,1-35,3) do que *P. anhembi* e *P. argentea* (vs. 26,6-28,9 e 24,7-32,8, respectivamente), maior porcentagem da distância entre a origem da nadadeira dorsal a origem da nadadeira pélvica (29,3-33,9) (vs. 23,3-25,7 e 24,3- 30,8, respectivamente) e lobo inferior da nadadeira caudal mais fortemente enegrecido que o lobo superior (vs. lobos não enegrecidos e lobos da mesma coloração, respectivamente) (Fig. 3).

Descrição. Dados morfomericísticos apresentados na Tabela 4. Corpo alongado, suavemente comprimido, maior altura localizada uma ou duas escamas à frente da origem da nadadeira dorsal. Cabeça e tronco levemente robustos. Perfil dorsal da cabeça convexo entre a margem do lábio superior e a vertical projetada sobre a região inter-orbital, e reto ou levemente côncavo deste ponto até a extremidade distal do processo supra-occipital. Região inter-orbital levemente côncava. Perfil pré-dorsal do tronco convexo, do processo supra-occipital até a origem da nadadeira adiposa, reto ou levemente côncavo deste último ponto até a origem da nadadeira caudal. Perfil ventral do corpo convexo até o final da nadadeira anal. Perfil ventral do pedúnculo caudal levemente côncavo.

Cabeça arredondada em vista lateral e dorsal, focinho carnudo, acentuadamente convexo, boca sub-terminal, pré-maxilar longo, sobrepondo o dentário. Maxilar robusto e suavemente curvado em sua porção proximal (Fig. 4b). Lábios superior e inferior espessos. Presença de papilas sobre o lábio superior e focinho. Série de infra-orbitais presentes e bem desenvolvidos. Segundo infra-orbital sobreposto dorso-lateralmente ao terceiro. Terceiro infra-orbital bem desenvolvido, com a margem ventral próximo à junção horizontal do pré-opérculo, mas sem contato. Quarto infra-orbital reduzido, de formato aproximadamente triangular, com angulação variável, mais reduzido e com ângulo menor em indivíduos adultos. Borda posterior do terceiro e quinto infra-orbitais muito próximas ou em contato, principalmente em adultos.

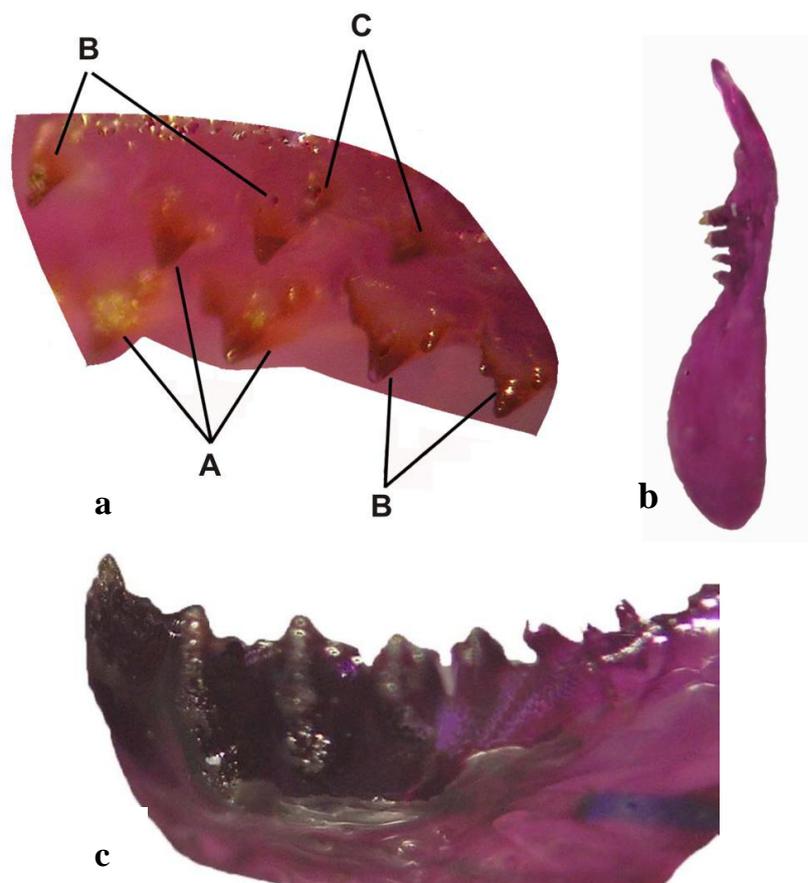


Fig. 4. *Piabina sp. n.*, parátipo, NUP 6397, 68,5 mm CP. Pré-maxilar (a), lado esquerdo, vista ventral. Maxilar (b), lado esquerdo, vista lateral. Região anterior do dentário (c), lado esquerdo, vista lateral. As letras correspondem às séries de dentes (A: segunda série (tríade), B: primeira série (principal), C: terceira série).

Pré-maxilar com três séries de dentes tricuspídeos, primeira série arqueada ou sigmoidal (Fig. 4a, seta B) com 4(45) ou raramente 5(4) dentes, primeiro e segundo dentes menores que os subsequentes, com um espaço pronunciado entre estes dois dentes em relação ao espaço entre os demais desta série; terceiro dente maior que os demais. Nos indivíduos nos quais foram encontrados cinco dentes na primeira série (NUP6602, 6637, 6484), o quinto dente encontrava-se inserido no espaço entre o segundo e terceiro dentes, de forma e tamanho similares aos dois primeiros. Segunda série composta por três dentes, formando um agrupamento triangular, ou tríade (Fig. 4a, seta A); dente medial do agrupamento de tamanho similar aos primeiros dentes da primeira série, inserido anteriormente no espaço entre o primeiro (ântero-lateral) e segundo (pósterio-lateral) da tríade e parcialmente no espaço entre o primeiro e segundo

dente da primeira série; dentes posteriores da tríade dispostos perpendicularmente ao primeiro e segundo dente da primeira série, dente ântero-lateral de tamanho similar aos demais dentes do pré-maxilar, dente póstero-lateral maior que os demais. Terceira série composta por dois dentes externos localizados entre o segundo e terceiro da primeira série (Fig. 4a, seta C). Maxilar com 3*(79) raramente 2(6) dentes, visíveis a olho desarmado, e um terceiro ou quarto dente bem menor, visualizado somente nos exemplares d&c. Dentário com 8 dentes tricuspídeos, sendo os 4*(85) primeiros maiores que os subsequentes e os 3(6) últimos dentes muito reduzidos, visualizados somente nos exemplares d&c. A cúspide central é mais desenvolvida em todos os dentes.

