

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

JOÃO PAULO DE MORAIS-SILVA

Filogeografia e DNA *barcoding* de *Trichomycterus davisi* na bacia do rio  
Paraná

MARINGÁ, PR

2016

JOÃO PAULO DE MORAIS-SILVA

Filogeografia e DNA *barcoding* de *Trichomycterus davisi* na bacia do rio  
Paraná

Dissertação apresentada ao Curso de  
Mestrado do Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Comparada, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre  
em Biologia das Interações Orgânicas.

**Orientador:** Alberto José Prioli  
**Coorientador:** Weferson Júnio da Graça

MARINGÁ, PR  
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

M827f      Morais-Silva, João Paulo de  
            Filogeografia e DNA barcoding de *Trichomycterus*  
            *davisi* na bacia do rio Paraná/ . -- Maringá, 2016.  
            56 f. il. : figs., color., tabs., mapas.

            Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli.  
            Coorientador: Prof. Dr. Weferson Júnio da Graça.  
            Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
            Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de  
            Pós-Graduação em Biologia Comparada, 2016.

            1. *Trichomycterus davisi*. 2. Caracterização  
            filogeografia. 3. Complexo de espécie. 4.  
            Delimitação de espécie. 5. Espécies crípticas. 6.  
            Marcadores moleculares mitocondrial. I. Prioli,  
            Alberto José, orient. II. Graça, Weferson Júnio da,  
            coorient. III. Universidade Estadual de Maringá.  
            Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
            Graduação em Biologia Comparada. III. Título.

CDD 22. ED.597.430916

JLM-001924

# FOLHA DE APROVAÇÃO

JOÃO PAULO DE MORAIS - SILVA

Filogeografia e DNA *barcoding* de *Trichomycterus davisi* na bacia do rio  
Paraná

Dissertação/tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre/Doutor em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

## COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Alberto José Prioli  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Valéria de Oliveira  
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Luciano Seraphim Gasques  
UNIPAR - Universidade Paranaense

Aprovada em: 22 de fevereiro de 2016.

Local de defesa: Sala 09, Bloco G80, campus da Universidade Estadual de Maringá.

“O erro de um médico pode matar uma pessoa; o erro de um engenheiro pode matar várias pessoas; o erro de um biólogo pode extinguir uma espécie.”

*Rubens Pazza*

Dedico  
A minha mãe e meu pai,  
Ao meu irmão,  
A todos meus familiares,  
E aos meus grandes amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

- Ao Professor Alberto José Prioli, meu orientador por ter aceitado me orientar e apostar em mim durante todo o tempo.

- Ao Professor Weferson Júnio da Graça, por ter aceitado ser meu coorientador, por ter disponibilizado todo o material para a elaboração do projeto.

- A Professora Sônia Maria Alves Pinto Prioli, por ter me recebido tão bem em seu laboratório e pelos ensinamentos recebidos.

- Ao doutorando Thomaz Mansini Carrenho Fabrin, pelas várias horas de ensinamento, por ter me ensinado toda a metodologia de análise usada aqui.

- Aos meus amigos do Laboratório de Genéticas da UEM por me ajudar durante as preparações técnicas, Nathalia Diamante, Isadora Oliveira, Rodrigo Graça e Thais Mendonça.

- A minha grande amiga Thais Martinez Rodrigues Jorge, por fazer minha estadia em Maringá a melhor possível.

- Aos Professores Luciano Seraphim Gasques e Alessandra Valéria de Oliveira, por terem aceitado serem minha banca.

- Aos meus pais por todo o apoio e suporte que sempre me deram desde o início, se não fossem por vocês nada teria acontecido.

- Ao meu irmão Mateus por acreditar em mim e sempre me apoiar.

- Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada.

- A Capes pelo suporte financeiro durante todo o mestrado.



Universidade Estadual de Maringá  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação



Parecer emitido após reunião realizada em:

6/3/2012

Parecer nº

002/2012

Pesquisador: Weferson Junio da Graça

Setor: DBI

Título:

Protocolo nº 002/2012

**Morfologia , moléculas e biogeografia da ictiofauna de rios e riachos de diferentes bacias hidrográficas paranaenses**

Entrada: 13/2/2012

Início: 1/6/2012

Término: 30/5/2014

Situação do Projeto: **Aprovado**

Relatório Final:

**ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar " aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação do relatório final.**

#### Considerações e Parecer:

Considerações e Parecer:

Trata-se de um projeto de pesquisa docente, a ser financiado pela Fundação Araucária, com duração prevista de 2 anos, contando com a participação de diversos docentes, funcionários e alunos de pós graduação.

Para tanto, pretende-se coletar todos os indivíduos capturados pelas diversas técnicas de amostragem descritas – redes de espera de diversas tramas, puçás, tarrafas, peneiras e pesca elétrica. Como exceção, os indivíduos constantes na Lista Vermelha e juvenis deverão ser soltos. A fim de garantir a correta identificação destes indivíduos ameaçados, a equipe contaria com profissionais experientes em sistemática.

Muitos dos riachos a serem amostrados jamais foram estudados e este projeto promoveria um melhor entendimento da composição faunística e, assim indicaria as melhores alternativas de conservação ambiental.

A forma de eutanásia proposta segue as recomendações da Resolução no 876/2008 do CFMV.

Haveria extração de pequenas frações de músculo pra análises moleculares, sempre após eutanásia.

O pesquisador proponente entende que o depósito dos animais em coleções científicas é uma forma de aproveitamento, tendo assim preenchido o item 6.1.

Licenças de captura e coleta estão anexadas ao protocolo.

Parecer

Por entender que os procedimentos propostos não ferem a ética em experimentação animal sou de parecer favorável a execução do mesmo.

  
Prof. Dr. GENTIL VANINI DE MORAES,  
Presidente em exercício do CEAE.

Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:

I - aprovado;

II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;

III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação;

IV - não aprovado





## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
<b>2.</b>	<b>CAPÍTULO I – Filogeografia e DNA <i>barcoding</i> de <i>Trichomycterus davisi</i> na bacia do rio Paraná</b> .....	15
<b>3.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	20
4.1	LOCAIS DE AMOSTRAGEM E EXTRAÇÃO DE DNA.....	20
4.2	PCR E SEQUENCIAMENTO.....	21
4.3	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	21
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	22
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	36
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	41
<b>7.</b>	<b>NORMAS DO PERIÓDICO</b> .....	47
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	52
	ANEXO A.....	53
	ANEXO B.....	54



## RESUMO

*Trichomycterus davisi* é um pequeno bagre típico de água doce, pertencente à família Trichomycteridae, com aproximadamente 279 espécies. O gênero *Trichomycterus* é o mais representativo da família com aproximadamente 160 espécies válidas. *T. davisi* tem distribuição restrita ao sul do Brasil, mais especificamente nas bacias dos rios Iguazu e Ribeira de Iguape. Porém, coletas recentes registraram a ocorrência dessa espécie nas bacias dos rios Ivaí, Tibagi, Piquiri e Paranapanema. *T. davisi* apresenta uma ampla variação no padrão de colorido ao longo do desenvolvimento ontogenético, com isso a identificação de exemplares de diferentes tamanhos é dificultada apenas com o uso de dados morfológicos. Devido a essa ampla distribuição como vem sendo constatado e graças a sua grande variedade genética, é provável que *T. davisi* seja um complexo de espécies, como já foi descrito anteriormente para outros grupos de peixes neotropicais. Todo o material analisado neste trabalho foi coletado nas bacias do Ribeira de Iguape, Iguazu, Piquiri, Tibagi e Ivaí. Os exemplares foram depositados no Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da UEM. Após o DNA extraído e sequenciado, foram feitos testes de delimitação de espécie segundo o método do GMYC e PTP, posteriormente foram calculados os valores de distância  $p$  para as bacias estudadas e para as possíveis espécies encontradas. Os resultados obtidos neste trabalho expõem um cenário muito mais complexo. As análises demonstraram que, provavelmente a denominação *T. davisi* não comporta a escala de diversidade genética descoberta. O teste GMYC realizado aqui não foi significativo, com valor de confiança inferior ao aceitável. As populações do Ribeira de Iguape e do Ivaí formam um clado distinto das demais populações, com mais afinidade com *T. iheringi* do que com outras espécies de *Trichomycterus* já avaliadas molecularmente. A população da bacia do Tibagi apresentou uma clara monofilia em todas as análises e está posicionado com maior proximidade das bacias do Iguazu e do Piquiri do que em relação aos haplogrupos do Ribeira de Iguape e do Ivaí. Em todas as análises esses haplótipos formam um agrupamento conciso, com altos valores de suporte. É possível concluir que estamos diante não apenas de uma espécie e sim de um complexo de espécies. Como neste trabalho foi utilizado apenas um marcador mitocondrial de origem materna, serão necessários mais testes moleculares, utilizando marcadores nucleares para poder medir e verificar a existência de fluxo gênico entre essas OTU's. Essas informações contribuirão, certamente, para o esclarecimento da condição taxonômica do complexo *T. davisi*, de onde alguns grupos poderão ser elevados ao status de espécie.

**Palavras-chaves:** Complexo de espécie, COI, Delimitação de espécie, Espécies crípticas, Marcadores moleculares.

## ABSTRACT

*Trichomycterus davisii* is a typical small freshwater catfish belonging to the family Trichomycteridae with approximately 279 species. The *Trichomycterus* genus is the most representative of the family with approximately 160 valid species. *T. davisii* has restricted distribution to southern Brazil, more specifically in the basins of Iguaçu and Ribeira de Iguape rivers. However, recent surveys recorded the occurrence of this species in the basins of the rivers Ivaí, Tibagi, Piquiri and Paranapanema. *T. davisii* presents a wide variation in the color pattern along the ontogenetic development, therefore the identification of specimens of different sizes is difficult only with the use of morphological data. Because of this wide distribution as it has been found and thanks to its large genetic variation, it is likely that *T. davisii* is a complex species, as has been previously described for other groups of neotropical fish. All material analyzed in this study was collected in the basins of Ribeira de Iguape, Iguaçu, Piquiri, Tibagi and Ivaí. The specimens were deposited at the Research Center for Limnology, Ichthyology and Aquaculture of UEM. After the DNA was extracted and sequenced, species delimitation tests were performed according to the method of GMYC and PTP, the values of  $p$  distance to the studied basins and the possible species found were subsequently calculated. The results of this work expose a much more complex scenario. The analysis showed that, probably the name *T. davisii* does not involve genetic discovery diversity of scale. The GMYC test conducted here was not significant, with lower confidence value to the acceptable. The populations of the Ribeira de Iguape and Ivaí form a distinct clade from other populations with more affinity with *T. iheringi* than with other species *Trichomycterus* already evaluated molecularly. The population of the Tibagi basin presented a clear monophyletic in all analyzes and is positioned more closely the basins of the Iguaçu and Piquiri than in relation to the haplogroups of the Ribeira de Iguape and Ivaí. In all analyzes these haplotypes form a concise grouping with high support values. It is possible to conclude that we are facing not only a species but a species complex, as this work was used only one mitochondrial marker of maternal origin, it will take more molecular tests using nuclear markers to be able to measure and verify the existence of flow gene between these OTU's. This information will certainly contribute to clarify the complex condition taxonomic of the *T. davisii*, where some groups may be elevated to species status.

**Keywords:** COI, Cryptic Species, Molecular Markers, Species Delimitation, Species Complex.

## INTRODUÇÃO GERAL

Os peixes representam um grupo com ampla diversificação, com uma quantidade correspondente a aproximadamente o mesmo número de espécies conhecidas de todos os demais vertebrados, sendo a ictiofauna Neotropical responsável por uma porcentagem significativa do total, cerca de 20 a 25% dos representantes de água doce conhecidos. Ainda assim, estima-se que cerca de 30 a 40% das espécies de peixes não tenham sido descritas (REIS et al. 2003).

Entre os peixes neotropicais conhecidos encontra-se *Trichomycterus davisii*, um pequeno bagre de água doce, que pertence à família Trichomycteridae com aproximadamente 279 espécies (ESCHMEYER; FONG, 2015). Segundo Pauly e Froese (2015) *T. davisii* possui distribuição restrita apenas ao sul do Brasil, mais especificamente as bacias dos rios Iguazu e Ribeira de Iguape (DE PINNA; WOSIACKI, 2003). Porém há indícios de ocorrência da espécie em outras bacias como Ivaí, Piquiri, Tibagi (W. J. da Graça, dados não publicados) e no Paranapanema (COSTA et al., 2013).

*Trichomycterus davisii* não é uma espécie muito estudada, sendo a maior parte das publicações trabalhos citogenéticos (BORIN; MARTINS-SANTOS, 1999; BORIN; MARTINS-SANTOS, 2000; BORIN et al., 2002; SATO et al., 2004).

Dentre alguns conceitos existentes sobre complexo de espécies críptica, admite-se que já um grupo de duas ou mais espécies que não são distinguíveis apenas por caráter morfológicos e que foram classificados como sendo uma espécie única (Bickford et al., 2007).

Os avanços tecnológicos em análises de DNA promovem o aumento do conhecimento sobre a estrutura genética de peixes e os processos responsáveis pela manutenção ou alterações de cada espécie (PIORSKI et al., 2008). Entre estas análises, encontram-se a de DNA mitocondrial, que possui uma organização extremamente compacta, com 37 genes, e uma alta taxa de evolução em relação à do DNA nuclear, por isso se torna visado para estudos genéticos e evolutivos (AVISE et al., 1987). Esse genoma pode codificar em diferentes grupos de organismos as mesmas proteínas, apesar de possuir distintas organizações gênicas (BOORE, 1999).

Estudos com base em marcadores mitocondriais têm se mostrado de grande importância, sendo usados com o objetivo de verificar princípios e processos que governam as distribuições geográficas de linhagens genealógicas, uma área de estudo chamada de filogeografia (AVISE et al., 1987) e podendo ser usadas em nível de espécies, gêneros e até mesmo no estudo de ordens (PEREIRA et al., 2013).

Dentre os genes mitocondriais mais utilizados, encontra-se o COI, o gene da Subunidade 1 da Citocromo C Oxidase. Esse gene é a principal ferramenta do projeto mundial *Consortium for the Barcodes of Life* (CBoL) para animais, que funciona como um código de barras individual, que possibilita a identificação de novas espécies através da comparação das variações dos pares de bases da sequência de cada indivíduo avaliado (HEBERT et al., 2003). A partir de então, o uso desta ferramenta vem sendo cada vez mais utilizada nos estudos populacionais e principalmente na identificação de espécies (HEBERT;GREGORY, 2005; ORNELAS-GARCIA et al., 2008;VALDEZ-MORENO et al., 2009; CARVALHO et al., 2011; PEREIRA et al., 2011a;PEREIRA et al., 2011b; PEREIRA et al., 2013).

Ferramentas para delimitação de espécies vêm sendo aprimoradas, principalmente à luz da teoria de coalescência (LIU et al., 2009; AYDIN et al., 2014), que leva em consideração padrões e processos relacionados a especiações recentes (FUJITA et al., 2012).

Recentemente, foram propostos métodos estatísticos aperfeiçoados para analisar os dados do DNA barcoding. Uma das abordagens mais populares para a definição das espécies com base em dados de loco único é o GMYC (General Mixed Yule Coalescence), que é amplamente utilizado em avaliações da biodiversidade e comunidades ecológicas filogenéticas (PONS et al., 2006; TALAVERA et al., 2013). Este método identifica limites, como uma mudança na ramificação dos táxons sobre uma árvore filogenética que contém várias espécies e populações. No entanto, a análise GMYC requer muito tempo computacional para identificar um grande número de OTU's (Operational Taxonomy Unit) (RATNASINGHAM; HEBERT, 2013).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**.v.18, n. 1, p.489-522, 1987.

AYDIN, Z.; MARCUSSEN, T.; ERTEKIN, A. S.; OXELMAN, B. Marginal likelihood estimate comparisons to obtain optimal species delimitations in *Silene* sect. *Cryptoneuræ* (Caryophyllaceae). **Plosone**. v. 9, n. 12, p.1-9, 2014.

BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI, N. S.; NG, P.K.L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K. K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**. v. 22, n. 3, p. 148-155, 2007.

BOORE, J. L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**.v. 27, n. 8, p.1767-1780, 1999.

BORIN, L. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Karyotype characterization of three species of the genus *Trichomycterus* (Teleostei, Siluriformes) from Iguaçu river basin. **Genetica** . v. 106, p.215 - 221, 1999.

BORIN, L. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Intra-individual numerical chromosomal polymorphism in *Trichomycterus davisi* (Siluriformes, Trichomycteridae) from the Iguaçu River basin in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. v. 23, p.605-607, 2000.

BORIN, L. A.; MARTINS-SANTOS, I. C.; OLIVEIRA, C. A natural triploid in *Trichomycterus davisi* (Siluriformes, Trichomycteridae): mitotic and meiotic characterization by chromosome banding and synaptonemal complex analyses. **Genetica**. v. 115, p. 253-258, 2002.

CARVALHO, D. C.; OLIVEIRA, D. A.; POMPEU, O. S.; LEAL, C. G.; OLIVEIRA, C.; HANNER, R. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. **Informa Healthcare Mitochondrial DNA**. v. 22, n. (S1), p. 80-86, 2011.

COSTA, A. D. A.; FERREIRA, D. G., SILVA, W. F.; ZANATTA, A.S.; SHIBATTA, O. A.; GALINDO, B. A. Fishes (Osteichthyes: Actinopterygii) from the Penacho stream, upper Paraná River basin, Paraná State, Brazil. **Check List**. v. 9, p. 519-523, 2013.

DE PINNA, M. C. C.; WOSIACKI, W. Family Trichomycteridae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. (Org). **Check List of the Freshwater Fishes of South America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2013. p. 270-290.

ESCHMEYER, W. N.; FONG J. D. **Catalog of Fishes**. California: California Academy of Sciences, 2015. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Acesso em: 19 dez. 2015.

FUJITA, M. K.; LEACHÉ, A. D.; BURBRINK, F. T.; MCGUIRE, J. A.; MORITZ, C. Coalescent-based species delimitation in na integrative taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**. v. 27, n. 9, p. 480 - 488, 2012.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; WAARD, JR. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergence among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. v. 270, (Suppl.) p. S96-S99, 2003.

HEBERT, P. D. N.; GREGORY, T. R. The promise of DNA barcoding for taxonomy. **Molecular Systems Biology**. v. 54, n. 5, p. 852-859, 2005.

LIU, L.; YU, L.; KUBATKO, L.; PEARL, D. K.; EDWARDS, S. V. Coalescent methods for estimating phylogenetic trees. **Molecular Phylogenetics**. v. 53, n. (S1), p. 320 - 328, 2009.

PAULY, D; FROESE, R. **FishBase, World Wide Web electronic publication**. Disponível em <http://www.fishbase.org>, version (12/2015). Acesso em: 19 dez. 2015.



PEREIRA, L. H. G.; MAIA, G. M.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. **Informa healthcare, Mitochondrial DNA**. v. 22, n. (S1) p. 71-79, 2011a.

PEREIRA, L. H. G.; PAZIAN, M. F.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paraná Basin of Brazil. **Mitochondrial DNA**. v. 22, n. (S1), p. 87–96, 2011b.

PEREIRA, L. H. G. HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Can DNA barcoding accurately discriminate mega diverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics**. v. 14, n. 20, p. 1-14, 2013.

PIORSKI, N. M.; SANCHES, A.; CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T.; CARRILLO-AVILA, M.; FREITAS, P. D.; GALETTI JR. P. M. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**. v. 68, n. 4, p. 1039-1050, 2008.

PONS, J, PONS, J.; BARRACLOUGH, T. G.; GOMEZ-ZURITA, J.; CARDOSO, A.; DURAN, D. P.; HAZELL, S.; KAMOUN, S.; SUMLIN, W. D.; VOGLER, A. P. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. **Systematic Biology**. v. 55, n. 4, p. 595-609, 2006.

ORNELAS-GARCIA, C. P.; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actynoptergii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. **BMC Evolutionary Biology**. v. 8, 340, 2008.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT , P. D. N. A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) System. **Plos One**. v. 8,: e66213, 2013

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

SATO, L. R.; OLIVEIRA, C.; FAUSTO FORESTI, F. Karyotype description of five species of *Trichomycterus* (Teleostei: Siluriformes: Trichomycteridae). **Genetics and Molecular Biology**. v. 27, n. 1, p. 45 – 50, 2002.

TALAVERA, G.; DINCA, V.; VILA, R. Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. **Methods in Ecology and Evolution**. v. 4, n. 12 p, 1101–1110, 2013.

VALDEZ-MORENO, M. IVANOVA, N. V.; ELÍAS-GUTIÉRREZ, M.; CONTRERAS-BALDERAS, S.; HEBERT, P. D. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. **Journal of Fish Biology**. v. 74, n. 2, p. 377–402, 2009.

**CAPÍTULO I: FILOGEOGRAFIA E DNA *BARCODING* DE  
*TRICHOMYCTERUS DAVISI* NA BACIA DO RIO PARANÁ**

João Paulo de Moraes-Silva; Alberto José Prioli; Weferson Júnio da Graça.

## RESUMO

Dentro da família Trichomycteridae, com aproximadamente 279 espécies encontra-se o gênero *Trichomycterus*, que é o gênero mais representativo da família com aproximadamente 160 espécies válidas, sendo *Trichomycterus davisi* uma destas espécies válidas. *T. davisi* é um pequeno bagre típico de água doce com distribuição restrita ao sul do Brasil, mais especificamente nas bacias dos rios Iguaçu e Ribeira de Iguape. Porém, coletas recentes registraram a ocorrência dessa espécie nas bacias dos rios Ivaí, Piquiri e Paranapanema. *T. davisi* apresenta uma ampla variação no padrão de pigmentação ao longo do desenvolvimento ontogenético, com isso a identificação de exemplares de diferentes tamanhos e idade são dificultadas apenas com o uso deste dado morfológico. Devido a sua ampla distribuição e graças a sua grande variedade genética, é provável que *T. davisi* seja um complexo de espécies, como já foi descrito anteriormente para outros grupos de peixes neotropicais. Este trabalho tem como objetivo caracterizar a filogeografia de *Trichomycterus davisi* e investigar um possível complexo de espécies utilizando sequências nucleotídicas parciais do gene mitocondrial COI. Os indivíduos estudados foram coletados nas bacias do Iguaçu, Ivaí, Piquiri, Tibagi e Ribeira de Iguape. Após o sequenciamento foram feitos testes de delimitação de espécie usando o GMYC e o PTP, foram calculadas as distâncias para as bacias e para os agrupamentos formados e, por fim, gerada a rede de haplótipo. Os resultados obtidos neste trabalho expõem um cenário muito mais complexo. As análises demonstraram que, com alta probabilidade, a denominação *T. davisi* não comporta a escala de diversidade genética descoberta. O teste GMYC realizado aqui não foi significativo. As populações do Ribeira de Iguape e do Ivaí formam um clado distinto das demais populações, com mais afinidade com *T. iheringi* do que com outras espécies de *Trichomycterus* já avaliadas molecularmente. A população da bacia do Tibagi apresentou uma clara monofilia em todas as análises e está posicionado com maior proximidade das bacias do Iguaçu e do Piquiri do que em relação aos haplogrupos do Ribeira de Iguape e do Ivaí. A delimitação pelo PTP indicou duas OTUs para as bacias dos rios Iguaçu, Piquiri formada por todos os haplótipos atuais da bacia do Iguaçu, Piquiri e os indivíduos 661B e 428A do Ivaí, mas o teste do GMYC separou estes mesmos haplótipos em quatro grupos. Tomando-se a análise mais conservadora do PTP, uma OTU incluiria os haplótipos 715B, 711A, 596B todos da bacia do Iguaçu. Em todas as análises esses haplótipos formam um agrupamento conciso, com altos valores de suporte. A segunda OTU abrangeria todos os outros haplótipos encontrados nas bacias do Iguaçu, Piquiri e os haplótipos 661B e 428A do Ivaí. Consequentemente, de acordo com esses resultados mais duas espécies devem ser reconhecidas. É possível concluir que estamos diante não apenas de uma espécie e sim de um complexo de espécies. Como neste trabalho foi utilizado apenas um marcador mitocondrial de origem materna, serão necessários mais testes moleculares, utilizando marcadores nucleares para poder medir e verificar a existência de fluxo gênico entre essas OTU's, Informações dessa natureza permitirão decidir se esses agrupamentos devem ser elevados ao status de espécie.

**Palavras-chaves:** Delimitação de espécie, Complexo de espécie, COI, Espécies crípticas, Marcadores moleculares.

## INTRODUÇÃO

Os peixes representam um grupo com ampla diversificação, com uma quantidade correspondente a aproximadamente o mesmo número de espécies conhecidas de todos os demais vertebrados, sendo a ictiofauna Neotropical responsável por uma porcentagem significativa do total, cerca de 20 a 25% dos representantes de água doce conhecidos. Ainda assim, estima-se que cerca de 30 a 40% das espécies de peixes não tenham sido descritas (Reis *et al.* 2003).

*Trichomycterus davisi* é um pequeno bagre típico de água doce, pertencente à Trichomycteridae com aproximadamente 279 espécies, sendo o gênero *Trichomycterus* o mais representativo da família com aproximadamente 160 espécies válidas (Eschmeyer & Fong, 2014). Segundo Pauly & Froese (2015), *T. davisi* possui distribuição restrita apenas ao sul do Brasil, mais especificamente as bacias dos rios Iguazu e Ribeira de Iguape (De Pinna & Wosiacki, 2003). Porém, Costa *et al.* (2013) capturaram exemplares de *T. davisi* na bacia do rio Paranapanema. Além disso, coletas recentes registraram a ocorrência dessa espécie nas bacias dos rios Ivaí e Piquiri (W.J. da Graça, dados não publicados).

*Trichomycterus davisi*, apresenta uma ampla variação no padrão de colorido ao longo do desenvolvimento ontogenético, com isso a identificação de exemplares de diferentes tamanhos é dificultada apenas com o uso de dados morfológicos. Alguns trabalhos citogenéticos em *T. davisi* apontaram a existência de uma diversidade quanto à quantidade de cromossomos intra e inter-individual. Borin & Martins-Santos (2000) analisaram células de um mesmo indivíduo proveniente da bacia do rio Iguazu e identificaram três populações de células, onde cada população apresentava formas cariotípicas diferentes, revelando assim a existência de polimorfismo numérico cromossômico intra-individual em *T. davisi*. Borin *et al.* (2002) descreveram uma triploidia natural encontrada na espécie encontrada em exemplares capturados na bacia do rio Iguazu.

Devido a sua aparente ampla distribuição e graças a sua grande variedade genética, é provável que *T. davisi* seja um complexo de espécies, como já foi descrito anteriormente para outros grupos de peixes neotropicais (Pazza *et al.*, 2007; Kavalco *et*

al., 2009). Dentro de *Trichomycterus* já existem trabalhos em andamento para estudo de complexos de espécie, como *Trichomycterus brasiliensis* (Mehanna, 2010).

Entre as diversas ferramentas para as soluções de problemas como este, encontram-se as que usam marcadores de DNA mitocondrial. O genoma mitocondrial dos vertebrados possui entre 15 a 20 kb, de herança predominante materna e com ausência de recombinações. Possui uma organização extremamente compacta, com 37 genes, e uma alta taxa de evolução em relação à do DNA nuclear, por isso se torna visado para estudos genéticos e evolutivos (Awise *et al.*, 1987). Esse genoma pode codificar em diferentes grupos de organismos as mesmas proteínas, apesar de possuir distintas organizações gênicas (Boore, 1999).

Dentre os genes mitocondriais mais utilizados, encontra-se o COI, o gene da Subunidade 1 da Citocromo C Oxidase. Esse gene é a principal ferramenta do projeto mundial *Consortium for the Barcodes of Life* (CBoL) para animais, que funciona como um código de barras individual, que possibilita a identificação de novas espécies através da comparação das variações dos pares de bases da sequência de cada indivíduo avaliado (Hebert *et al.*, 2003). Essa ferramenta vem sendo cada vez mais utilizada nos estudos populacionais e principalmente na identificação de espécies (Hebert & Gregory, 2005; Ornelas-Garcia *et al.*, 2008; Valdez-Moreno *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011a; Pereira *et al.*, 2011b; Pereira *et al.*, 2013). Porém, Barraclough *et al.* (2009) sugerem que muitos fatores podem afetar o índice de sucesso do DNA barcoding, tal como os níveis típicos de variação intraespecífica e interespecífica entre clados e variação da taxa de substituição entre as linhagens, colocando em dúvida o poder deste método para identificar e delimitar as espécies.

A análise da similaridade nucleotídica pode fornecer dados para o estabelecimento de filogenias moleculares. Para Page & Holmes (1998), cada uma das diferentes técnicas para inferência filogenética tem sua vantagem e desvantagem, e sua aplicação correta depende do grupo taxonômico a ser estudado e as hipóteses a serem testadas, ou seja, o direcionamento filogenético das questões. Segundo os autores, os dados moleculares, particularmente a sequência nucleotídica, oferecem potencialmente uma imensidade de informações, que ultrapassa a extensão do vasto conhecimento taxonômico. Por sua vez, sequências mitocondriais podem ser utilizadas em estudos de populações de uma mesma espécie ou de espécies muito próximas.

Estudos com base em marcadores mitocondriais têm se mostrado de grande importância na identificação de espécies e em estudos de biodiversidade, sendo usados com o objetivo de verificar princípios e processos que governam as distribuições geográficas de linhagens genealógicas, uma área de estudo chamada de filogeografia (Avice *et al.*, 1987) e podendo ser usadas em nível de espécies, gêneros e até mesmo no estudo de ordens (Pereira *et al.*, 2013).

Ferramentas para delimitação de espécies vêm sendo aprimoradas, principalmente à luz da teoria de coalescência (Liu *et al.*, 2009; Aydin *et al.*, 2014), que leva em consideração padrões e processos relacionados a especiações recentes (Fujita *et al.*, 2012). Recentemente, foram propostos métodos estatísticos aperfeiçoados para analisar os dados do DNA barcoding. Uma das abordagens mais populares para a definição das espécies com base em dados de loco único é o GMYC (General Mixed Yule Coalescence), que é amplamente utilizado em avaliações da biodiversidade e comunidades ecológicas filogenéticas (Pons *et al.*, 2006; Talavera *et al.*, 2013). Este método identifica limites, como uma mudança na ramificação dos táxons sobre uma árvore filogenética que contém várias espécies e populações. No entanto, a análise GMYC requer muito tempo computacional para identificar um grande número de UTOs (Unidade Taxonômica Operacional) (Ratnasingham & Hebert, 2013).

