

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONSERVAÇÃO E
MANEJO DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

SIMONE POTTEMAIER PHILIPPI

**O DNA BARCODE EM *TRACHELYOPTERUS* (VALENCIENNES, 1840).
QUANTAS ESPÉCIES SÃO SUPOSTAS NESTE GÊNERO AMPLAMENTE
DISTRIBUÍDO NA REGIÃO NEOTROPICAL?**

CASCATEL-PR

Agosto, 2023.

SIMONE POTTEMAIER PHILIPPI

O DNA BARCODE EM *TRACHELYOPTERUS* (VALENCIENNES, 1840). QUANTAS
ESPÉCIES SÃO SUPOSTAS NESTE GÊNERO AMPLAMENTE DISTRIBUÍDO
NA REGIÃO NEOTROPICAL?

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Área de concentração: Conservação e Manejo de Recursos Naturais.

Orientador: Roberto Laridondo Lui.

Coorientador: Dr. Jorge Luis Ramirez Malaver.

Assinatura do orientador

Cascavel,
Agosto, 2023.

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Pottemaier Philippi, Simone
O DNA BARCODE EM TRACHELYOPTERUS (VALENCIENNES, 1840).
QUANTAS ESPÉCIES SÃO SUPORTADAS NESTE GÊNERO AMPLAMENTE
DISTRIBUÍDO NA REGIÃO NEOTROPICAL? / Simone Pottemaier
Philippi; orientador Roberto Laridondo Lui; coorientador
Jorge Luis Ramirez Malaver. -- Cascavel, 2023.
62 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) --
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em
Conservação e Manejo de Recursos Naturais, 2023.

1. Auchenipteridae. 2. COI. 3. mtDNA. 4. taxonomia. I.
Laridondo Lui, Roberto, orient. II. Ramirez Malaver, Jorge
Luis, coorient. III. Título.

Dedico este trabalho em especial aos que perdi durante este processo.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná, que desde a graduação faz parte da minha história e possibilitou o meu crescimento em vários aspectos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, por me proporcionar essa experiência e a secretária Márcia pelos auxílios. Aos professores que tive a possibilidade de aprender. Aos meus colegas pela parceria nos inúmeros trabalhos em grupo.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Roberto Laridondo Lui, por me incentivar a procurar o laboratório quando comentei a ele meu interesse durante a colação de grau, e após um tempo ter respondido o e-mail quando abriram as inscrições. Obrigada pela coragem em oportunizar a mim a chance de realizar um mestrado, pela paciência e pelo apoio nos inúmeros momentos difíceis que passei durante esse processo. Pelos ensinamentos, e por confiar a mim um trabalho desta dimensão tornar se possível. Minha eterna gratidão! Ao professor Dr. Jorge Luis Ramirez Malaver por ter aceito o convite em me coorientar, pelas reuniões, sempre conduzindo algo a agregar ao trabalho, pela paciência durante as diversas análises e downloads que fizemos. Eu nem sabia que já havia lhe citado anteriormente, e com certeza foi enriquecedor poder contar com você neste momento, você é admirável, meus profundos agradecimentos. Ao professor Dr. Vladimir Pavan Margarido muito obrigada por todo conhecimento compartilhado, por me proporcionar o aprendizado das técnicas laboratoriais da melhor maneira, e no dia-a-dia no laboratório, conversando sobre diversos assuntos, rindo e chorando, fazendo aquele café para espertar, e as vezes trazendo até doces para adoçar a vida.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná) pelo apoio financeiro.

Agradeço as parcerias que possibilitaram a realização deste trabalho, a professora Dra. Carolina Doria da UNIR, ao professor Dr. Cláudio Oliveira da UNESP, a doutoranda Gabriela Omura que em Botucatu me auxiliou, sem ela tudo ficaria ainda mais difícil. A professora Dra. Karen Castro da Unillanos. Minha homenagem ao professor Dr. Daniel Rodrigues Blanco que nos deixou inesperadamente, com toda certeza ele acrescentaria grandes contribuições a este trabalho.