Nadadeira dorsal com ii,7(17) ou ii,8*(68). Origem da nadadeira dorsal localizada cerca de duas escamas posteriores à vertical que passa pela origem da nadadeira pélvica. Margem distal da nadadeira dorsal reta, dois primeiros raios ramificados ligeiramente maiores que os demais. Origem da nadadeira adiposa levemente anterior à vertical projetada sobre a inserção do último raio da nadadeira anal. Nadadeira anal com iii,16(16), 17*(40), 18(27) ou 19(2), sua margem distal levemente sigmoidal, segundo raio não ramificado e os três primeiros ramificados formando um lóbulo levemente alongado, com ganchos ósseos curtos, de base larga e extremidade pontiaguda, voltados para base do raio, um (mais comum) ou dois (raro) ganchos por segmento, presentes no segundo raio inteiro e nos oito ou nove raios ramificados subsequentes (2 d&c, Fig. 5).

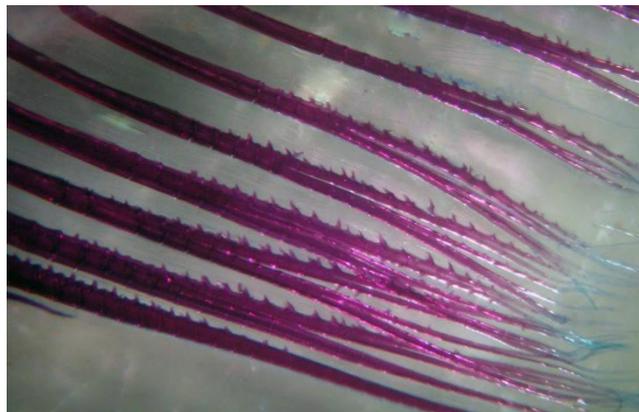


Fig. 5. *Piabina sp. n.*, parátipo, NUP 6397, 68,5 mm CP. Raios da nadadeira anal, detalhe dos ganchos.

Raios da nadadeira peitoral com i,10(12), 11(20), 12(45) ou 13(8), seu comprimento cerca de $\frac{3}{4}$ da distância contida entre a origem das nadadeiras peitoral e pélvica, com ganchos ósseos no raio inteiro e nas ramificações posteriores de todos os raios ramificados (1 d&c, NUP6397). Nadadeira pélvica com i,7(4), 8*(43) ou 9(38), sua extremidade distal alcançando o ânus quando adpressa, um único gancho ósseo por segmento (NUP 5796), presente nos três ou quatro primeiros raios ramificados, de forma e tamanho similares aos encontrados na nadadeira anal. Rastros epibrânquiais 5*(24), 6(56) ou 7(6) + 8(6), 9(39) ou 10*(40) ceratobrânquiais. Nadadeira caudal bifurcada, com lobos de tamanho e forma similares. Raios caudais principais 22; procurrentes dorsais 10 e ventrais 12. Presença de 36 vértebras totais (12 dorsais, 20 pré-caudais e 4 caudais), e 6 supraneurais, verificados em 6 exemplares d&c (NUP6397).

Na Tabela 5 são apresentados os estados dos 57 caracteres da matriz filogenética de Vari & Harold (2001). Informações adicionais à diagnose da espécie baseada nos caracteres anatômicos e relações sobre seu posicionamento filogenético encontram-se na discussão.

Tabela 4. Dados morfométricos e merísticos de *Piabina sp. n.* N=85, 6 d&c utilizados para a contagem de vértebras, medidas 1 a 14 expressas em porcentagem do comprimento padrão e 15 a 19 expressas em relação ao comprimento da cabeça.

	Holótipo	Média	Amplitude
Comprimento Padrão (mm)		66,6	35,5-73,3
1. Altura do pedúnculo caudal	10,2	10,5	9,3-12,8
2. Comprimento da cabeça	23,4	23,3	21,7-25,7
3. Comprimento da nadadeira anal	17,0	17,3	14,2-19,5
4. Comprimento da nadadeira dorsal	21,5	23,1	21,5-25,7
5. Comprimento da nadadeira peitoral	17,7	20,0	17,5-22,6
6. Comprimento da nadadeira pélvica	13,6	15,5	13,6-17,7
7. Comprimento do pedúnculo caudal	13,7	14,4	10,9-17,7
8. Distância entre a origem da nadadeira dorsal a nadadeira peitoral	39,0	37,4	31,3-40,4
9. Distância do focinho até origem da nadadeira dorsal	53,1	51,8	47,7-54,1
10. Distância do focinho até origem da nadadeira peitoral	24,5	23,9	21,9-26,0
11. Distância do focinho até origem da nadadeira pélvica	47,8	47,3	43,9-49,4
12. Distância entre a origem da nadadeira dorsal a junção hipural	52,1	53,8	48,8-57,1
13. Distância entre a origem da nadadeira dorsal a nadadeira anal	32,1	32,6	29,6-35,3
14. Distância entre a origem da nadadeira dorsal a nadadeira pélvica	31,7	31,3	27,5-33,9
15 Comprimento póstero-orbital.	39,1	38,8	34,5-45,1
16 Comprimento do focinho	26,2	26,7	21,0-30,3
17 Diâmetro orbital	32,2	35,1	30,2-40,2
18 Distância interorbital	32,4	34,5	28,5-36,8
19 Largura da boca	26,3	25,4	20,0-31,5
		Moda	Amplitude
1. Escamas da linha lateral	40	40	39-44
2. Séries de escamas entre a origem da nadadeira dorsal e a linha lateral	4	4	4-5
3. Séries de escamas entre a origem da nadadeira anal e a linha lateral	4	3	3-4
4. Escamas medianas pré-dorsais	13	12	11-13
5. Raios ramificados da nadadeira dorsal	ii 8	ii 8	ii 8
6. Raios ramificados da nadadeira anal	17	ii 17	ii 15-19
7. Raios ramificados da nadadeira pélvica	8	9	7-9
8. Raios ramificados da nadadeira peitoral	10	12	10-14
9. Vértebras			36

Tabela 5. Estados dos caracteres de *Piabina sp. n.*, para os 57 caracteres apresentados por Vari & Harold (2001) na filogenia do gênero. Os caracteres estão listados em ordem crescente, organizados por grupos, separados por colunas.