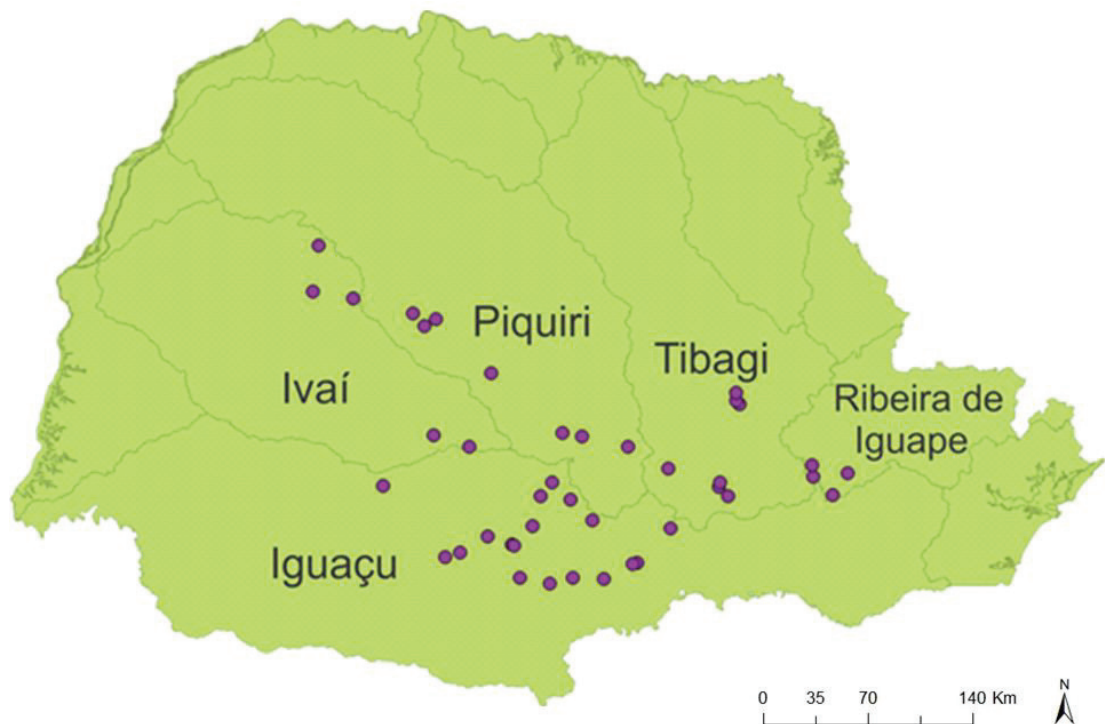
Neste trabalho a utilização de análises moleculares é fundamental para investigar se *T. davisii* corresponde a um complexo de espécies, visto que somente dados morfológicos não são suficientes para tal conclusão. Finalmente, estudos concatenados de análises genéticas e morfológicas são necessários, uma vez que muitos parâmetros genéticos e ecológicos estão baseados em espécies, e o uso de complexos de espécies inadvertidamente pode levar a inferências equivocadas. Por se tratar de um trabalho sobre biodiversidade, os resultados aqui obtidos poderão ser utilizados futuramente em programas de manejo de fauna.

Este trabalho tem como objetivo caracterizar a filogeografia de *Trichomycterus davisii* e investigar um possível complexo de espécies utilizando sequências nucleotídicas parciais do gene mitocondrial *COI*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Locais de amostragem e extração de DNA*

Os exemplares estudados foram coletados com a utilização de pesca elétrica, em quatro bacias : a) do rio Iguaçu (24 pontos); b) do rio Ivaí (9 pontos); c) do rio Piquiri (10 pontos); d) do rio Tibagi (12 pontos); e) do rio Ribeira de Iguape (6 pontos) (Figura1).



**Fig 1:** Mapa do estado do Paraná indicando as bacias do Iguaçu, Ivaí, Piquiri, Tibagi, Ribeira de Iguape e os pontos de coleta de *Trichomycterus davisi*.

Após as coletas, os exemplares foram anestesiados com o uso de benzocaina, seguindo as normas da resolução 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, e o tecido muscular extraído e armazenado no álcool puro em frizer. Posteriormente os exemplares testemunho foram fixados em álcool 70% e depositados na coleção ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da UEM. As amostragens foram realizadas com parecer favorável (002/2012) do Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da UEM e com a licença permanente para coleta e transporte de material zoológico SISBIO (ICMBio),

processo no. 14028-1 de 10 de dezembro de 2008, ambos concedidos a Weferson J. da Graça.

### *PCR e sequenciamento*

Para a extração do DNA foram utilizados kits comerciais das marcas Invitex e Invitrogen, conforme instruções dos fabricantes.

O DNA extraído foi quantificado utilizando-se gel de agarose e Ladder Low Mass (Invitrogen) por meio de comparação de bandas. Para as reações de polimerase em cadeia (PCRs) foram utilizados trechos do gene mitocondrial COI (Citocromo Oxidase C Subunidade 1). O gene COI foi parcialmente amplificado com o par de *primers* indicado por Ivanova *et al.* (2007) para peixes: H7152 (5' CAC CTCA GGG TGT CCG AAR AAY CAR AA 3') e L6448-F1 (5' TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT CGG CAC 3'). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador MJ Research PTC100, perfazendo um volume total de 25 µL, contendo 2 µL de DNA molde, 2,5 µL Tris-KCl (20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 0,75 µL MgCl<sub>2</sub> [25ng/µL], 0,4 µM de cada *primer* [10 ng/µL], 1 µL de dNTP[10 ng/µL] e 0,2 µL *Taq* DNA-polimerase. As condições da reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, 94°C por 30 s, hibridação a 52°C por 40 s e alongamento a 72 °C por 1 min, seguidos de 35 ciclos de 94 por 30 s, 52 por 40 s, 72 por 1 min (Ivanova et al., 2007). Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 1%. Para purificação de cada produto de PCR, foram usados 25 µL de polietilenoglicol (PEG) 8000 20% (m/v).

### *Análise de dados*

As sequências nucleotídicas obtidas foram visualizadas e editadas com o programa Chromas Lite 2.01. Posteriormente, a identidade da sequência foi verificada junto ao GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com o programa "Blastn". Em seguida alinhadas pelo algoritmo ClustalW 1.6 (Thompson *et al.*, 1994) implementado no programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). A exclusão das sequências idênticas e identificação dos haplótipos foi realizada utilizando a ferramenta online ElimDupes (<https://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/ToolsOutline.html>).

O modelo de substituição nucleotídica utilizado para estimar a árvore ultramétrica foi o modelo GTR + I + G, estimado pelo programa jModelTest pelo



critério de AIC (Akaike) (Darribaet *al.*, 2012). Em seguida foi feito uma análise bayesiana pelo programa BEAST v.1.8.2 com dados preparados previamente no Beauti (Drummondet *al.*, 2012), tendo o relógio molecular lognormal relaxado estimado pelo mesmo e o modelo de especiação birth-death.

As análises foram repetidas ao menos duas vezes independentemente e os resultados foram analisados no programa Tracer 1.6, considerando ESS > 200 (effective sample size). Posteriormente, a árvore resultante foi editada no programa FigTree.

O teste GMYC utiliza uma árvore ultramétrica, e a delimitação é feita a partir da comparação das distâncias das amostras até o ancestral comum mais recente (MRCA) e um evento de especiação, considerando uma escala de tempo (Fujisawa& Barraclough, 2013). O teste GMYC foi relizadona plataforma R utilizando o pacote *splits*, considerando um *single threshold*.

O programa RaxmlIGUI (Silvestro; Michalak, 2012) foi utilizado para construir uma árvore com o algoritmo de máxima verossimilhança, com 1000 reamostragens de bootstrap. A delimitação de espécies também foi testada pelo teste *Poisson Tree Processes* (PTP) (Zhang et al., 2013). No teste PTP considera-se que os comprimentos longos e curtos dos ramos de uma árvore são proporcionais ao número de substituições e que a probabilidade de especiação associada ao número de substituições segue uma distribuição de Poisson, de acordo comZhang et al. (2013). O teste foi executado nobPTP Webserver (<http://species.h-its.org/ptp>).

Conforme proposto pelo *Consortium for the Barcodes of Life* (CBoL), foi construído um dendrograma *neighbor-joining* (NJ) com o modelo Kimura 2 Parâmetros (K2P). Dados estatísticos sobre as sequências foram obtidos pelo software DnaSP v5 (Librado& Rozas, 2009). As redes de haplotipos foram feitas pelo programa PopART (Population Analysis with Reticulate Trees) (Leigh& Bryant; 2015), usando o método Median Joining Networks (Bandeltet *al.*, 1999).

## RESULTADOS

Foram obtidas 74sequências parciais do gene COI (572 pb) após edição, deste 88 sítios foram polimórficos. O nucleotídeo Timina corresponde em média a 29,15%, Citosina corresponde 27,15%, Adenina 24,9% e Guanina 18,95%.Posteriormente,foram

retirados os haplótipos repetidos usando a ferramenta online ElimDupes, resultando em 50 haplótipos únicos. Nenhum haplótipo foi compartilhado entre as bacias.

Foram realizadas duas análises de *neighbor-joining* (NJ) com o modelo Kimura 2 parâmetros (K2P), seguindo a recomendação do Bold para análises de sequências COI para identificação de espécies. Na primeira análise foram incluídas todas as 74 sequências obtidas e associadas a *T. davisii*. Portanto, no conjunto de sequências muitos haplótipos estarão repetidos. Além das sequências *T. davisii*, nas duas análises foram incluídas 26 sequências de seis espécies do gênero *Trichomycterus* provenientes do Bold, além de duas sequências de dois indivíduos coletados, durante este trabalho, na bacia do rio Tibagi e identificados como *Trichomycterus diabolus*. Diferentemente, na segunda análise foram eliminadas as repetições de sequências haplotípicas e a árvore foi construída com 50 sequências únicas de espécimes identificados morfologicamente como *T. davisii*. A lista com exemplares utilizados nestas análises é mostrada no anexo C.

A árvore resultante da primeira análise NJ está na Figura 2 e a Figura 3 mostra a árvore gerada pela segunda análise NJ. Note que os resultados não foram muito diferentes entre si, e está clara a íntima correspondência entre as topologias e estruturas das ramificações das duas árvores.

Uma primeira inspeção permite vislumbrar informações importantes contidas nos dois gráficos. Primeiro, considerando-se o conjunto de espécies obtidas no Bold e acrescentadas às análises, verifica-se que as duas árvores demonstram que *T. iheringi* é a espécie que está mais próxima do grupo identificado como *T. davisii*. Esta proximidade é apoiada com suporte de *bootstrap* acima de 99% nos dois casos.

A segunda constatação refere-se ao posicionamento da bacia do Ribeira de Iguape e da bacia do Ivaí dentro do grupo identificado como *T. davisii*. De modo surpreendente, as populações do Ribeira de Iguape e do Ivaí estão geneticamente mais próximas entre si do que com outras populações de *T. davisii*, tanto da bacia do alto rio Paraná (Piquiri e Tibagi) quanto da bacia do rio Iguape. O suporte *bootstrap* para esta diferenciação não é muito alto, mas ainda assim está acima de 50%. Apesar do posicionamento de ambas, em um ramo isolado, como pode ser visto nas Figuras 2 e 3 as populações do Ribeira de Iguape e do Ivaí estão diferenciadas entre si, formando dois clados com suporte acima de 60%.

Outra informação verificável nas duas árvores é a heterogeneidade do grupo *T. davisi*, na bacia do Iguaçu e no alto rio Paraná. Deve ser ressaltada a diferenciação da população da bacia do Tibagi e pelo menos um clado da bacia do Iguaçu (espécimes 711A, 596B e 715B). Aparentemente, a população do rio Piquiri está geneticamente muito próxima de subpopulações do Iguaçu. É preciso registrar que na bacia do rio Ivaí alguns indivíduos têm afinidade com população da bacia do Iguaçu e não com a população do Ribeira de Iguape. Finalmente, e de modo inesperado, está a inserção de *T. diabolus* em clado de *T. davisi* da bacia do Iguaçu.

Em comparação com outras análises realizadas neste trabalho, a análise *neighbor-joining* pode ser considerada simples. No entanto, as informações extraídas das análises NJ apresentadas serão, em grande medida, corroboradas pelas análises mais refinadas, com objetivos mais amplos, que serão descritas em seguida.

A condução do teste PTP (Poisson Tree Processes) exige a construção prévia de uma árvore de máxima verossimilhança (ML). A construção dessa árvore deve atender ao requisito de conter apenas sequências únicas, sem sequências haplotípicas idênticas. Foram incluídas na análise as sequências de espécimes identificados como *T. davisi*, *T. diabolus* e sequências de espécies do Bold. O programa jModelTest selecionou o modelo GTR + G + I para o conjunto de sequências nucleotídicas analisadas. A Figura 4 exibe a árvore produzida pelo programa raxmlGUI. As observações feitas para as análises NJ mostradas nas Figuras 2 e 3 também podem ser feitas pela inspeção da árvore ML da Figura 6. Uma diferença a ser notada reside no posicionamento de *T. iheringi* em relação ao clado Ribeira de Iguape/Ivaí. Como pode ser visto, embora com suporte de apenas 55%, a bifurcação de *T. iheringi* antecederia a bifurcação entre o clado de Ribeira de Iguape e o clado do Ivaí.

Após a execução da análise, o programa PTP gerou a árvore mostrada na Figura 5. Na árvore é mostrado o resultado da análise de delimitação de espécies pelo algoritmo do PTP. Evidentemente, *T. iheringi* foi identificado como uma OTU independente. Além disso, o PTP colocou sete filogrupos de *T. davisi* como possíveis espécies estabelecidas. Conforme o resultado, a população do Ribeira de Iguape e do Ivaí pertenceriam a duas espécies diferentes de *T. davisi*, sem registro no Bold e no GenBank. Esta também seria situação da população do Tibagi, ou seja, corresponderia a uma terceira espécie desconhecida. A bacia do Iguaçu teria pelo menos

duas OTUs. Uma delas teria ampla distribuição, ocorrendo na bacia do Piquiri e também seria encontrada na bacia do Ivaí. A segunda OTU teria maior proximidade genética com a população do Tibagi. Como esperado, *T. diabolus* não ficou separado como espécie diferenciada e foi incluído em um dos grupos da bacia do Iguaçu.

A árvore Bayesiana para sequências haplotípicas únicas está na Figura 6. Aqui também há o mesmo destaque da árvore ML, com o grupo *T. iheringi*, Ribeira de Iguape e Ivaí separados com alto suporte de *bootstrap* de outros grupos de *T. davisii*. Em concordância com a árvore ML, aqui também foi detectado que a bifurcação de *T. iheringi* antecede à separação dos clados de Ribeira de Iguape e do Ivaí. Ainda pode-se verificar a diferenciação da população do Tibagi em relação a todos os outros grupos.