Aos que perdi durante esse processo. Minha bisavó Maria de Jesus, que sempre me perguntava como estavam os estudos, ficava feliz pelas minhas escolhas e sempre

tratava de contar dos meus estudos para quem a visitava. Ao meu pai, que sempre teve orgulho em dizer que eu segui nos estudos, que seria professora, e que na nossa última ligação me fez algumas perguntas sobre o futuro, mesmo sem sabermos nada dele. Minhas doloridas saudades pela perda dos meus gatos, parte da minha família. Clarck, Morgana e Dartagnan, meu amores, eu estava acostumada há anos a viver e estudar com vocês, e precisar terminar essa etapa da minha vida acadêmica com a ausência de vocês, em cima dos meus livros, deitados sobre os meus cadernos, tendo que dividir minha cadeira, atrás ou em cima do meu notebook pedindo atenção e mordendo a ponta das minhas canetas foi muito mais difícil e doloroso. Se fotos coubessem aqui, teria dezenas delas nessas situações para acrescentar. Vocês fazem parte da minha vida, e dedico a vocês também.

Agradeço a minha mãe, meu porto seguro, por possibilitar que eu estude e siga meus objetivos, por entender na maioria das vezes que eu não podia por que precisava estudar. Pelo apoio, pelas visitas ao meu canto de estudos, pelas risadas que me fez aliviar diversas vezes o estresse e a tensão. Ao meu namorado por entender as minhas faltas, pois havia algo do mestrado a ser feito. Aos meus amigos do laboratório Chrystian Haerter, Diana Perin, Gabrielle Antoniazzi, Karoline Rabelo, Leticia de Jesus e Cleisson Casarotto. Obrigada pelo convívio que tivemos neste tempo que é muito desafiador, e ter pessoas como vocês ajuda a manter um clima mais saudável. Enfim, obrigada meus amigos!! Obrigada a todos que de alguma forma colaboraram com a concretização desta dissertação.

RESUMO

Trachelyopterus é um gênero de peixes neotropicais, que apesar de alguns estudos, ainda carece de adequada compreensão quanto a sua diversidade. Este gênero é atualmente compreendido por 16 espécies válidas e 4 *species inquirendae*. Considerando o potencial da ferramenta do DNA Barcode para investigação da biodiversidade, principalmente quanto à delimitação de espécies, este trabalho teve por objetivo aplicar esta metodologia. Foram utilizadas 145 sequências da subunidade 1 do citocromo C oxidase (COI) disponíveis em banco de dados, e 206 novas sequências a serem depositadas, totalizando 351 com alinhamento de 523 pb, as quais são provenientes de amostras de quase todas as bacias hidrográficas da região Neotropical. A análise gerou as Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs) através do emprego de três métodos de delimitação de espécies para identificar MOTUs: o modelo generalizado misto Yule coalescente (GMYC), o processo de árvore Poisson (PTP) e a implementação bayesiana do modelo PTP (bPTP). Os distintos outputs de delimitação foram comparados usando o pipeline Spdel, gerando consenso (MOTUs Consensus), o qual indicou 27 MOTUs. A partir dessas análises, é provável que a diversidade de *Trachelyopterus* encontra-se subestimada e mal compreendida, além disso, podemos indicar claramente que é necessário uma nova revisão do gênero, de preferência se baseando na taxonomia integrativa.

PALAVRAS-CHAVE: Auchenipteridae, COI, mtDNA, taxonomia

ABSTRACT

Trachelyopterus is a neotropical fish genus, which despite some studies, still lacks adequate understanding of its diversity. This genus is currently comprised of 16 valid species and 4 species inquirendae. Considering the potential of the DNA Barcode tool for investigating biodiversity, especially regarding the delimitation of species, this work aimed to apply this methodology. 145 sequences cytochrome C oxidase subunit 1 (COI) available in the database and 206 new sequences to be deposited were used, totaling 351 with 523 bp alignment, which come from samples of almost all hydrographic basins in the Neotropical region. The analysis generated the Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs) using three species delimitation methods to identify MOTUs: the generalized mixed Yule coalescing model (GMYC), the Poisson tree process (PTP) and the Bayesian implementation of the PTP model (bPTP). The different delimitation outputs were compared using the Spdel pipeline, generating consensus (MOTUs Consensus), which indicated 27 MOTUs. From these analyses, it is likely that the diversity of *Trachelyopterus* is underestimated and misunderstood, in addition, we can clearly indicate that a new revision of the genus is necessary, preferably based on integrative taxonomy.