Caracteres	1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-57
	0	0	1	1	0	0
	0	0	0	0	1	0
	1	0	0	0	1	0
	0	1	0	1	0	0
Estados	0	0	0	1	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	0	0	0
	0	0	0	0	1	
	0	1	1	0	0	
	0	0	1	0	0	

Coloração em álcool. Região dorsal e médio-lateral da cabeça castanhas, incluindo o focinho até a região em torno dos olhos, lábio superior e maxilar. Coloração mais intensa sobre o osso supra-occipital do que nas demais regiões. Bochecha, opérculo e pré-opérculo prateados. Região ventral da cabeça, abaixo da horizontal que passa pela fenda bucal, sem pigmentação. Mancha umeral cinza-escura, verticalmente alongada, bem evidente, com prolongamentos variáveis para cima e para baixo, conferindo um formato fusiforme.

Coloração de fundo do tronco pálida e amarelada, escamas dorso-laterais com a borda posterior escurecida por cromatóforos castanhos, com maior intensidade à medida que se aproxima da linha médio-dorsal. Dorso do corpo castanho-escuro, com uma faixa contínua do focinho até a origem da nadadeira caudal. Faixa lateral do corpo difusa e arqueada, localizada aproximadamente uma série de escamas acima da linha lateral, cinza-escura, mais evidente após a região da vertical projetada pouco antes da origem da

nadadeira dorsal e se estendendo fracamente sobre os raios caudais medianos. Mancha sobre o pedúnculo caudal cinza-escuro, horizontalmente alongada e difusa.

Nadadeiras pares com poucos cromatóforos pretos dispersos sobre as membranas. Nadadeira dorsal enegrecida em sua porção médio-central. Nadadeira anal enegrecida especialmente sobre os raios inteiros, menos evidente na região sobre os raios ramificados. Nadadeira caudal suavemente escurecida, com pigmentação mais concentrada sobre o lobo inferior (mais evidente nos exemplares do rio Pirapó).

Coloração em vida (baseada em vídeo e foto de um indivíduo logo após a coleta, cedidos pela coletora Ana Maria Gealh, rio Pitangui, Ponta Grossa, Nov. de 2008). Coloração geral da cabeça e tronco prateada. Porção dorso-lateral, logo acima da faixa lateral, dourada, escamas dorso-laterais assim como na descrição da coloração em álcool. Mancha umeral, mascarada por depósitos de guanina. Nadadeira dorsal e adiposa pigmentadas de vermelho desde sua base até a porção médio-proximal. Membranas da nadadeira anal pigmentadas de vermelho, coloração preta sobre os raios em toda sua extensão; membranas que recobrem os raios inteiros e a porção distal dos dois primeiros raios ramificados esbranquiçadas. Nadadeiras pares iridescentes. Base da nadadeira caudal pigmentada de amarelo, com pigmentação negra sobre a porção médio-distal do lobo inferior da nadadeira caudal, lobo superior iridescente.

Dimorfismo sexual. Foram encontrados ganchos ósseos (Fig. 5) nas nadadeiras anal e pélvica em seis indivíduos, todos machos maduros (NUP6397). Alguns outros indivíduos machos, fora do período reprodutivo, abertos pela coletora Ana Maria Gealh, não apresentaram ganchos, sugerindo que esta diferença sexual ocorre somente no período reprodutivo, constituindo dimorfismo sexual secundário. Os exemplares analisados não apresentavam necessariamente ganchos em todas as nadadeiras onde eles foram encontrados.

Distribuição. *Piabina sp. n.* é conhecida da localidade-tipo, rio Pitangui (Figs. 6-8), ribeirão Três Bocas e córrego sem nome, bacia do rio Tibagi. Ribeirão Maringá, ribeirão Alegre e rio Colorado, bacia do rio Pirapó e também do rio Keller e rio Mourão, bacia do rio Ivaí, alto rio Paraná. Dois exemplares coletados em álcool e utilizados para

a análise molecular do rio Amambai, em MS, bacia do alto rio Paraná, pertencem provavelmente à nova espécie, no entanto, devido à falta de informações sobre a localidade tipo e dados de coleta não foi possível a inclusão deste lote nos parátipos.

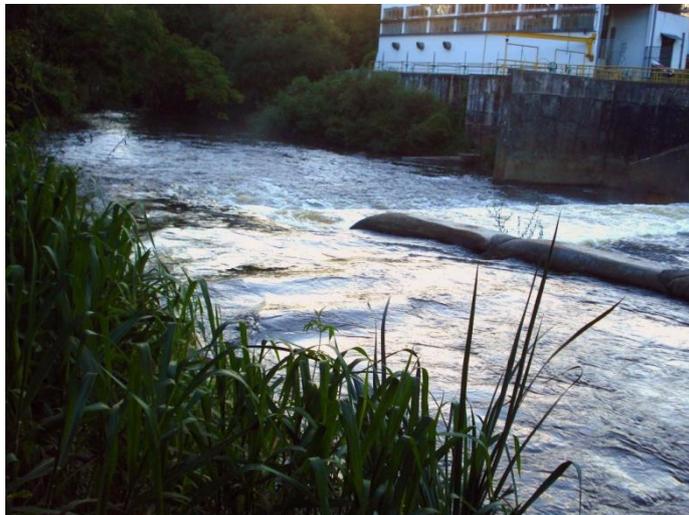


Fig. 6. Localidade-tipo de *Piabina sp. n.*, rio Pitanguí, ponto acima da usina Pitanguí, município de Ponta Grossa, Paraná, Brasil (25°01'35"S 50°03'59"W).