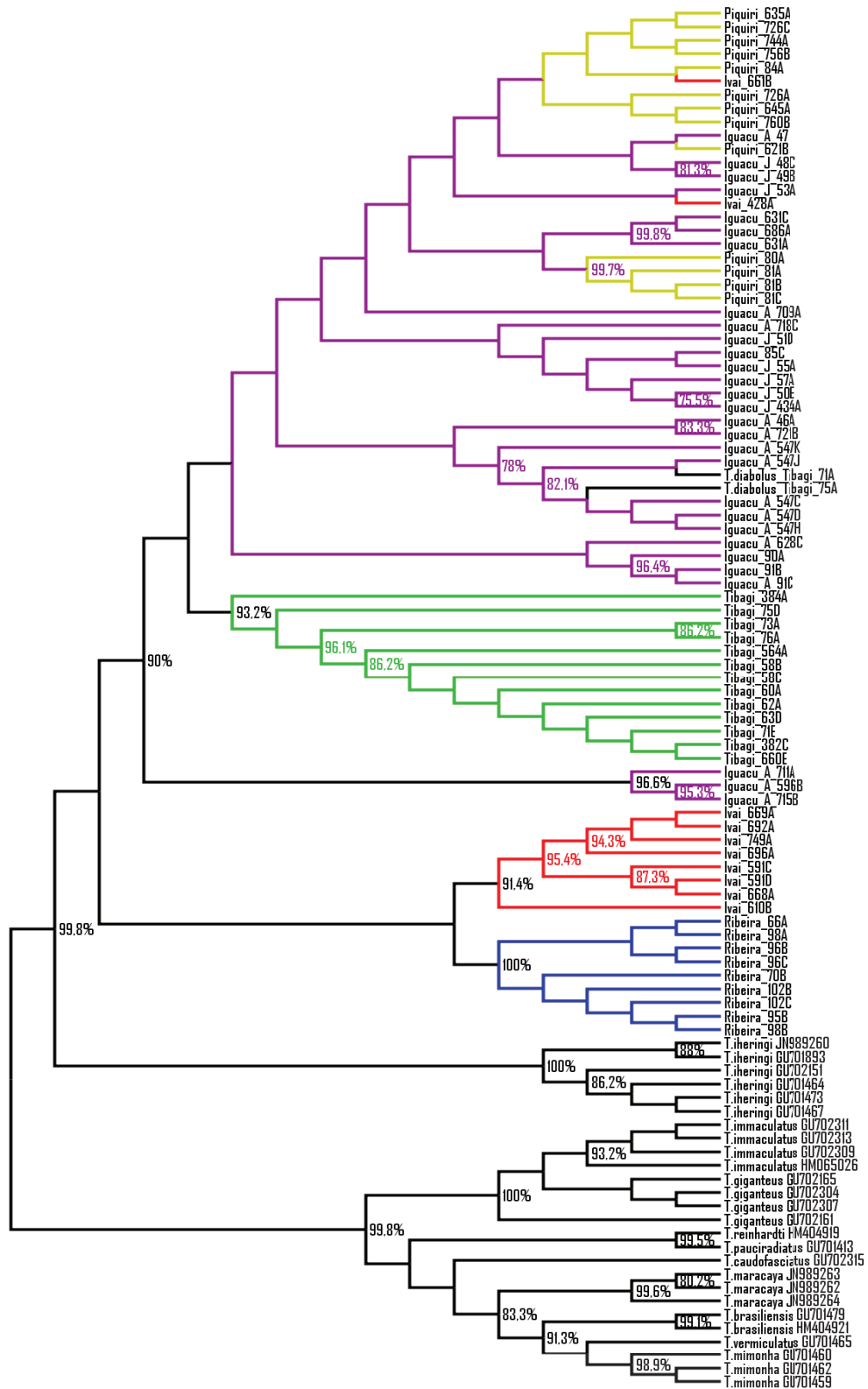
A árvore bayesiana foi utilizada para a realização do teste de delimitação de espécies GMYC, cujo resultado é apresentado na Figura 7. Com valor de 0,172 o teste não foi significativo, mas aponta algumas tendências, pois há uma concordância em nível mais amplo com os resultados do teste PTP. Foram discriminados sete filogrupos e há algumas ocorrências que devem ser notadas, em comparação com o teste PTP. Por exemplo, *T. iheringi*, e as populações do Ribeira de Iguape e do Ivaí são reconhecidas como OTUs independentes, ou seja, seriam espécies estabelecidas. Além disso, outra concordância está na delimitação da população do Tibagi como espécie. Dentro da bacia do rio Iguaçu foram revelados quatro grupos que poderiam ser interpretados como OTUs. As populações do Piquiri e de parte do Ivaí estariam incluídas em um dos grupos do Iguaçu. Da mesma forma que mostrado na análise ML, *T. diabolus* está estreitamente ligado a um outro grupo da bacia do rio Iguaçu.

A rede de haplótipos (Figura 8) deixa explícito que existem haplogrupos bem definidos para *T. davisii*. É possível constatar haplogrupos associados às bacias hidrográficas. Em consonância com os dados obtidos pelas metodologias de construção de árvores, fica evidente a multiplicidade de haplogrupos dentro da bacia do Iguaçu. Ao mesmo tempo, comprova o isolamento da população da bacia do Ribeira de Iguape, bem como o isolamento das populações das bacias do rio Ivaí e do rio Tibagi. Claramente, pode ser visualizada a relação da população da bacia do rio Piquiri com uma subpopulação do rio Iguaçu. Não obstante, a parte central da rede de haplótipos é formada por muitos haplótipos hipotéticos, o que impede conclusões seguras sobre a ancestralidade dos haplogrupos.

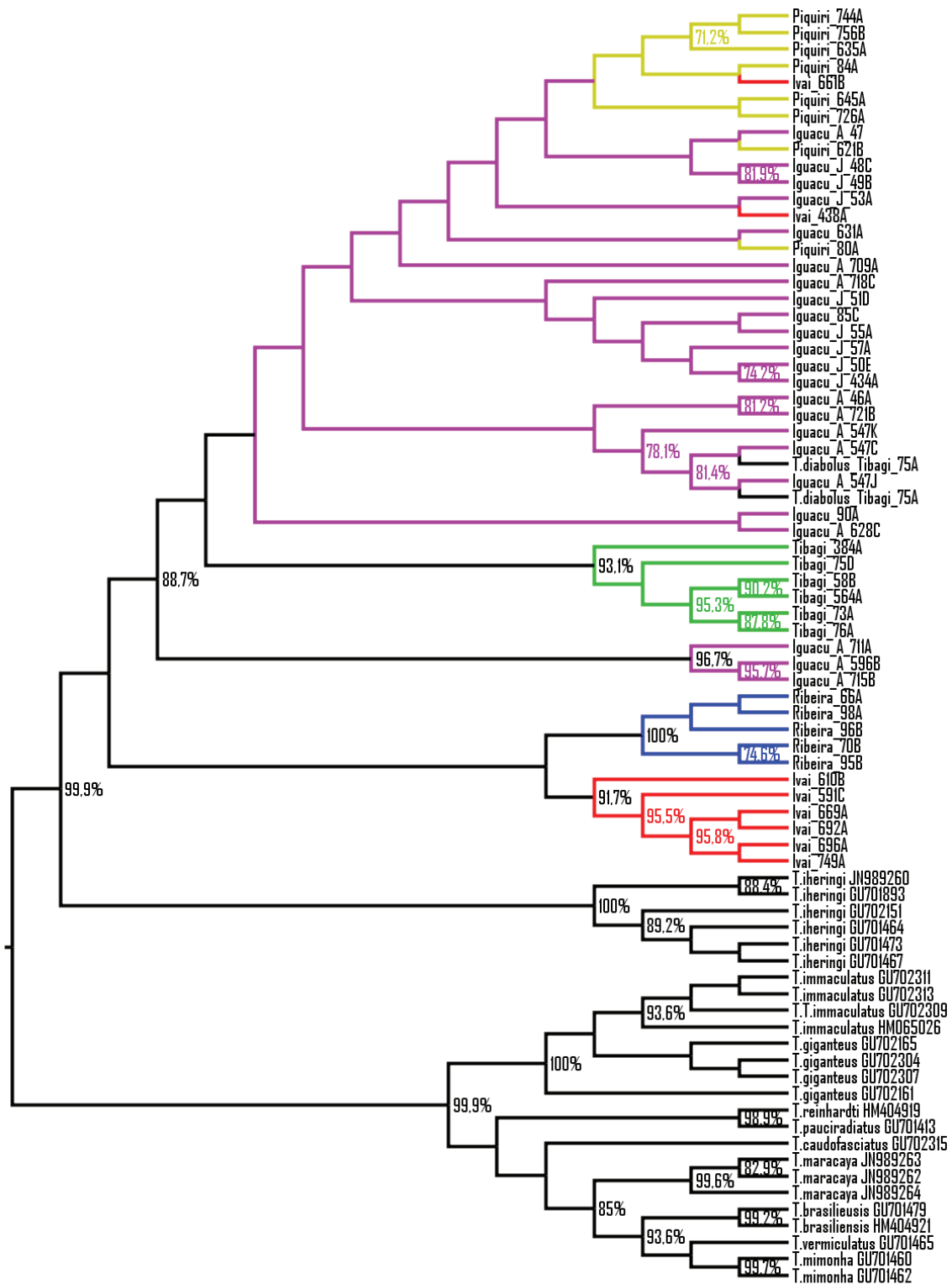
Foram criados mapas de distribuição para os filogrupos inferidos pelas análises PTP e GMYR, apresentados nas Figuras 9 e 10, respectivamente. Nas duas Figuras pode ser visualizada a distribuição estancada dos haplogrupos da bacia do Ribeira de Iguape e de um haplogrupo da bacia do Ivaí. Do mesmo modo, a drenagem do rio Tibagi contém um haplogrupo exclusivo, que não ocorre em outras localidades. Por outro lado, na bacia do rio Iguaçu ocorrem três haplogrupos exclusivos. Mas, na bacia do Iguaçu ocorre um haplogrupo que está presente também nas bacias dos rios Piquiri e Ivaí.

Os valores de distância  $p$  entre os indivíduos variaram de 0 a 0,634. Na Tabela 1 estão os valores de distância  $p$  entre os exemplares de cada bacia e dentro das bacias. Entre as bacias as distâncias variaram de 0,017 entre as populações do Iguaçu e do rio Piquiri até 0,049 entre as bacias do Ribeira de Iguape e Tibagi. Dentro das bacias as variações foram de menor monta, variando de 0,003 na bacia do Ribeira de Iguape até 0,023 para a bacia do Ivaí.

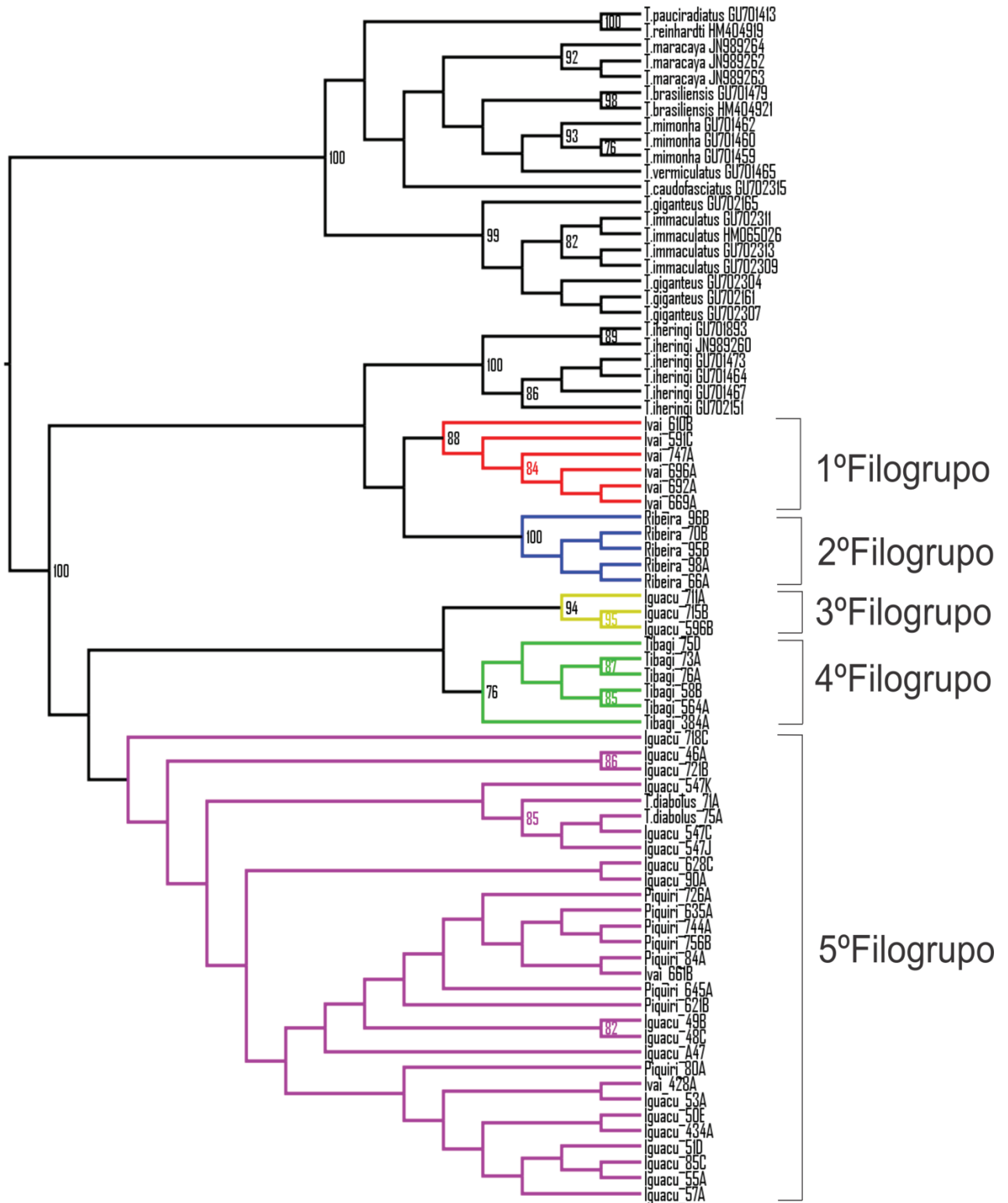
Após a identificação de filogrupos com os programas PTP e GMYC, as distâncias  $p$  foram recalculadas. Na Tabela 2 estão os valores obtidos para os filogrupos revelados pelo teste PTP. As distâncias dentro dos grupos variaram de 0,0038 no filogrupo 2 (Ribeira) até 0,0139 filogrupos 3 e 5 (Iguaçu; Iguaçu/Piquiri). Entre os filogrupos, as distâncias variaram de 0,029 entre filogrupo 4 (Tibagi) e filogrupo 5 (Iguaçu/Piquiri), até 0,0516 entre filogrupo 1 (Ivaí) e filogrupo 4 (Tibagi). As estimativas de distância  $p$  entre os filogrupos identificados pela análise GMYC estão na Tabela 3. As distâncias dentro de filogrupos variaram de 0,0038 no filogrupo 7 (Ribeira) a 0,0139 filogrupo 2 (Iguaçu A). Entre os grupos, a menor distância foi entre F4 e F5 (0,0147). A maior distância estimada foi 0,0516 entre filogrupo 1 (Tibagi) e filogrupo 6 (Ivaí). Nas duas análises as distâncias dentro de filogrupos mantiveram-se em níveis menores do que entre filogrupos.



**Fig 2** Dendrograma neighbor-joining obtido pelo modelo Kimura 2 parâmetros para os 74 haplótipos de COI de *Trichomycterus davisida* bacia do Iguacu (roxo), Ivaí (vermelho), Ribeira de Iguape (azul), Tibagi (verde), Piquiri (amarelo), mais outgroup obtidos no BOLD com 1000 reamostragens de bootstrap. Estão representados apenas valores de suporte acima de 75%.