Keywords: Auchenipteridae, COI, mtDNA, taxonomy

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Peixes Neotropicais	1
1.2	Siluriformes	2
1.3	Auchenipteridae	3
1.4	Divergências em “ <i>Parauchenipterus</i> ” e <i>Trachelyopterus</i>	3
1.5	DNA mitocondrial.....	9
1.6	DNA Barcode e sua importância para estudar a biodiversidade	10
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivo específico.....	15
3	MATERIAL e MÉTODOS	15
3.1	Locais de coleta e amostragem	15
	Amostragem e depósito das amostras	15
	Extração, Amplificação, Purificação e Sequenciamento de DNA.....	16
	Edição, alinhamento e análises de sequências	17
	REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS)	19
	CAPITULO 1	1
	O DNA barcode em <i>Trachelyopterus</i> (Valenciennes, 1840). Quantas espécies são suportadas neste gênero amplamente distribuído na região Neotropical?	1
	Resumo	1
	Introdução	2
	Material e métodos	6
	Extração, Amplificação, Purificação e Sequenciamento de DNA	6
	Edição, alinhamento e análises de sequências	7
	Resultados	8
	Discussão	15
	Incongruências entre número de espécies nominal identificadas, número de MOTUs e diversidade atualmente conhecida para <i>Trachelyopterus</i>	15
	MOTUs versus identificação nominal versus distribuição geográfica	16
	Conclusão	21
	Referências	22

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

- Tabela 1.** Histórico resumido das considerações taxonômicas em *Trachelyopterus* e “*Parauchenipterus*”..... 6
- Tabela 2.** Distribuição geográfica das espécies de *Trachelyopterus* conforme Eschmeyer's Catalog of Fishes (Frick et al., 2023) 8

CAPÍTULO 1

- Tabela 1.** Espécies atualmente alocadas em *Trachelyopterus* com informações sobre distribuição geográfica (Fricke et al., 2023), e relação comparando com a última revisão para o gênero. As species inquirendae em *Trachelyopterus* e a incerta *Trachelyopterus isacanthus* não foram incluídas em Calegari et al. (2019)..... 5
- Tabela 2.** MOTUs identificadas pelo estudo. Máximas (Máx) e médias (Média) de variação intraespecífica. MOTU mais próximo/similar (NN). Distância média entre as MOTUs (DTONN). Bacias hidrográficas relacionadas das amostras que integram a MOTU. Espécies nominais relacionadas às amostras que integram a MOTU 9

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Primeira ilustração de “*Parauchenipterus*” (Seba, 1759) 4
- Figura 2.** Esquema da molécula de DNA mitocondrial de vertebrados 10
- Figura 3.** Esquema do barcode gap. A distribuição da variação intraespecífica é mostrada em vermelho e da interespecífica em amarelo 13
- Figura 4.** Esquema conceitual das relações Filogenéticas e Terminologia. (A) Monofilia recíproca: membros de cada espécie compartilham um único ancestral comum 14

CAPÍTULO 1

- Figura 5.** Árvore obtida pelas análises de delimitações de espécies para o gênero *Trachelyopterus*. Enfoque das MOTUs 01 a 07, de cima para baixo 11
- Figura 6.** Árvore obtida pelas análises de delimitações de espécies para o gênero *Trachelyopterus*. Enfoque das MOTUs 08 a 19, de cima para baixo 12
- Figura 7.** Árvore obtida pelas análises de delimitações de espécies para o gênero *Trachelyopterus*. Enfoque das MOTUs 20 a 23, de cima para baixo 13
- Figura 8.** Árvore obtida pelas análises de delimitações de espécies para o gênero *Trachelyopterus*. Enfoque das MOTUs 24 a 27, de cima para baixo 14