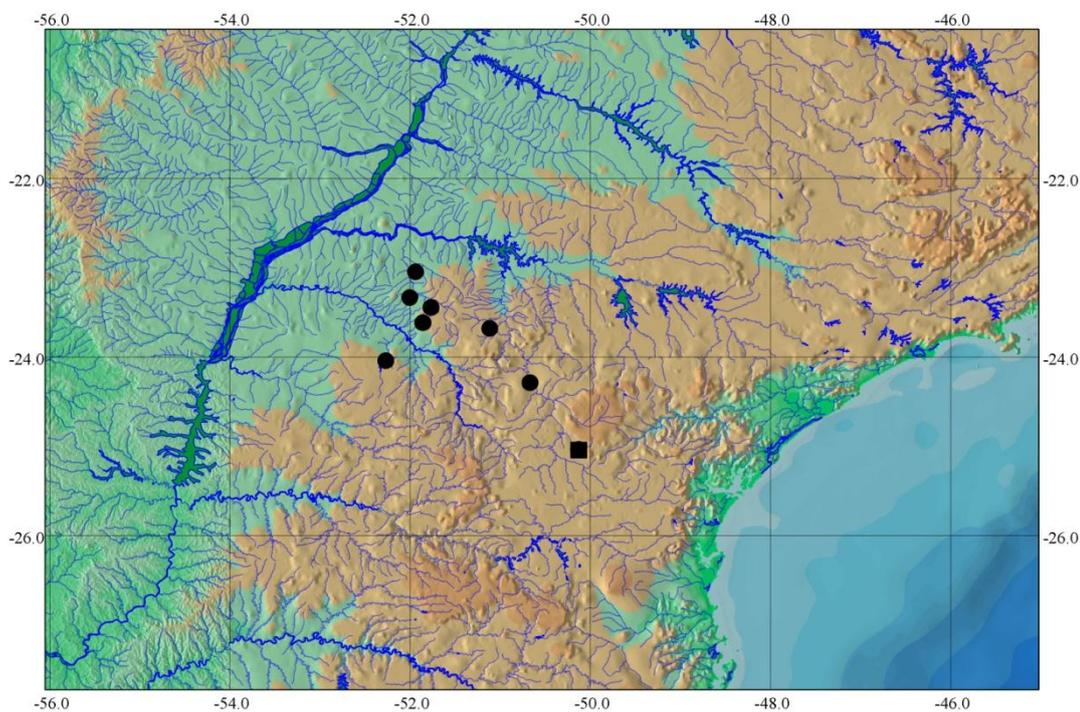


Fig. 7. Mapa parcial da região sul-sudeste do Brasil, evidenciando a bacia do alto rio Paraná no Estado do Paraná, mostrando a distribuição de *Piabina sp. n.* O quadrado representa a

localidade-tipo (rio Pitanguí) e os círculos os parátipos (rios Ivaí, Pirapó e Tibagi). Cada localidade pode estar representada por mais de um lote.

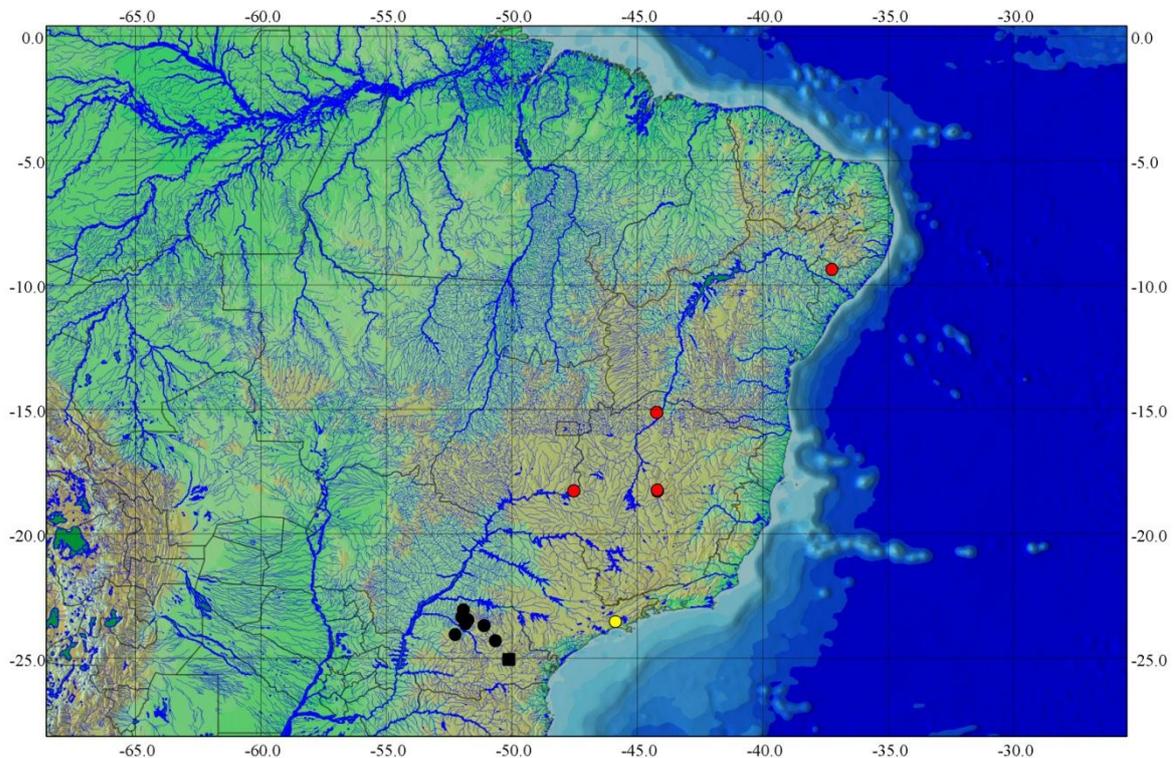


Fig. 8. Mapa parcial do Brasil apresentando a distribuição geográfica das espécies válidas de *Piabina*, aqui analisadas genética e taxonomicamente. Os símbolos em preto representam a distribuição de *Piabina sp. n.*, os em amarelo de *P. anhembi*, e em vermelho de *P. argentea*.

Material comparativo analisado: Brasil: *Bryconamericus iheringii*, MZUSP 19055, 22(9), 30,4-36,7 mm CP, Rio Grande do Sul, Arroio Grande, Arroio Chasqueiro, bacia da lagoa Mirim. *Bryconamericus aff. iheringii*, NUP 7886, 3, 74,9-77,4 mm CP, Paraná, Ponta Grossa, rio Pitanguí, afluente do rio Tibagi, bacia do alto rio Paraná. *Caiapobrycon tucuruí*, NUP 9002, 7, 22,0-28,0 mm CP, Pará, São Geraldo do Araguaia, ribeirão Sucupira, bacia do rio Tocantins Araguaia. *Creagrutus anary*, MZUSP 98290, 4(2), 32,9-44,1 mm CP, Rondônia, cachoeira de Santo Antônio, bacia do rio Madeira. *Creagrutus atrisignum*, MZUSP 95511, 2, 43,8-53,9 mm CP, Goiás, rio Arraial, bacia do rio Tocantins. *Creagrutus barrigai*, MZUSP 30753, 9(2), 45,3-47,8 mm CP, Acre, rio Tarauacá, bacia do rio Juruá. *Creagrutus britiskii*, MZUSP 50540, 12(3), 44,3-47,7 mm CP, Goiás, ribeirão Macambira, bacia do rio Tocantins. *Creagrutus cochui*,