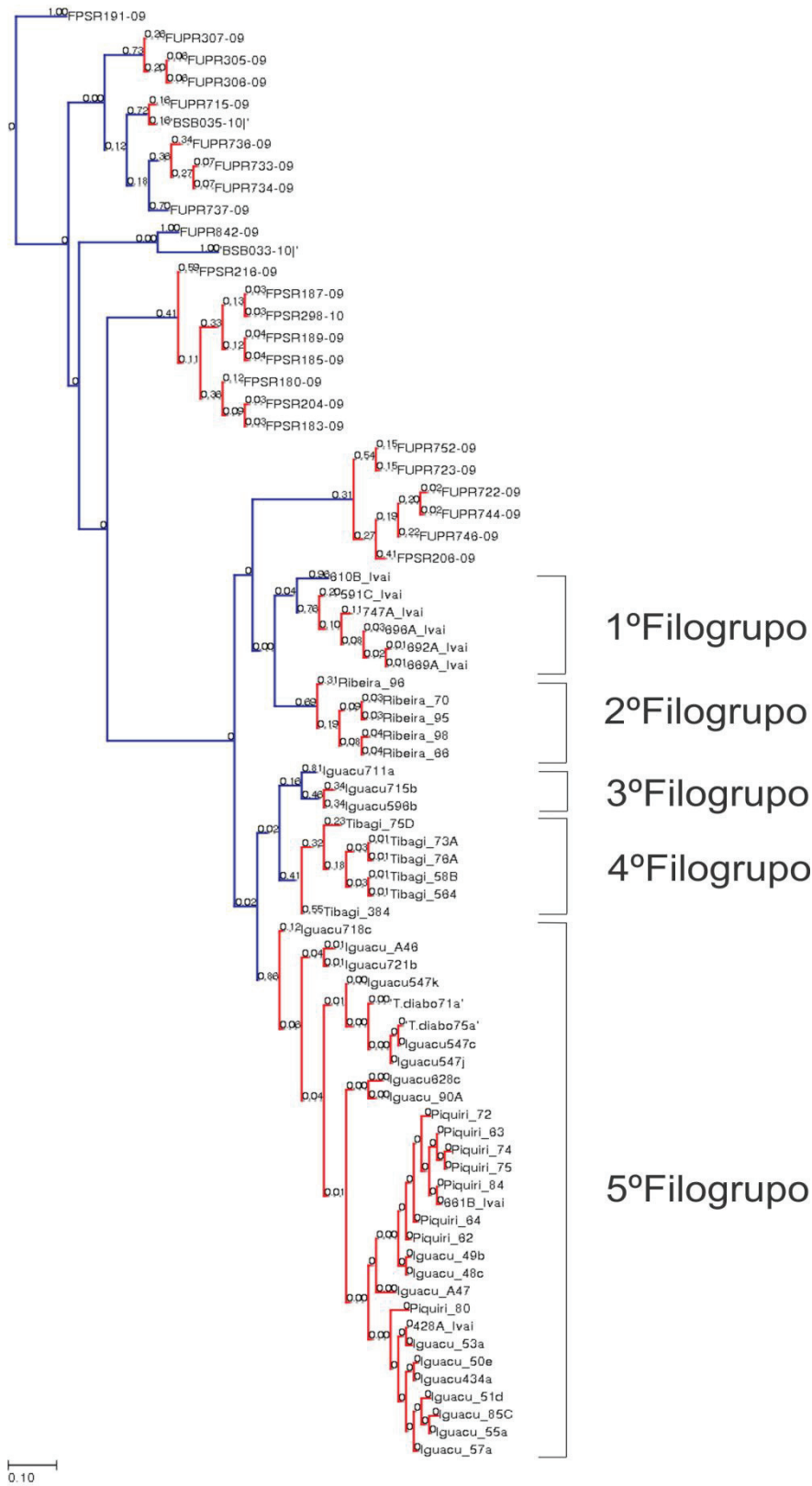


**Fig 3** Dendrograma neighbor-joining obtido pelo modelo Kimura 2 parâmetros para os 50 haplótipos únicos de COI de *Trichomycterus davisi* da bacia do Iguaçu (roxo), Ivaí (vermelho), Ribeira de Iguaçu (azul), Tibagi (verde), Piquiri (amarelo), mais outgroup obtidos no BOLD com 1000 reamostragens de bootstrap. Estão representados apenas valores de suporte acima de 75%.

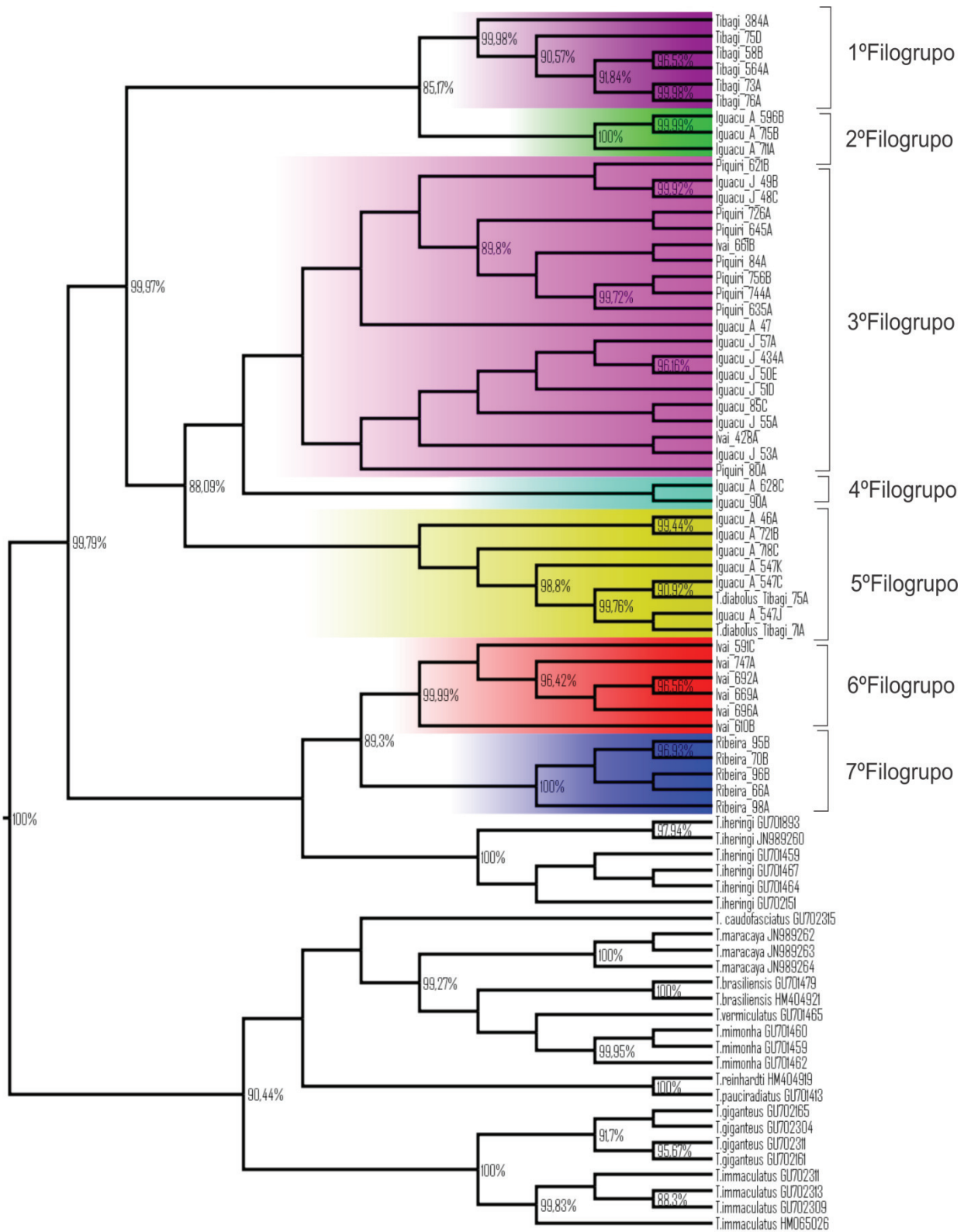


**Fig 4** Árvore de Máxima Verossimilhança para os haplótipos únicos de COI em *Trichomycterus davisi*, com modelo GTR + G + I. Destacando os cinco filogrupos formados pelo PTP. (Filogrupo 1-Ivai; Filogrupo 2-Ribeira; Filogrupo 3-Iguaçu; Filogrupo 4-Tibagi; Filogrupo 5-Iguaçu/Piquiri). Estão representados apenas valores de suporte acima de 85%.

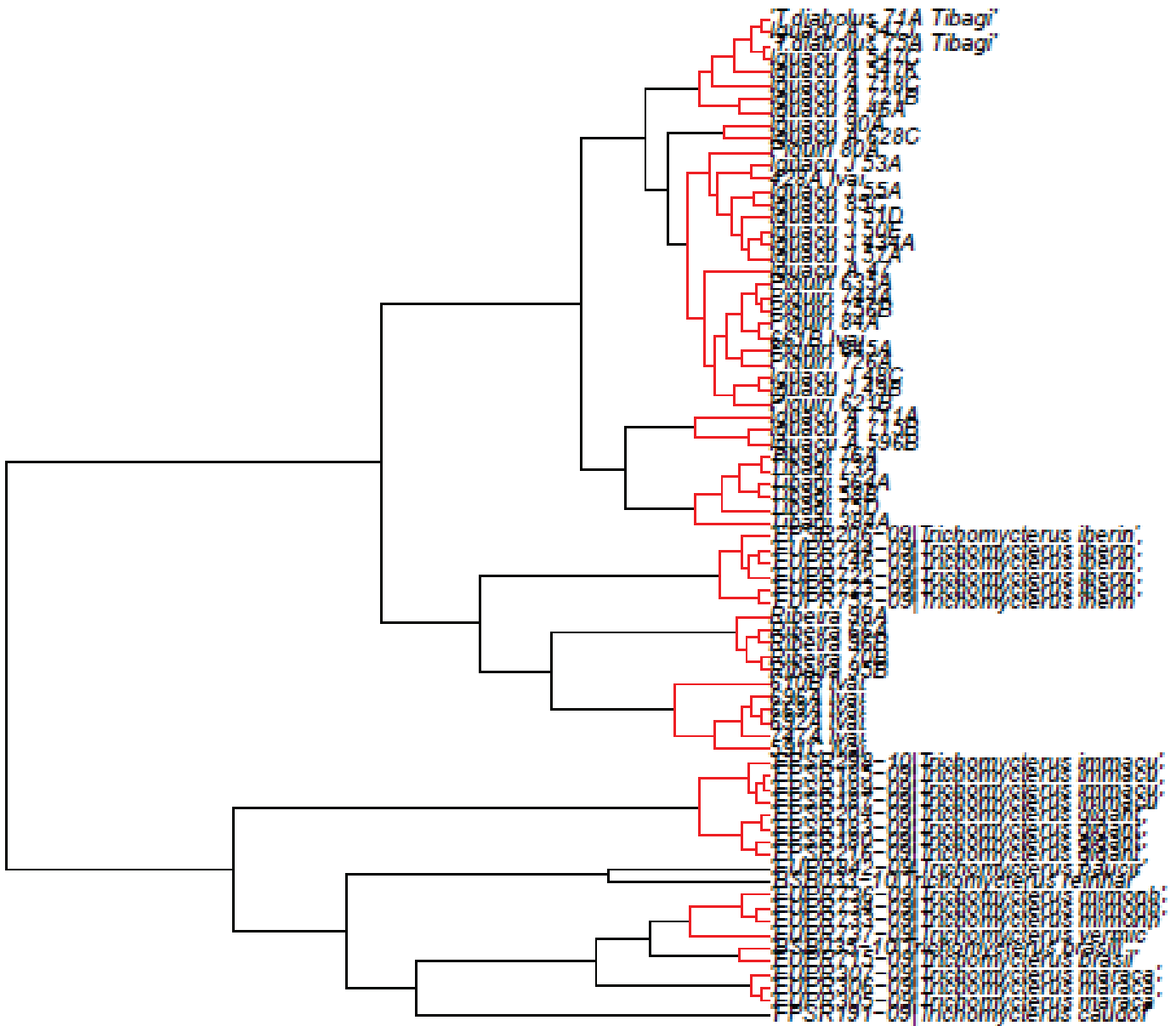




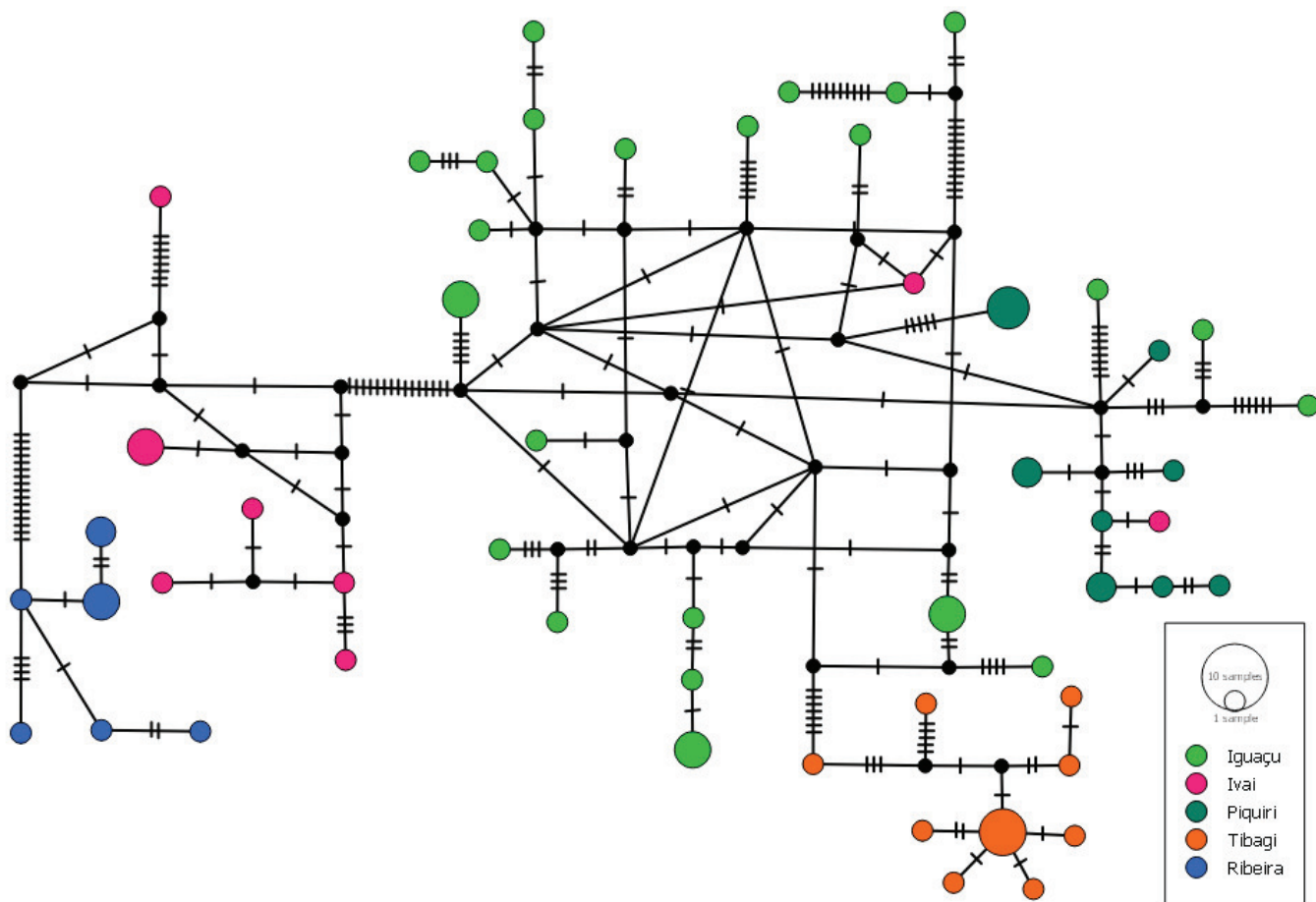
**Fig 5** Resultado da análise PTP com árvore de Máxima Verossimilhança, indicando os cinco filogrupos formados.



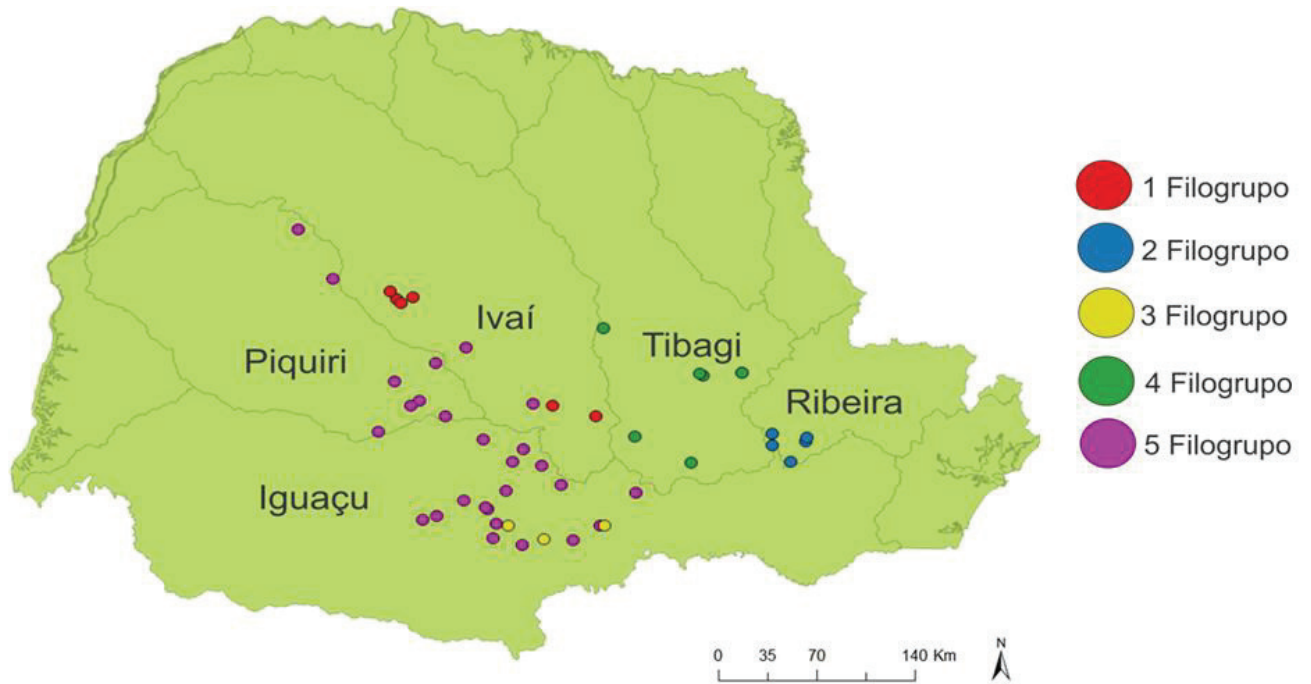
**Fig.6** Árvore Bayesiana, para os haplótipos únicos, com modelo GTR e distribuição Gama e sítios Invariáveis para COI em *Trichomycterus davisi*. Destacando os sete filogrupos formados pelo GMYC. (Filogrupo 1-Tibagi; Filogrupo 2-Iguaçu A; Filogrupo 3-Iguaçu/Piquiri; Filogrupo 4-Iguaçu B; Filogrupo 5-Iguaçu C; Filogrupo 6-Ivai; Filogrupo 7-Ribeira).



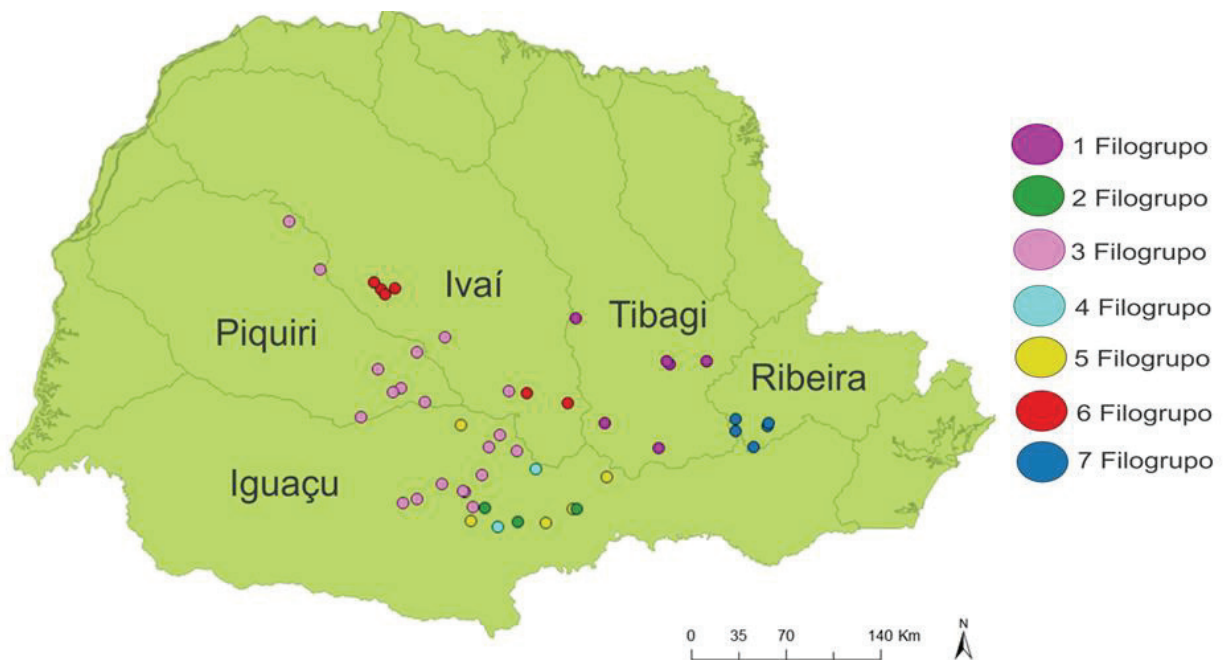
**Fig 7** Resultado da análise do GMYC com árvore Bayesiana, indicando os sete filogrupos formados.



**Fig 8** Rede de haplótipo com todas as 74 sequências de COI para *Trichomycterus davisi* das bacias do Iguaçu, Ivai, Ribeira de Iguape, Piquiri e Tibagi.



**Fig 9** Distribuição dos haplótipos de COI para *Trichomycterus davisi* nas bacias do Iguaçu, Ivaí, Piquiri, Tibagi e Ribeira de Iguape, no estado do Paraná, conforme os filogrupos formados pelo PTP.



**Fig10** Distribuição dos haplótipos de COI para *Trichomycterus davisi* nas bacias do Iguaçu, Ivaí, Piquiri, Tibagi e Ribeira de Iguape, no estado do Paraná, conforme os filogrupos formados pelo GMYC.

**Tabela 1** Valores de distância *p* para *Trichomycterus davisi* entre as bacias do Iguaçu, Ivaí, Tibagi e Ribeira de Iguape (abaixo da diagonal). Os valores de distância *p* dentro das bacias estão na diagonal.

	<b>Iguaçu</b>	<b>Piquiri</b>	<b>Tibagi</b>	<b>Ivaí</b>	<b>Ribeira</b>
<b>Iguaçu</b>	<b>0,018</b>				
<b>Piquiri</b>	0,017	<b>0,009</b>			
<b>Tibagi</b>	0,030	0,029	<b>0,009</b>		
<b>Ivaí</b>	0,035	0,034	0,045	<b>0,023</b>	
<b>Ribeira</b>	0,046	0,048	0,049	0,039	<b>0,003</b>

**Tabela 2** Valores de distância *p* para *Trichomycterus davisi* entre (abaixo da diagonal) e dentro (diagonal) dos filogrupos 1 (Ivaí), 2 (Ribeira de Iguape), 3 (Iguaçu), 4 (Tibagi) e 5 (Iguaçu/Piquiri) formados pelo programa de delimitação de espécie PTP.

	<b>1Filogrupo Ivaí</b>	<b>2Filogrupo Ribeira</b>	<b>3Filogrupo Iguaçu</b>	<b>4Filogrupo Tibagi</b>	<b>5Filogrupo Iguaçu/Piquiri</b>
<b>1Filogrupo Ivaí</b>	<b>0,0115</b>				
<b>2Filogrupo Ribeira</b>	0,0369	<b>0,0038</b>			
<b>3Filogrupo Iguaçu</b>	0,0464	0,0522	<b>0,0139</b>		
<b>4Filogrupo Tibagi</b>	0,0516	0,0490	0,0329	<b>0,0095</b>	
<b>5Filogrupo Iguaçu/Piquiri</b>	0,0412	0,0461	0,0320	0,0290	<b>0,0139</b>

**Tabela 3** Valores de distância  $p$  para *Trichomycterus davisii* entre (abaixo da diagonal) e dentro (diagonal) dos filogrupos 1 (Tibagi), 2 (Iguaçu A), 3 (Iguaçu/Piquiri), 4 (Iguaçu B), 5 (Iguaçu C), 6 (Ivaí) e 7 (Ribeira) formados pelo programa de delimitação de espécie GMYC.

	1Filogrupo Tibagi	2Filogrupo Iguaçu A	3Filogrupo Iguaçu/Piquiri	4Filogrupo Iguaçu B	5Filogrupo Iguaçu C	6Filogrupo Ivaí	7Filogrupo Ribeira
1Filogrupo Tibagi	<b>0,0095</b>						
2Filogrupo Iguaçu A	0,0329	<b>0,0139</b>					
3Filogrupo Iguaçu/Piquiri	0,0293	0,0324	<b>0,0126</b>				
4Filogrupo Iguaçu B	0,0255	0,0315	0,0171	<b>0,0104</b>			
5Filogrupo Iguaçu C	0,0291	0,0308	0,0154	0,0147	<b>0,0099</b>		
6Filogrupo Ivaí	0,0516	0,0464	0,0418	0,0425	0,0385	<b>0,0115</b>	
7Filogrupo Ribeira	0,0490	0,0522	0,0472	0,0414	0,0435	0,0369	<b>0,0038</b>

## DISCUSSÃO

Conforme a literatura, *Trichomycterus davisii* possui distribuição geográfica restrita às bacias do rio Iguaçu e do Ribeira de Iguape (Reis, 2003). Mas também vem sendo capturado nas bacias do Piquiri, Ivaí e Tibagi (W. J. da Graça, dados não publicados), além de Costa *et al.*, (2013) ter identificados alguns exemplares no Paranapanema. Em contraposição, os resultados obtidos neste trabalho expõem um cenário muito mais complexo. As análises demonstraram que, com alta probabilidade, a denominação *T. davisii* não comporta a escala de diversidade genética descoberta.

Uma primeira abordagem na delimitação de espécies utilizando sequências *COI* e o dimensionamento das distâncias  $p$  entre os grupos investigados. Carvalho *et al.* (2011) realizou testes para avaliar a eficácia do DNA barcode na bacia do rio São Francisco e viu que existem espécies do gênero *Astyanax* que são separadas com distâncias de zero a 1%, enquanto *Prochilodus argenteus* contra *Prochilodus costatus* estão separados por

distâncias de 1,7%. Geralmente, os pesquisadores usam um limiar de divergência de 2% como valor de corte na delimitação de espécies (Hubert *et al.*, 2008; Ward, 2009; Mabragaña *et al* 2011; Pereira *et al.*, 2011a; Pereira *et al.*, 2011b).

Antes de avançar na interpretação dos resultados, seriam esclarecedoras algumas observações sobre as metodologias de delimitação de espécies utilizadas aqui. Fujisawa e Barraclough (2013), autores do modelo GMYC, trazem que a análise não é muito robusta para separar grupos que sofreram especiação recente, e que valores acima de 50% de precisão devem ser levados em conta para uma discussão, o que pode ser o caso deste trabalho. Tang *et al.* (2014) avaliaram a eficiência dos testes de delimitação de espécies e verificaram que o GMYC tende a ser mais sensível na detecção de especiação, comparado com outros testes de delimitação como o PTP, e que nem sempre corresponde com a biodiversidade encontrada, com tendência a superestimar as espécies. Isso explicaria o fato GMYC formar mais filogrupos do que o PTP, por isso é sempre indicado usar mais de um teste para a delimitação de espécie.

O teste GMYC realizado aqui não foi significativo, com valor de confiança de apenas 83%, porém mesmo não atingindo a significância, o resultado do teste deve ser levado em consideração, pois as demais análises aqui apresentadas também separaram alguns agrupamentos encontrados neste teste, além da sugestão de Fujisawa e Barraclough (2013), sobre os valores de precisão. Conforme previsto por Tang *et al.* (2014), o teste GMYC superestimou e indicou a existência de sete possíveis OTUs, enquanto o teste PTP delimitou cinco OTUs.

Todas as análises demonstraram que a população residente na bacia do Ribeira de Iguape forma uma monofilia, com sustentação em valores de suporte *bootstrap* de 100% em todas as metodologias de reconstrução de árvores empregadas, isto é, *neighbor-joining*, máxima verossimilhança e bayesiana. A rede de haplótipos obtida permite, ainda, visualizar o posicionamento isolado do haplogrupo do Ribeira do Iguape em relação a outras populações. Os testes PTP e GMYC de delimitação de espécies colocaram a população do Ribeira de Iguape na condição de OTU independente, vale dizer, de espécie diferente. Reforçando esta indicação, estão as distâncias *p* obtidas. Entre todos os contrastes investigados com filogrupos revelados pelos testes PTP e GMYC, as maiores distâncias envolveram a população do Ribeira de Iguape. Com os filogrupos PTP e GMYC as distâncias médias foram 4,46% e 4,51%.



A população da bacia do Ivaí situou-se em todas as análises mais próxima da população do Ribeira de Iguape do que de outras populações, com distância  $p$  de 0,0369 conforme os filogrupos do PTP e GMYC. De modo similar, as análises *neighbor-joining*, máxima verossimilhança e bayesiana indicaram grupamento sólido, com suportes de *bootstrap* de 91,7%, 88% e 99%, respectivamente. A rede de haplótipos também confirma o agrupamento separado da população do Ivaí. Nas análises de delimitação de espécies PTP e GMYC essa população do Ivaí apareceu como uma OTU. A média de distância  $p$  entre Ivaí e os grupos formados pelo PTP foi de 3,9%, e para os grupos formados pelo GMYC foi de 4,25%. É preciso lembrar, porém, que na bacia do Ivaí ocorrem os haplótipos (661B e 428A) que não pertencem à OTU aqui identificada, e sim a uma outra OTU.

Portanto, todas as informações geradas alicerçam uma primeira inferência importante sobre as populações estudadas e identificadas como *T. davisii*. As populações do Ribeira de Iguape e do Ivaí formam um clado distinto das demais populações, com mais afinidade com *T. iheringi* do que com outras espécies de *Trichomycterus* já avaliadas molecularmente. Apesar de formarem um clado separado, a divergência genética entre elas é de tal magnitude que os testes de delimitação conferiram às populações do Ribeira do Iguape e do Ivaí a condição de espécies separadas. Evidentemente, amostragens mais amplas e análises adicionais são necessárias. Mas, se houver confirmação, em eventuais descrições as denominações serão diferentes de *T. davisii*, cuja localidade tipo fica na bacia do rio Iguaçú.

A população da bacia do Tibagi também apresentou uma clara monofilia em todas as análises, e seu agrupamento também é sustentado por altos valores de suporte para todos os métodos estatísticos utilizados. Essa população divergiu substancialmente de todas as outras. No entanto, o haplogrupo do Tibagi está posicionado com maior proximidade das bacias do Iguaçú e do Piquiri do que em relação aos haplogrupos do Ribeira de Iguape e do Ivaí, o que pode ser atestado pela verificação nas árvores produzidas pelos algoritmos *neighbor-joining* (Figuras 1 e 2), máxima verossimilhança (Figura 3) e bayesiana (Figura 5). O deslocamento para os haplogrupos do Iguaçú e do Piquiri ainda pode ser confirmado pelas distâncias  $p$  na faixa dos 3% em relação ao Iguaçú e Piquiri e distâncias no patamar de 5% em relação aos haplogrupos do Ribeira de Iguape e Ivaí, como pode ser visto no contido nas Tabelas 1, 2 e 3. A rede de

haplótipos também fornece evidências para monofilia e para a maior proximidade com Iguçu e Piquiri.

Os testes de delimitação de espécies PTP e GMYC também destacaram a população do rio Tibagi como sendo uma OTU. Este resultado está em concordância com o que poderia ser esperado diante de diferenças nucleotídicas tão acentuadas. A menor distância do haplogrupo Tibagi foi 0,0255 em relação a um haplogrupo nativo do Iguçu (715B, 711A e 596B). Todas as outras distâncias variaram de 0,0293 até 0,516. Pelo critério de corte de 2% usualmente adotado pelos pesquisadores, as distâncias encontradas podem ser evidências, que vem se juntar aos resultados do PTP e GMYC, de que a população do Tibagi não deve ser reconhecida como *T. davisii*. Então, a população do Tibagi seria a terceira espécie de *Trichomycterus* a ser extraída do complexo *T. davisii*.

A delimitação pelo PTP indicou duas OTUs para as bacias dos rios Iguçu, Piquiri formada por todos os haplótipos atuais da bacia do Iguçu, Piquiri e os indivíduos 661B e 428A do Ivaí, mas o teste do GMYC separou estes mesmos haplótipos em quatro grupos. Tomando-se a análise mais conservadora do PTP, uma OTU incluiria os haplótipos 715B, 711A, 596B. Em todas as análises esses haplótipos formam um agrupamento conciso, com altos valores de suporte. A segunda OTU abrangeria todos os outros haplótipos encontrados nas bacias do Iguçu, Piquiri e os haplótipos 661B e 428A do Ivaí. Consequentemente, de acordo com esses resultados mais duas espécies devem ser reconhecidas.