MZUSP 17536, 1, 79,12 mm CP, Amazonas, Igarapé da cachoeira Cuiauí, bacia do rio Içá. *Creagrutus figueiredoi*, MZUSP 89069, 101(10), 34,2-38,3 mm CP, Goiás, rio do Peixe, bacia do Araguaia. *Creagrutus ignotus*, MZUSP 50165, 3 (1), 33,03 mm CP, Mato Grosso, riacho 1 (um), afluente do rio Preto, bacia do rio Tapajós. *Creagrutus melanzomus*, MZUSP 101979, 16(8), 36,7-38,1 mm CP, Amapá, cachoeira São Raimundo (em frente à comunidade de Uirataparú, montante da cachoeira de Santo Antônio do rio Jari), bacia do rio Jari. *Creagrutus menezesi*, MZUSP 50545, parátipos, 8(3), 50,2-65,8 mm CP, Goiás, ribeirão Paranoá do Meio, bacia do rio Tocantins, Iaciara. *Creagrutus cf. meridionalis*, MZUSP 59255, 2, 51,7-52,9 mm CP, Mato Grosso, rio Taquari, bacia do rio Paraguai. *Creagrutus meridionalis*, MCP 18738 11(2), 56,18-61,4 mm CP, Mato Grosso, ribeirão Chiqueirão, afluente do rio Jangada, bacia do rio Paraguai. *Creagrutus phasma*, MZUSP 85139, 7(3), 46,7-55,02 mm CP, Amazonas, rio Tiquié (entre a cachoeira do Caruru e a comunidade Boca do Sal), bacia do rio Tiquié. *Creagrutus saxatilis*, MZUSP 84053, 10(5), 41,2-59,4 mm CP, Tocantins, rio Peixinho, bacia do rio Manuel Alves (próximo ao município de Rio da Conceição). *Creagrutus seductus*, MZUSP 51029, parátipos, 9(4), 60,25-70,56 mm CP, Mato Grosso, córrego Fundo, afluente do rio Jangada, bacia do rio Tocantins, Barra do Garças. *Creagrutus tuyuka*, MZUSP 81318, 108(10), 52,9-55,3 mm CP, Goiás, rio Tiquié, afluente do rio São Marcos, bacia do rio Negro. *Creagrutus varii*, MZUSP 81069, parátipos, 20(5), 34,25-36,70 mm CP, Goiás, Catalão, Córrego da Prata, afluente do rio São Marcos, bacia do rio Paranaíba, alto rio Paraná. DZSJRP 5424, parátipos, 8(3), 16,6-17,4 mm CP, Goiás, Catalão, rio São Marcos, afluente do rio Paranaíba, bacia do alto rio Paraná. *Creagrutus vexillapinnus*, MZUSP 92515, 24(10), 45,8-51,9 mm CP, Amazonas, igarapé Castanha, afluente do rio Tiquié, bacia do rio Negro. *Knodus moenkhausii*, NUP 7861, 5, 28,0-39,6 mm CP, Paraná, São Jorge do Patrocínio, rio Paracá, afluente do rio Paraná, bacia do alto rio Paraná. *Piabina anhemi*, LBP 6788, 26(5), 65,4-70,2 mm CP, São Paulo, Salesópolis, rio Paraitinguinha, afluente do rio Tietê, bacia do alto rio Paraná. MCP 25270, parátipos, 20(10), 52,0-60,7 mm CP, São Paulo, Salesópolis, rio Paraitinguinha, afluente do rio Tietê, bacia do alto rio Paraná. *Piabina argentea*, MCP 27892, 205(10), 34,6-53,1 mm CP, Minas Gerais, Abadias dos Dourados, rio Preto, bacia do rio Paranaíba, bacia do alto rio Paraná. MCP 33773, 10(5), 32,1-46,7 mm CP, Minas Gerais, São Francisco, rio São Francisco, bacia do rio

São Francisco. MCP 31114, 86(10), 17,6-22,3, mm CP, Alagoas, Santana do Ipanema, rio Ipanema, bacia do rio São Francisco. NUP 7270, 20, 33,4-43,8 mm CP, Minas Gerais, Santo Hipólito, rio Pardo Grande, afluente do rio das Velhas, bacia do rio São Francisco. NUP 8908, mesmos dados do NUP 7270. Bolívia: *Creagrutus beni*, MZUSP 27808, 5(2), 43,6-53,4 mm CP, Villa Tunarí, rio Chapare, bacia do rio Chapare. Equador: *Creagrutus flavescens*, MZUSP 77841, 2(1), 33,7 mm CP, Pastaza, rio Pastaza (mouth a brazo lateral), bacia do rio Amazonas.

4 DISCUSSÃO

A hipótese de que a nova espécie é um membro de *Piabina* se sustenta pela posse dos seguintes caracteres: quarto infraorbital aproximadamente triangular, com extremidade posterior excluída da margem da série de infraorbitais (caráter 31: estado 1) e escápula sem processo estreito em forma de anel, formando a borda anterior do forame escapular (caráter 48, estado 1), as duas sinapomorfias que definem o gênero (Vari & Harold, 2001). Além disso, compartilha onze sinapomorfias congruentes com a hipótese de que *Piabina* é grupo irmão de *Creagrutus*: 1) superfície dentívora do pré-maxilar triangular em vista ventral; 2) ligamento entre o canto póstero-ventral do pré-maxilar e superfície anterior do maxilar bem desenvolvida; 3) término anterior do dentário distintamente posterior ao término anterior do pré-maxilar; 4) ectopterigóide e quadrado sem contato; 5) superfície dorso-articular da hiomandíbula assimétrica com processo dorso-lateral; 6) expansão da porção anterior do mesetímóide em uma placa vertical, relativamente grande e transversalmente achatada; 7) fossa hiomandibular visível lateralmente, como uma reorientação de uma porção do esfenótico; 8) margem anterior do esfenótico com processo lamelar anterior; 9) abertura delimitada pela escápula, coracóide, cleitro, anterior ao forame escapular presente e 10) dois ou três epurais presentes.

Somando-se a isso, a nova espécie apresenta a grande maioria dos caracteres propostos por Vari & Harold (2001) no mesmo estado que *P. argentea* e *P. anhembi*. Os estados derivados dos caracteres 15, 20 e 44 encontrados em *P. anhembi* e complementares à diagnose desta espécie em relação à *P. argentea* se mantiveram quando comparados com a nova espécie. *Piabina sp. n.* apresentou estes caracteres no mesmo estado que *P. argentea*.

Piabina sp. n. diferiu de suas congêneres nos caracteres 19, 29, 30, 34 e 55 (observados em seis exemplares d&c). A nova espécie apresentou os estados derivados dos caracteres 19, 29, 30 (ânguloarticular horizontalmente encurtado, porção anterior do canal laterosensorial no primeiro infraorbital alcançando ou se estendendo além da margem anterior do corpo principal da ossificação; porção posterior do primeiro infraorbital sobrepondo-se à porção anterior do segundo infraorbital, respectivamente) no mesmo estado comum à maioria das espécies de *Creagrutus*.

A posse destes estados em *Piabina sp. n.* em relação às outras espécies válidas para o gênero pode ser reflexo de um posicionamento derivado desta nova espécie em relação às demais. Sobretudo, a pobre resolução e baixo índice de consistência (0,4) encontrados na filogenia proposta por Vari & Harold (2001), somados à formação de uma politomia com a grande maioria das espécies de *Creagrutus*, podem indicar a presença de caracteres pouco informativos ou homoplasias. Mesmo diante disso, a análise dos estados encontrados para a nova espécie corrobora a hipótese de monofiletismo de *Piabina* proposta pelos autores supracitados. Além disso, os outros dois caracteres (caráter 34, dentição do terceiro infra-faringobranquial presente e 55, presença de dois epurais) em que a nova espécie apresentou divergências não se encontram polarizados e são comuns a outras espécies de Characiformes e muito variáveis dentro de *Creagrutus*.

Creagrutus varii Ribeiro, Benine & Figueiredo, 2004, descrita do córrego da Prata, afluente do rio Paranaíba, alto rio Paraná, considerada atualmente a espécie basal no gênero e próxima de *Piabina*, compartilha com a nova espécie o mesmo estado em 26 caracteres (mais detalhes comparar tabela 5, com tabela II de Ribeiro *et al.* (2004)). A hipótese do posicionamento basal de *C. varii* está fundamentada na ausência de vários estados derivados comuns à maioria das espécies de *Creagrutus*. Embora uma análise filogenética, com o objetivo de verificar o posicionamento da nova espécie no clado *Piabina+Creagrutus* não tenha sido realizada, a simples comparação dos estados dos caracteres encontrados na nova espécie sugere *Piabina sp. n.* seja provavelmente mais próxima de *C. varii*.

É válido ressaltar, que um dos exemplares de *P. argentea* utilizados na análise molecular foi coletado próximo à localidade tipo de *C. varii*, em um afluente do rio Paranaíba, no município de Catalão-GO. Esta informação contradiz a hipótese de especiação alopátrica entre *Piabina* e *Creagrutus* proposta por Vari e Harold *et al.*, 2001.

Javonillo *et al.* (2010), estudando a sistemática molecular da família Characidae, encontraram evidências que suportavam a hipótese de que algumas espécies não descritas utilizadas na análise alocadas em *Knodus* poderiam pertencer a *Piabina* e *Bryconadenos*. Além disso, Ribeiro *et al.* (2004) destacaram a similaridade entre a dentição de algumas espécies de *Creagrutus* em duas séries de dentes (*C. varii*, *C.*

cracentis e *C. maxillaris*) como em *Bryconamericus*, e assumem ser mais parcimonioso interpretar que a dentição característica destas espécies subdividida em três componentes foi adquirida independentemente entre os dois gêneros. Tanto *Piabina sp. n.* quanto *P. anhembi* parecem apresentar uma condição intermediária de dentição do pré-maxilar, similar a *Bryconamericus*.

Os resultados encontrados na análise filogenética molecular das espécies de *Piabina* corroboram com os resultados da análise taxonômica. A formação dos três clado distintos A, B e C sustenta a hipótese de monofiletismo do gênero.

Em um estudo recente, Pereira *et al.* (2011), utilizando o gene COI para estudo populacional de *P. argentea* e *P. anhembi*, detectaram a formação de sete clados distintos, sendo seis de populações identificadas como *P. argentea* (A, B, C, D, E, F) e um formado por *P. anhembi*. Segundo os autores, os valores de distâncias genéticas encontrados evidenciam que *P. argentea* é na verdade um complexo de seis espécies, das quais cinco ainda não estão descritas. As sequências COI da espécie nova juntamente com as sequências depositadas no *Genbank* por Pereira *et al.* (2011) foram analisadas com escopo de verificar se a mesma refere-se a algum dos seis clados de *P. argentea*. Os valores de distância entre *Piabina sp. n.* e os clados foram superiores a 4,2%, exceto em relação ao clado A que foi de 0,9%. Além disso, o valor intra-específico observado na nova espécie aqui descrita foi similar ao encontrado para o clado A (1,0 vs 0,9%, respectivamente). Desta forma foi possível confirmar que a nova espécie refere-se ao clado A, e ampliar a distribuição desta espécie também para as bacias dos rios Piquiri e Paranapanema, além do Pirapó e Tibagi.

Embora as distâncias genéticas interespecíficas não tenham atingido o patamar de 10 vezes maior que a distância intraespecífica, critério adotado pelo *Consortium of Barcode of Life* (CBOL) proposto por (Hebert *et al.*, 2003) para que uma espécie seja considerada válida, vários autores (*e.g.* Benine *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2011) têm utilizado com frequência essa abordagem para delimitação de espécies de peixes, considerando distâncias genéticas médias inferiores à estipulada por Hebert (2003) como suficientes para considerar um táxon distinto. As evidências taxonômicas e as análises filogenéticas moleculares, amparadas pelas distâncias genéticas médias encontradas entre as espécies de *Piabina*, sustentam a validade da nova espécie. Além disso, por se tratar de um valor arbitrário, ou seja, que não considera as possíveis

diferentes taxas evolutivas entre os diversos grupos, a utilização deste critério deve ser avaliada para cada estudo realizado.

O alto valor de diversidade genética intra-específica em *Piabina sp. n.* pode ser corroborado por algumas diferenças nos aspectos morfológicos. A população de *Piabina sp. n.* da bacia do rio Pirapó apresentou diferenças em relação à população do rio Pitanguí, como coloração do lobo inferior da nadadeira caudal não tão evidente e diferenças nas médias dos dados morfométricos.

Em relação à *P. argentea*, os resultados aqui encontrados também corroboram o estudo supracitado. A espécie-tipo do gênero, *P. argentea*, compõe o clado C, a análise das sequências da bacia do rio Paranaíba e do rio São Francisco aqui obtidas são idênticas às encontradas por Pereira *et al.* (2011). Com isso, é possível afirmar que *P. argentea* ocorre nas bacias do rio São Francisco e bacia do rio Paranaíba, alto rio Paraná. É possível que os exemplares previamente identificados como *P. argentea*, coletados nos afluentes da margem esquerda do rio Paraná (*e.g.* rio Iguatemi, Suárez & Lima-Jr, 2009), tratem-se de outra(s) espécie(s), ainda não descrita(s).