Desde que as duas OTUs estão presentes na bacia do rio Iguçu, uma delas pode ser *Trichomycterus davisii*. A outra OTU ainda seria desconhecida para a ciência e ainda estaria por ser descrita como espécie.

Outro ponto que atrai a atenção é o fato de *Trichomycterus diabolus* provenientes da bacia do Tibagi, ter uma forte relação com alguns indivíduos do Iguçu. Mesmo que com suporte baixo nas análises é interessante acompanhar essa relação, pois *T. diabolus* e *T. davisii* não pertencem ao mesmo grupo morfológico.

Ainda resta a questão da rota de dispersão dos haplogrupos/OTUs pertencentes ao provável complexo de espécies *T. davisii*. É provável que os dados disponíveis não sejam suficientes para conclusões seguras nesse contexto. As relações filogenéticas entre esses grupos devem ser estabelecidas com genes mais eficientes do que o COI,

como por exemplo o gene mitocondrial *cytb*. Além disso, devem ser incluídos gene nucleares. Entretanto, pelo menos um cenário especulativo pode ser imaginado.

Dentro do complexo *T. davisii*, a bifurcação que originou o clado com as OTUs do Ribeira de Iguape e Ivaí (exceto os indivíduos 661B e 428A) antecedeu a todas as outras cladogêneses. Além disso, esse clado antigo tem relação próxima com *T. iheringi*. Como visto, em algumas reconstruções o clado das OTUs Ribeira de Iguape e Ivaí seria até mais antigo do que *T. iheringi*, mas com suporte precário. Em qualquer situação, é possível imaginar que o ancestral do complexo *T. davisii* e, talvez, de *T. iheringi*, ocupava o alto Paraná e bacias do Leste. A colonização da bacia do Iguaçu teria acontecido a partir do alto Paraná.

Desde então o grupo teria se diversificado na bacia do Iguaçu. Atualmente, o terceiro clado mais antigo (715B, 711A e 596B) está na bacia do Iguaçu. O clado do Tibagi é mais recente e, de acordo com essa condição, teria origem na bacia do Iguaçu. O mesmo seria válido para as populações do Piquiri e parte da população do Ivaí. Mas, deve ser lembrado que dada a confiabilidade apenas mediana das relações filogenéticas dentro do complexo *T. davisii* estabelecidas pelo gene COI, essas são apenas ideias que devem aguardar novas investigações.

Por fim, é possível concluir que estamos diante não apenas de uma espécie e sim de um complexo de espécies, hipótese levantada pelos resultados apresentados, como o isolamento de algumas bacias e as distâncias genéticas encontradas entre elas. Porém, como neste trabalho foi utilizado apenas um marcador mitocondrial de origem materna, serão necessários mais testes moleculares, utilizando marcadores nucleares para poder medir e verificar a existência de fluxo gênico entre essas OTU's, e a partir daí elevar esses agrupamentos do complexo de espécie ao status de espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 18, 489-522.

Aydin, Z., Marcussen, T., Ertekin, A. S. & Oxelman, B. (2014). Marginal likelihood estimate comparisons to obtain optimal species delimitations in *Silene* sect. *Cryptoneurae* (Caryophyllaceae), *Plosone*, 9, 1 – 9.

Bandelt, H-J., Forster, P. & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37-48.

Barracough, T. G., Hughes, M., Ashford-Hodges, N. & Fujisawa, T. (2009). Inferring evolutionarily significant units of bacterial diversity from broad environmental surveys of single-locus data. *Biology Letters*. 5, 425 – 428.

Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27, 1767-1780.

Borin, L. A. & Martins-Santos, I. C. (2000). Intra-individual numerical chromosomal polymorphism in *Trichomycterus davisii* (Siluriformes, Trichomycteridae) from the Iguaçú River basin in Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 605-607.

Borin, L. A., Martins-Santos, I. C. & Oliveira, C. (2002). A natural triploid in *Trichomycterus davisii* (Siluriformes, Trichomycteridae): mitotic and meiotic characterization by chromosome banding and synaptonemal complex analyses. *Genetica*, 115, 253-258.

Carvalho, D. C., Oliveira, D. A., Pompeu, P. S., Leal, C. G., Oliveira, C. & Hanner, R. (2011). Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Informa Healthcare Mitochondrial DNA*, 22, 80-86.

Costa, A. D. A., Ferreira, D. G., Silva, W. F., Zanatta, A. S., Shibatta, O. A., & Galindo, B. A. (2013). Fishes (Osteichthyes: Actinopterygii) from the Penacho stream, upper Paraná River basin, Paraná State, Brazil. *Check List*, 9, 519-523.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772.

De Pinna, M. C. C. & Wosiacki, W. (2003). Family Trichomycteridae. In Reis, R. E., Kullander, S. O. & Ferraris Jr, C. J. (Eds) *Check List of the Freshwater Fishes of South America*. (pp. 270-290). Porto Alegre: Edipucrs.

Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D. & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Molecular Biology And Evolution*, 29, 1969-1973.

Eschmeyer, W. N. & Fong, J. D. (2015, Dezembro). Catalog of Fishes. California: California Academy of Sciences, 2015. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>.

Fujisawa, T. & Barraclough, T. G. (2013). Delimiting Species Using Single-Locus Data and the Generalized Mixed Yule Coalescent Approach: A Revised Method and Evaluation on Simulated Data Sets. *Systematic Biology*, 62, 707 – 724.

Fujita, M. K., Leaché, A. D., Burbrink, F. T., McGuire, J. A. & Moritz, C. (2012). Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, 27, 480 – 488.

Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergence among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, S96-S99.

Hebert, P. D. N. & Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Molecular Systems Biology*, 54, 852-859.

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. (2008). Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoS One*, Issue 6, e2490.

Ivanova, N. V., Zemplak, T. S., Hanner, R. H., Hebert, P. D. N. (2007). Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7, 544-548.

Kavalco, K. F., Brandão, K. d. O., Pazza, R., Foresti, L., Almeida- Toledo, L. F. (2009) *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): A new species complex within the genus *Astyanax*?. *Genetics and Molecular Biology*, 32, 477-483.

Leigh, J. W. & Bryant, D. (2015). Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6, 1110–1116.

Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.

Liu, L., Yu, L., Kubatko, L., Pearl, D. K. & Edwards, S. C. (2009). Coalescent methods for estimating phylogenetic trees. *Molecular Phylogenetics*, 53, 320 – 328.

Mabragaña, E., Astarloa, J. M. D., Hanner, R., Zhang, J. & Castro, M. G. (2011). DNA Barcoding Identifies Argentine Fishes from Marine and Brackish Waters. *PLoS One*, Issue 12, e28655.

Mehanna, M. N. (2010). Análise molecular e morfológica de exemplares de *Trichomycterus valenciennes*, 1832 da chapada dos Guimarães (bacia do paraguai) e ensaio sobre o complexo de espécies *Trichomycterus brasiliensis* Lütken, 1874. Botucatu: USP, 2010. 97 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas – Zoologia, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

Page, R. D. M. & Holmes, E. C. (1998). *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. Malden: Blackwell Science Publishing.

Pazza, R., Kavalco, F. K., Prioli, S. M. A. P., Prioli, A. J. & Bertollo, L. A. C. (2007). Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). Part 3 - Analysis of the RAPD and ISSR molecular markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 841-851.

Pauly, D & Froese, R. (2015, Dezembro) FishBase, World Wide Web electronic publication. Disponível em [http: www.fishbase.org](http://www.fishbase.org).

Pereira, L. H. G., Maia, G. M., Hanner, R., Foresti, F. & Oliveira, C. (2011a). DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Informa healthcare, Mitochondrial DNA*, 22, 71-79.

Pereira, L. H. G., Pazian, M. F., Hanner, R., Foresti, F. & Oliveira, C. (2011b). DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paraná Basin of Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22, 87–96.

Pereira, L. H. G., Hanner, R., Foresti, F., & Oliveira, C. (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate mega diverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics*, 14, 1-14.

Pons, J, Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W. D. & Vogler, A. P. (2006). Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, 55, 595-609.

Ornelas-Garcia, C. P., Domínguez-Domínguez, O. & Doadrio, I. (2008). Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actynopterigii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evolutionary Biology*, 8, 1-17.

Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. (2013). A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) System. *Plos One*. 8, e66213.

Reis, R. E., Kullander, S. O. & Ferraris, Jr, C. J. (2003). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs.

Silvestro, D. & Michalak, I. (2012). raxmlGUI: a graphical front-end for RaxML. *Organisms Diversity & Evolution*, 12, 335 – 337.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2529.

Tang, C. Q., Humphreys, A. M., Fontaneto, D., Barraclough, T. G. & Paradis, E. (2014). Effects of phylogenetic reconstruction method on the robustness of species delimitation using single-locus data. *Methods Ecology Evolution*, 5, 1086 – 1094.

Talavera, G., Dinca, V. & Vila, R. (2013). Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. *Methods in Ecology and Evolution*. 4, 1101–1110.



Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. & Clustal, W. (1994). Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673 - 4680.

Valdez-Moreno, M., Ivanova, N. V., Elías-Gutiérrez, M., Contreras-Balderas, S. & Hebert, P. D. (2009). Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *Journal of Fish Biology*, 74, 377–402.

Ward, R. D. (2009) DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1077–1085.

Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P. & Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29, 2869 – 2876.

## **NORMAS DO PERIÓDICO**

### **Zoologica Scripta**

#### ***Text***

All text, including figure legends must be typed in one column only, with 1.5 line spacing and no less than 3 cm margins on all sides. Page numbers and name of first author should be placed at the upper right of all text pages except the first. Please do not use right alignment and do not hyphenate words at the end of lines. Descriptions and diagnoses should be written in strict telegraphic style.

#### ***Scientific names***

Names of species and genera should be italicized or underlined. Spell out the entire scientific name the first time a species is mentioned; thereafter, abbreviate the generic part of the name (first letter and period) except at the beginning of a paragraph or sentence. New taxa should be indicated by the Latin abbreviations 'sp. n.', 'gen. n.' etc, and should be mentioned in the abstract. Use SI units and appropriate standard abbreviations.

#### ***Numbers***

Spell out numbers one through nine; for 10 and above, use numerals. For measured quantities (6 mm, 3 days, 4 years, etc.) use numerals. For sections written in telegraphic style, use numerals throughout.

#### **Format**

##### ***Title page***

Type at the upper left, name, address, telephone number, email address and, if available, fax number of the author to whom all correspondence should be sent. The title should be written in lower case letters and include the scientific name(s) of higher taxa (within parentheses and separated by commas) to indicate taxonomic position, but should not include Latin species names. Titles should not include authors of taxa. Below

the title, type the author(s) name(s) in capitals with one Christian name spelled out. Further down, type a short running title of up to 45 characters and, on a line below this, the authors name(s) (if more than two, type the first authors name followed by *et al.*).

Titles should not exceed 120 characters and should be written to emphasize the area of interest, rather than taxonomic details.

### ***Abstract***

The length of the abstract should not exceed 3% of the length of the text of the article. All newly described taxa must be given by name. Do not use paragraphs in the abstract. Write the abstract on a separate page.

### ***Headings***

Do not centre any headings. Four levels may be used:

#### **Principal heading**

Placed on a separate line and followed by a blank line. Used for Introduction, Material and methods etc.

#### ***First subheading***

Italicized, on a separate line, and followed by a blank line.

#### ***Second subheading.***

Italicized and followed by text on the same line. Should be used in taxonomic descriptions for Diagnosis, Remarks etc.

#### ***Third subheading.***

Indented, italicized and followed by text on the same line. Used in taxonomic descriptions for information holotype, paratypes, etymology, etc.

## **Literature citations and reference list**

### **References in Articles**

Arrangements of citations and reference list generally follows the Publication Manual of the American Psychological Association, 4th edition.

Citations in the text should read: Smith (1987) described..., or Smith (1987, 1988)... , or Smith & Brown (1986)...., or Smith *et al.* (1983)...., or '(Smith 1977, 1978; Berg & Brown 1980; Smith *et al*1984a, b; Warén & Bouchet 1986: figs. 17-21; Cook 1988: 3).... Note that a comma should only be interposed between author of a scientific name and the year of its publication to indicate authorship.

Author names should be arranged in alphabetical order in the reference list. If more than one paper by an author is cited for the same year, distinguish these papers by a, b, c, etc., after the year. Names of all co-authors should be given in the reference list. Specify figures or plates if these appear outside the pagination of a reference. Titles of journals should not be abbreviated.

### ***Article***

Goloboff, P. A., Farris, J. S. & Nixon, K. C. (2008). TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24, 774-786.

### **N.B. Journal titles should not be abbreviated**

### ***Book***

Parenti, L. R. & Ebach, M. (2009). *Comparative biogeography*. Berkely: University of California Press.

### ***Article in book***

Andrew, C. J. (2007). The grid and biodiversity informatics. In G. B. Curry % C. J. Humphries (Eds) *Biodiversity databases. Techniques, politics and applications* (pp. 83-82). Boca Raton: CRC Press.

### ***Computer programs***

Swofford, D. L. 1993. PAUP - *Phylogenetic Analysis Using Parsimony*. Ver. 3. 1.  
[Computer software and manual]. Champaign, Illinois: Illinois Natural History Survey.

### ***On-line source***

Eriksson, T. (1996, June). AutoDecay version 2.9.2. Available via  
<http://www.botan.su.se/systematik/Folk/Torsten.html>

### **Figures and tables**

Please consult our [Electronic Artwork Information for Authors guidelines](#) for the preparation of electronic artwork.

Graphs, drawings and photographs are figures and should be numbered consecutively as Fig. 1, Figs 2-4, Fig. 7C-F, etc. Tables are referred to as Table 1, Table 2, etc. (Roman numerals).

Adjust the size of the lettering and the thickness of the lines on illustrations according to intended reduction so that lettering size match in print, and make sure that lines do not disappear in reduction.

In the case of sectional figures, label each sub-figure A, B, C etc. The letters should appear 3-4 mm high in print. Other capital letters in the figures should appear about 2 mm high in print, lower case letters correspondingly smaller, but not less than 1 mm.

Abbreviations used in one or more figures should be explained, in a new paragraph at the end of the legend of the first figure where the abbreviations are used, e.g.:  
Abbreviations: a, atrium; CS, copulatory sac; py, pygidium; ...

Half-tone illustrations should be submitted in electronic form wherever possible. If originals are supplied they they must be trimmed at right angles and in the desired final size. The mounted prints should be trimmed to show only the essential features and mounted on white cardboard with a 1-3 mm space between those arranged in groups. Where necessary indicate the top of the figure.

*Photographs in colour are accepted only if printed at the authors expense. Please see below for details.*

Each figure or group of figures should be planned to fit into the area of either one or two columns of text. Drawings and photographs should not be included in the same group.

The maximum width of a one column illustration is 80 mm and of a two column illustration 169 mm; the maximum height of illustrations is 218 mm (but this should normally also include the legend). The size of submitted figures should not exceed A3, i.e. 420 × 297 mm.

Do not submit original illustrations before the paper is accepted for publication. If the author wishes artwork to be returned after publication, this must be clearly stated on submission; artwork is otherwise not normally returned after publication.

Figure legends should be listed on separate sheets at the end of the manuscript and arranged as in the following example:

Fig. 1. A-C. *Fenestrulina antarctica* sp. n. - A. An autozoid, × 60. - B. An ovicelled autozoid, × 60. - C. Detail to show orifice, ascopore and stellate frontal pores, × 160 - D, E. *Smittoidea pugiunculasp.* n. - D. A group of autozooids, × 50. - E. Detail of a condyle, × 2200.