O mesmo fato ocorreu para *P. anhembi*, a sequência aqui utilizada foi idêntica à apresentada no estudo supracitado. Material, tanto taxonômico quanto para análise molecular das outras quatro possíveis novas espécies relatadas pelos autores, não foram contemplados neste estudo. Uma nova busca e análise de material depositado nas coleções zoológicas destas localidades para o estudo taxonômico é fundamental para a confirmação e validação destas possíveis novas espécies.

Aparentemente, a nova espécie encontra-se em alopatria com *P. argentea* e *P. anhembi*, pois não foram encontrados lotes de *P. argentea* na área de ocorrência de *Piabina sp. n.* Embora alguns autores relatem eventos de captura de cabeceiras entre as bacias dos rios São Francisco e Paraná para explicar a atual distribuição das espécies, Hubert & Renno (2006) apontam maior compartilhamento de espécies entre as áreas de endemismo da bacia do São Francisco e bacias costeiras do norte do que com a bacia do rio Paraná-Paraguai. Material proveniente das bacias costeiras, localidade de ocorrência de *P. argentea*, de acordo com a distribuição geográfica proposta por Vari & Harold (2001), não foi contemplado tanto no presente estudo nem em Pereira *et al.* (2011). Considerando os apontamentos de Hubert & Renno (2006) é possível que *P. argentea* realmente ocorra nas bacias costeiras.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados neste estudo é possível afirmar que a utilização da técnica DNA *barcodes* associada a estudos taxonômicos é uma ferramenta muito útil para o reconhecimento de espécies crípticas. As análises filogenéticas moleculares, amparadas pelas distâncias genéticas médias encontradas entre as espécies de *Piabina*, sustentam a validade da nova espécie aqui descrita.

Apesar de uma análise filogenética que objetivasse verificar o posicionamento da nova espécie no clado *Piabina+Creagrutus* não ter sido realizada, a comparação entre os estados dos caracteres encontrados na nova espécie sugere que *Piabina sp. n.* seja provavelmente mais próxima de *C. varii*, considerada a espécie mais basal do gênero. Isto contribui para fortalecer a hipótese de especiação simpátrica entre *Piabina* e *Creagrutus*.

Os dados moleculares e taxonômicos corroboram ainda a hipótese de distribuição geográfica para as espécies do gênero. Assim, confirmou-se endemismo de *P. anhembi* nas cabeceiras do rio Tietê e registros de *P. argentea* nas sub-bacias dos rios Ivaí, Pirapó, Piquiri, Paranapanema e Tibagi podem ser considerados equivocados, sendo que sua distribuição parece ser restrita às bacias dos rios São Francisco e Paranaíba. Por sua vez, a ocorrência da nova espécie foi verificada nos rios Ivaí, Pirapó, Pitangui e Tibagi. Portanto, exemplares capturados nestas localidades correspondem, na realidade, à nova espécie aqui descrita, ou podem ser atribuídos a espécies dos gêneros *Bryconamericus*, *Knodus*, *Caiapobrycon* e/ ou *Creagrutus*, que apresentam elevada similaridade morfológica com espécies de *Piabina*, principalmente relacionadas à forma da boca e distribuição dos dentes no pré-maxilar, que foram pouco estudadas nesta região. Dessa maneira, acreditamos que, com a concretização de estudos que acrescentem informações morfométricas não mencionadas ou descritas anteriormente, bem como que esclareçam os reais padrões de distribuição geográfica das espécies, juntamente com a corroboração de dados moleculares, poderemos entender melhor a história evolutiva destas espécies, que apresentam elevada similaridade morfológica entre si e com outros gêneros que, ainda nos dias atuais, geram muitos erros de identificação.

REFERÊNCIAS

- Agnése, J. F., B. Adépo-Gourené, E. K. Abban & Y. Fermon. 1997. Genetic differentiations among natural populations of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). *Heredity*, 9:88-96.
- Alexander, R. McN. 1964. Adaptation in the skulls and cranial muscles of South American characinoid fish. *Journal of the Linnean Society (Zoology)*, 45:169-190.
- Avise, J. C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Massachusetts: Sinauer Associates, 551p.
- Benine, R. C., T. C. Mariguela, & C. Oliveira. 2009. New species of *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) with comments on the *Moenkhausia oligolepis* species complex. *Neotropical Ichthyology*, 7(2):161-168.
- Boulenger, G.A. 1887. An account of the fishes collected by Mr. C. Buckley in Eastern Ecuador. *Proceedings of the Zoological Society*, 2:274-283.
- Britski, H. A., K. Z. S. Silimon & B. S. Lopes. 2007. *Peixes do pantanal: Manual de identificação*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 230 p.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85:407-415.
- Eigenmann, C. H. 1910. Catalogue of the fresh-water fishes of tropical and south temperate America. Reports of the Princeton University Expeditions to Patagonia 1896-1899. *Princeton University* 3(4):375-511.
- Eigenmann, C. H., A. Henn, & C. Wilson. 1914. New fishes from Western Colombia, Ecuador, and Peru. *Indiana University Studies*, 19:1-15.
- Eschmeyer, W. N. & Fricke, R. (eds.). *Catalog of Fishes electronic version* (14 July 2011). (Disponível online no site: <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>)
- Galves, W., O. A. Shibatta & F. C. Jerep. 2007. Fish, Taquara river basin, northern of the state of Paraná, Brazil. *Check List*, 3(3):253-259.
- Géry, J. 1977. *Characoids of the World*. T. F. H. Publications, Neptune City, New Jersey, 672 p.
- Guindon, S. & O. Gascuel. 2003. PhyML - A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52:696-704.
- Günther, A. 1864. *Catalogue of the fishes in the collection of the British Museum*. London, 5:xii+455p.
- Hall, A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleotid and Acids*, 41(Symposium series):95-98.

- Harold, A. S. & R. P. Vari. 1994. Systematics of the Trans-Andean species of *Creagrutus* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 551:1-31.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball & J. R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*, 270:313-321.
- Hebert P. D. N., M. Y. Stoeckle, T. S. Zemlak & C. M. Francis. 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology*, 2(10):1657-1663.
- Hoffmann, A. C., M. L. Orsi & O. A. Shibatta. 2005. Diversidade de peixes do reservatório da UHE Escola Engenharia Mackenzie (Capivara), Rio Paranapanema, bacia do alto rio Paraná, Brasil, e a importância dos grandes tributários na sua manutenção. *Iheringia*, 95(3):319-325.
- Hubert, N. & J. F. Renno. 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, 33(8):1414-1436.
- Javonillo, R., L. R. Malabarba, S. H. Weitzman & J. R. Burns. 2010. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(2):498-511.
- Johnson, K. P. & D. H. Clayton. 2000. Nuclear and mitochondrial genes contain similar phylogenetic signal for pigeons and doves (Aves: Columbiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14:141-151.
- Kimura, M. A. 1980. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16:111-120.
- Kumar, S. & S. R. Gadagkar. 2000. Efficiency of the neighbor-joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large phylogenies. *Journal of Molecular Evolution*, 51:544-553.
- Lima, D., J. E. P. Freitas, M. E. Araújo & A. M. Solé-Cava. 2005. Genetic detection of cryptic species in the frill fin goby *Bathygobius soporator*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 320:211-223.
- Melo, B. F., R. C. Benine, T. C. Mariguela & C. Oliveira. 2011. A new species of *Tetragonopterus* Cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae: Tetragonopterinae) from the rio Jari, Amapá, northern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 9(1):49-56.
- Mahnert, V. & J. Géry. 1988. Les genres *Piabarchus* Myers et *Creagrutus* Günther du Paraguay, avec la description de deux nouvelles espèces (Pisces, Ostariophysi, Characidae). *Revue Française du Aquariologie Herpetologie*, 15(1):1-8.
- Mirande, J. M. 2009. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). *Cladistics*, 25:574-613.
- Mirande, J. M. 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology*, 8(3): 385-568.

- Monesi, N., M. Jacobs-Lorena & M. L. Paço-Larson. 1998. The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hygida* is specifically transcribed early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, 107(8):559-569.
- Myers, G. S. 1928. New Fresh-Water Fishes from Peru, Venezuela, and Brazil. *Annals and Magazine of Natural History*, series 10(2):83-90
- Nei, M. & S. Kumar. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. New York, Oxford University Press. 333p.
- Nelson, J. S. 2006. *Fishes of the world*. New York, John Wiley & Sons, New York, 601p.
- Padial, J. M. & I. De La Riva. 2010. A response to recent proposals for integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101:747-756.
- Pearson, N. E. 1924. The fishes of the eastern slope of the Andes, I: The fishes of the Rio Beni basin collected by the Mulford Expedition. *Indiana University Studies*, 11(64):1-83.
- Pereira, L. G., M. F. Pazian, R. Hanner, F. Foresti & C. Oliveira. 2011. DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes:Characidae) from the Upper Paraná Basin of Brazil. *Mitochondrial DNA*:1-10. (Disponível online no site: <http://informahealthcare.com/>).
- Pons, J., T. G. Barraclough, J. Gomez-Zurita, A. Cardoso, D. P. Duran, S. Hazzel, S. Kamoun, W. D. Sumlin, A. P. Vogler. 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, 55:595-606.
- Posada, D. & K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14:817-818.
- Prioli, S. M. A. P., A. J. Prioli, H. F. Júlio-Jr, C. S. Pavanelli, A. V. Oliveira, H. Carrer, D. M. Carraro & L. M. Prioli. 2002. Identification of *Astyanax altiparanae* in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, 25:421-430.
- Reinhardt, J. T. 1867. Om trende, formeentligt ubeskrevne fisk af characinernes eller karpelaxenes familie. Oversigt over det kongelige danske videnskabernes selskabets forhandl og dets Medlemmers Arbejder, 49-68.
- Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr. 2003 (Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Edipucrs, 729p.
- Ribeiro, A. C., R. C. Benine, & C. A. Figueiredo. 2004. A new species of *Creagrutus* Günther (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), from the upper Rio Paraná basin, Central Brazil. *Journal of Fish Biology*, 64:597-611.
- Rosenthal, A., O. Coutelle & M. Craxton. 1993. Large-scale of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Research*, 21(1):173-174.
- Sandoval-Castillo, J., A. Rocha-Olivares, C. Villavicencio-Garayzar & E. Balart. 2004. Cryptic isolation of Gulf of California shovelnose guitarfish evidenced by mitochondrial DNA. *Marine Biology*, 145:983-988.

- Shibatta, O. A., A. M. Gealh & S. T. Bennemann. 2007. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi. *Biotaneotropica*, 7(2):125-134.
- Silva, J. F. P. & C. C. Kaefer. 2003. Uma nova espécie de *Piabina* Reinhardt, 1867 (Teleostei: Ostariophysi: Characidae) para o alto rio Tiête, São Paulo, Brasil. *Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia da PUCRS, Série Zoologia*, 16(1):53-65.
- Sivasundar, A., E. Bermingham & G. Ortí. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10:407-417.
- Suárez, Y. R. & S. E. Lima-Júnior, 2009. Spatial and temporal variation in stream fish assemblages of Guiraí River Basin, Upper Paraná Basin. *Biota Neotropica*, 9(1):101-111.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other Methods Version 4. Sunderland, Ma: Sinauer Associates.
- Taylor, W. R. & G. C. van Dyke. 1985. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium*, 9(2):107-119.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins & T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequencing weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680.
- Vari, R. P. & A. S. Harold. 1998. The genus *Creagrutus* (Teleostei: Characiformes: Characidae): monophyly, relationships, and undetected diversity. Pp. 245-260. In: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Edipucrs, 603p.
- Vari, R. P. & A. S. Harold. 2001. Phylogenetic study of the Neotropical fish genera *Creagrutus* Günther and *Piabina* Reinhardt (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), with a revision of the Cis-Andean species. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 613:1-239.
- Vazzoler, A. E. M. 1996. *Biologia da reprodução de peixes Teleósteos: teoria e prática*. Maringá: EDUEM. 169p.
- Ward, R. D., T. S. Zemlak, B. H. Innes, P. R. Last & P. D. N. Hebert. 2005. DNA Barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360(1462): 1847-1857.
- Ward, R. D. 2009. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular Ecology Resource*, 9:1077-1085.
- Weitzman, S. H. 1974. Osteology and evolutionary relationships of the Sternopychidae, with a new classification of stomioid families. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 153(3):327-478.
- Winterbottom, R. 1980. Systematics, osteology and phylogenetic relationships of fishes of the ostariophysan subfamily Anostominae (Characoidei, Anostomidae). *Life Science Contributions, Royal Ontario Museum*, 123: 1-112.

Yang, R., X. B. Wu, P. Yan & X. Q. Li. 2010. Using DNA barcodes to identify a bird involved in a bird strike at a Chinese airport. *Molecular Biology reports*, 37:3517-3525.