Approximate positions of both figures and tables should be indicated in the left-hand margin of the manuscript.

Tables should not include any vertical lines.

## CONCLUSÃO GERAL

É possível concluir que estamos diante não apenas de uma espécie e sim de um complexo de espécies, onde a bifurcação que originou o clado com as OTUs do Ribeira de Iguape e Ivaí (exceto os indivíduos 661B e 428A) antecedeu a todas as outras cladogêneses. Além disso, esse clado antigo tem relação próxima com *T. iheringi*. Como visto em algumas reconstruções o clado das OTUs Ribeira de Iguape e Ivaí seria até mais antigo do que *T. iheringi*, mas com suporte precário. Em qualquer situação, é possível imaginar que o ancestral do complexo *T. davisii* e, talvez, de *T. iheringi*, ocupava o alto Paraná e bacias do Leste. A colonização da bacia do Iguaçu teria acontecido a partir do alto Paraná. Desde então o grupo teria se diversificado na bacia do Iguaçu. Atualmente, o terceiro clado mais antigo (715B, 711A e 596B) está na bacia do Iguaçu. O clado do Tibagi é mais recente e, de acordo com essa condição, teria origem na bacia do Iguaçu. O mesmo seria válido para as populações do Piquiri e parte da população do Ivaí. Mas, deve ser lembrado que dada a confiabilidade apenas mediana das relações filogenéticas dentro do complexo *T. davisii* estabelecidas pelo gene COI, essas são apenas ideias que devem aguardar novas investigações. Estas são as hipóteses levantadas pelos resultados apresentados, como o isolamento de algumas bacias e as distâncias genéticas encontradas entre elas. Porém, como neste trabalho foi utilizado apenas um marcador mitocondrial de origem materna, serão necessários mais testes moleculares, utilizando marcadores nucleares para poder medir e verificar a existência de fluxo gênico entre essas OTU's, e a partir daí elevar esses agrupamentos do complexo de espécie ao status de espécie.

ANEXO A: Lista das Espécies de *Trichomycterus* Provenientes do Bold, Usados Como Grupo Externo Nas Análises de Neighbor-Joining, Máxima Verossimilhança e Bayesiana.

FPSR180-09|*Trichomycterus\_giganteus*|COI-5P|GU702304  
FPSR183-09|*Trichomycterus\_giganteus*|COI-5P|GU702307  
FPSR187-09|*Trichomycterus\_immaculatus*|COI-5P|GU702311  
FPSR191-09|*Trichomycterus\_caudofasciatus*|COI-5P|GU702315  
FPSR298-10|*Trichomycterus\_immaculatus*|COI-5P|HM065026  
FUPR715-09|*Trichomycterus\_brasiliensis*|COI-5P|GU701479  
FUPR723-09|*Trichomycterus\_iheringi*|COI-5P|JN989260  
FUPR733-09|*Trichomycterus\_mimonha*|COI-5P|GU701460  
FUPR736-09|*Trichomycterus\_mimonha*|COI-5P|GU701462  
FUPR744-09|*Trichomycterus\_iheringi*|COI-5P|GU701464  
BSB033-10|*Trichomycterus\_reinhardti*|COI-5P|HM404919  
FPSR206-09|*Trichomycterus\_iheringi*|COI-5P|GU702151  
FUPR306-09|*Trichomycterus\_maracaya*|COI-5P|JN989263  
FUPR722-09|*Trichomycterus\_iheringi*|COI-5P|GU701473  
FUPR734-09|*Trichomycterus\_mimonha*|COI-5P|GU701459  
FUPR737-09|*Trichomycterus\_vermiculatus*|COI-5P|GU701465  
FUPR746-09|*Trichomycterus\_iheringi*|COI-5P|GU701467  
FUPR752-09|*Trichomycterus\_iheringi*|COI-5P|GU701893  
FUPR842-09|*Trichomycterus\_pauciradiatus*|COI-5P|GU701413  
BSB035-10|*Trichomycterus\_brasiliensis*|COI-5P|HM404921  
FPSR189-09|*Trichomycterus\_immaculatus*|COI-5P|GU702313  
FPSR216-09|*Trichomycterus\_giganteus*|COI-5P|GU702165  
FPSR185-09|*Trichomycterus\_immaculatus*|COI-5P|GU702309  
FUPR305-09|*Trichomycterus\_maracaya*|COI-5P|JN989262  
FUPR307-09|*Trichomycterus\_maracaya*|COI-5P|JN989264  
FPSR204-09|*Trichomycterus\_giganteus*|COI-5P|GU702161



ANEXO B: Localidades e coordenadas de coleta e número de tomo do material depositado na coleção ictiológica do Nupélia.

<i>Bacia</i>	<i>Município</i>	<i>Localidade</i>	<i>NUP</i>	<i>Coordenadas</i>
Bacia do Rio Iguaçú	Rebouças	rio Poço Bonito	15547	25°38'24.90"S/ 50°38'37.50"O
Bacia do Rio Iguaçú	Mallet	arroio sem nome	15721	25°51'9.94"S/ 50°52'21.63"O
Bacia do Rio Iguaçú	Cruz Machado	rio Louro	15715	25°51'1.00"S/ 50°50'30.30"O
Bacia do Rio Iguaçú	Cruz Machado	rio Pedrinho	15718	25°56'46.79"S/ 51°2'46.93"O
Bacia do Rio Iguaçú	Cruz Machado	rio Jacutinga	15596	25°56'17.09"S/ 51°13'59.88"O
Bacia do Rio Iguaçú	Cruz Machado	rio sem nome	15628	25°58'26.37"S/ 51°22'16.28"O
Bacia do Rio Iguaçú	Cruz Machado	riacho sem nome	15709	25°56'46.84"S/ 51°23'49.07"O
Bacia do Rio Iguaçú	Pinhão	rio Pimpãozinho	15711	25°50'58.03"S/ 51°27'26.79"O
Bacia do Rio Iguaçú	Pinhão	rio sem nome	15434	25°37'36.77"S/ 51°28'23.54"O
Bacia do Rio Iguaçú	Laranjeiras do Sul	córrego sem nome	15686	25°25'18.11"S/ 52°18'14.52"O
Bacia do Rio Iguaçú	Laranjeiras do Sul	córrego sem nome	15631	25°23'9.03"S/ 52°22'43.19"O
Bacia do Rio Ivaí	Cândido de Abreu	riacho sem nome	15384	24°34'52.38"S/ 50°50'59.77"O
Bacia do Rio Ivaí	Guamiranga	arroio Boa Vista	15591	25°8'51.94"S/ 50°54'7.88"O
Bacia do Rio Ivaí	Prudentópolis	rio Barra Grande	15696	25°4'55.37"S/ 51°10'35.41"O
Bacia do Rio Ivaí	Guarapuava	córrego sem nome	15428	25°3'53.51"S/ 51°17'42.11"O
Bacia do Rio Ivaí	Prudentópolis	riacho sem nome	15668	25°16'15.00"S/ 50°51'0.00"O
Bacia do Rio Ivaí	Pitanga	rio Limeira	15661	24°42'21.28"S/ 51°43'15.96"O
Bacia do Rio Ivaí	Iretama	riacho Água das Antas	15692	24°22'43.39"S/ 52°3'16.23"O
Bacia do Rio Ivaí	Iretama	rio Pinhalzinho	15669	24°25'4.70"S/ 52°7'23.70"O
Bacia do Rio Ivaí	Iretama	rio Tormentinha	15610	24°23'21.30"S/ 52°9'3.30"O
Bacia do Rio Ivaí	Luiziana	rio das Laranjeiras	15749	24°20'27.66"S/ 52°11'42.51"O
Bacia do Rio Piquiri	Marquinho	rio Cinco Voltas	15621	25°14'30.86"S/ 52°16'43.88"O
Bacia do Rio Piquiri	Palmital	rio da Casa	15645	24°55'11.81"S/ 52°10'7.66"O
Bacia do Rio Piquiri	Goioxim	rio Bonito	15726	25°4'27.82"S/ 52°4'3.44"O
Bacia do Rio Piquiri	Goioxim	rio Iara	15635	25°2'53.34"S/ 52°1'5.95"O
Bacia do Rio Piquiri	Mambore	rio dos Macacos	15756	24°15'12.80"S/ 52°33'23.60"O
Bacia do Rio Piquiri	Janiópolis	rio Barreiro	15760	24°12'42.77"S/ 52°47'51.32"O
Bacia do Rio Piquiri	Tuneiras do Oeste	rio Água Cinquenta e Cinco	15744	23°56'2.00"S/ 52°45'52.30"O
Bacia do Rio Tibagi	Castro	arroio Lajeado Maria Leme	15660	24°45'34.39"S/ 50°11'56.42"O
Bacia do Rio Tibagi	Carambeí	rio São Francisco	15382	24°49'26.10"S/ 50°14'39.30"O
Bacia do Rio Tibagi	Imbituva	arroio Grande	15564	25°16'45.45"S/ 50°39'12.29"O

<b>Bacia Rio da Areia (Iguaçu)</b>	Pinhão	arroio sem nome	W46	25 56 07S/ 51 33 04.6W
<b>Bacia Rio da Areia (Iguaçu)</b>	Pinhão	arroio sem nome	W47	25 50 24.6S/51 32 01.1 W
<b>Bacia Rio Jordão (Iguaçu)</b>	Pinhão	arroio sem nome	W48	25 44 35,5S/ 51 35 14,5W
<b>Bacia Rio Jordão (Iguaçu)</b>	Pinhão	rio Santa Terezinha	W49	25 44 01,5S/ 51 36 00,4W
<b>Bacia Rio Jordão (Iguaçu)</b>	Pinhão	rio Tapejara	W50	25 41 22,3S/ 51 44 33,2W
<b>Bacia Rio Jordão (Iguaçu)</b>	Reserva do Iguaçu	arroio sem nome	W51	25 48 40,6S/ 52 00 9,8W
<b>Bacia Rio Jordão (Iguaçu)</b>	Reserva do Iguaçu	arroio sem nome	W52	25 52 13,9S/ 51 54 30,9W
<b>Bacia Rio Jordão (Iguaçu)</b>	Reserva do Iguaçu	arroio Lajeado Capão Cortado	W53	25 47 06,3S/ 51 54 30,4W
<b>Bacia Rio Jordão (Iguaçu)</b>	Guarapuava	córrego Banana	W55	25 26 32,6S/ 51 25 44,4W
<b>Bacia Rio Jordão (Iguaçu)</b>	Guarapuava	arroio sem nome	W57	25 21 34S/ 51 21 27,7W
<b>Bacia Rio Tibagi</b>	Palmeira	arroio Crispim	W58	25 26 53,3S/ 50 17 55,9W
<b>Bacia Rio Tibagi</b>	Palmeira	arroio sem nome	W59	25 26 44,1S/ 50 19 04,5W
<b>Bacia Rio Tibagi</b>	Teixeira Soares	arroio Cachoeira	W60	25 25 4,5S/ 50 19 52,3W
<b>Bacia Rio Tibagi</b>	Teixeira Soares	arroio Ribeirão de Cima	W62	25 23 22,7S/ 50 20 58,4W
<b>Bacia Rio Tibagi</b>	Teixeira Soares	arroio Lajeado	W63	25 21 49,8S/ 50 20 37,2W
<b>Bacia Rio Tibagi</b>	Palmeira	rio dos córregos	W64	25 27 45,8S/ 49 55 07,4W
<b>Bacia Rio Ribeira de Iguape</b>	Ponta Grossa	rio da Mata	W66	25 19 49,5S/ 49 47 02,4W
<b>Bacia Rio Ribeira de Iguape</b>	Campo Largo	rio Santa Cruz	W67	25 19 28,1S/ 49 47 29,7W
<b>Bacia Rio Tibagi</b>	Palmeira	rio Sobrado	W68	25 20 12S/ 49 51 11,5W
<b>Bacia Rio Ribeira de Iguape</b>	Ponta Grossa	rio do Jacui	W70	25 15 17,8S/ 49 47 09,4W
<b>Bacia Rio Tibagi</b>	Palmeira	rio São Benedito	W71	25 17 39,7S/ 50 06 49,5W
<b>Bacia Rio Tibagi</b>	Carambei	rio Jotuba	W72	24 55 14,5S/ 50 00 34W
<b>Bacia Rio Tibagi</b>	Carambei	rio Santa Terezinha	W73	24 52 09,5S/ 50 14 44,8W
<b>Bacia Rio Tibagi</b>	Carambei	arroio sem nome	W75	24 51 54,8S/ 49 58 44,1W
<b>Bacia Rio Tibagi</b>	Carambei	arroio Tamanduá	W76	24 53 13,7S/ 50 13 22,3w
<b>Bacia do Rio Ivaí</b>	Pitanga	riacho sem nome	W77	24 45 58,5 S/ 51 49 54 W
<b>Bacia do Rio Piquiri</b>	Pitanga	riacho sem nome	W79	24 47 09,0S/ 51 53 19,3W
<b>Bacia do Rio Piquiri</b>	Pitanga	rio Barra Grande	W80	24 48 20,2S/51 54 34,3W
<b>Bacia do Rio Piquiri</b>	Pitanga	riacho sem nome	W81	24 48 20,8S/51 54 37,5W
<b>Bacia do Rio Piquiri</b>	Santa Tereza do Oeste	rio Chapéu do Sol	W82	24 54 11,1S/ 52 00 15,6W
<b>Bacia do Rio Piquiri</b>	Campina do Simão	riacho sem nome	W83	25 05 43,4S/ 51 49 29,1 W
<b>Bacia do Rio Piquiri</b>	Campina do Simão	riacho sem nome	W84	25 08 37,5s/ 51 51 18,5 W
<b>Bacia Rio Jordão (Iguaçu)</b>	Guarapuava	riacho sem nome	W85	25 28 04,6S/ 51 14 36,3W
<b>Bacia Rio Jordão (Iguaçu)</b>	Inácio Martims	riacho Lajeado	W87	25 30 05,3S/ 51 10 09,7 W

<b>Bacia Rio da Areia (Iguaçu)</b>	Inácio Martins	riacho sem nome	W88	25 31 34,6S/51 10 45,6W
<b>Bacia Rio da Areia (Iguaçu)</b>	Inácio Martins	riacho sem nome	W89	25 32 37,4S/ 51 12 42,7 W
<b>Bacia Rio da Areia (Iguaçu)</b>	Inácio Martins	riacho sem nome	W90	25 35 20,1S/ 51 06 59,8W
<b>Bacia Rio da Areia (Iguaçu)</b>	Inácio Martins	riacho sem nome	W91	25 35 16,3S/ 51 06 19,9W
<b>Bacia Rio da Areia (Iguaçu)</b>	Inácio Martins	riacho sem nome	W92	25 37 12,6S/51 07 21,2W
<b>Bacia Rio Ribeira de Iguape</b>	Ponta Grossa	rio Caçador	W93	25 08 04,2S/49 45 23,9 W
<b>Bacia Rio Ribeira de Iguape</b>	Campo Largo	rio Ribeirão	W94	25 12 31,5S/ 49 36 05,2w
<b>Bacia Rio Ribeira de Iguape</b>	Campo Largo	rio do Cerne	W95	25 16 38,9S/ 49 33 38,6W
<b>Bacia Rio Ribeira de Iguape</b>	Campo Largo	rio Açungui	W96	25 26 14,6S/ 49 39 55,3W
<b>Bacia Rio Ribeira de Iguape</b>	Campo Largo	riacho Boa Vista	W98	25 18 12,5S/49 34 15,9W
<b>Bacia Rio Ribeira de Iguape</b>	Campo Magro	rio da Barra	W100	25 17 57,3s/ 49 24 39,2W
<b>Bacia Rio Ribeira de Iguape</b>	Rio Branco do Sul	rio Córrego Fundo	W101	25 15 44,5s/ 49 23 57,2W
<b>Bacia Rio Ribeira de Iguape</b>	Cerro Azul	Ribeirão Estrela	W102	24 56 41,2S/ 49 17 57,5W