1 Introdução

1.1 Peixes Neotropicais

Os peixes constituem um grupo altamente diversificado, ultrapassando a validação de 36.500 espécies, o equivalente a mais da metade dos vertebrados (Nelson 2016, Frickie et al. 2023). Destas, mais de 18 mil espécies são correspondentes a peixes de água doce (Frickie et al. 2023). A região Neotropical, que compreende do México Central ao Brasil, incluindo a América Central, as ilhas do Caribe e a América do Sul, quase em sua totalidade (Murphy e Lugo 1986; Conservancy 2005; Antonelli e Sanmartin 2011) é conhecida por abrigar uma incrível diversidade de espécies de peixes, com estimativas apontando para mais de 9 mil espécies (Reis et al., 2016), representando um oitavo de toda biodiversidade de vertebrados da região (Vari e Malabarba, 1998). É detentora de sete dos trinta e cinco hotspots de biodiversidade (Willians et al. 2011), o que é produto de eventos geológicos que moldaram as características biogeográficas (Carvalho e Almeida, 2011), juntamente com as condições climáticas favoráveis à vida aquática na região (Albert et al., 2011; Reis et al. 2016). Além disso, o neotrópico apresenta sub-regiões com alto grau de endemismo (Paraná 2004; Ahmad, 2011; Guergel et al 2012; Baumgartner et al. 2012).

O Brasil é um importante constituinte da região, sendo que em termos de sistemas hidrográficos é a maior rede do planeta, e conseqüentemente, possui uma das maiores riquezas de espécies de peixes de água doce, no entanto, é importante ressaltar que apenas uma parte dessa diversidade é atualmente conhecida (Graça e Pavanelli, 2007). A abundância aquática na região Neotropical, especialmente no território brasileiro, destaca a importância contínua de estudos voltados para a área, visando a preservação e compreensão desse valioso patrimônio natural (Agostinho et al. 2007). Dentre as bacias hidrográficas relativa a região Neotropical, temos destaque entre os principais sistemas hidrográficos brasileiros, o Amazônico, o Paraná-Paraguai, o Tocantins-Araguaia, São Francisco e bacias costeiras. Destes, o presente trabalho inclui coletas de *Trachelyopterus* pertencentes à todas estas bacias citadas.

1.2 Siluriformes

Siluriformes compreende peixes morfológicamente diversos (Ferrari, 2007), com 39 famílias e aproximadamente 3.920 espécies reconhecidas (Frickie et al., 2021). Eles são amplamente distribuídos, ocorrendo em todos os continentes e, embora a maioria das espécies se restrinja a água doce, alguns são tolerantes a águas salobras (Nelson, 2006). É uma das principais ordens de peixes de água doce do mundo e seus representantes podem não ultrapassar 20 milímetros quando adultos, como serem superiores a 2 metros, variedade morfológica que reflete parte de sua complexidade taxonômica (Teugels, 1996; Britto, 2002; Nelson et al., 2016).

Popularmente conhecido como “bagres”, são caracterizados pela ausência de escamas no corpo, que é revestido por pele ou placas ósseas. Todos os indivíduos dessa ordem apresentam barbilhões, sensitivos ao redor da boca, que são providos de numerosas papilas gustativas utilizadas na detecção de alimentos, dentes pequenos, curvos, agrupados em faixas ou placas, semelhantes a uma lixa, normalmente em três pares. Nadadeiras raiadas e bem separadas, geralmente portam um espinho forte e pontiagudo nas margens do primeiro raio das nadadeiras peitorais e dorsal, e é comum a presença de uma nadadeira adiposa (Moyle et al., 1988; Baumgartner et al., 2012; Nelson et al., 2016).

Muitas espécies apresentam o corpo achatado dorso-ventralmente adaptado à vida bentônica, e a maioria possui hábitos noturnos ou crepusculares (Ferreira et al., 1998; Sousa, 2010) orientando-se principalmente por quimiorrecepção, habitam o fundo de rios entre pedras e vegetação e possuem hábitos mais sedentários (Britski, 1991). O padrão de pigmentação mais comum encontrado em Siluriformes são manchas escuras espalhadas por todo o corpo, conferindo um colorido de camuflagem com tons de marrom (Sousa, 2010). Muitos são carnívoros e outros se alimentam principalmente de algas ou matéria orgânica, raspas de folhas, de pedras ou de galhos submersos (Baumgartner et al., 2012). Várias espécies têm a capacidade de respirar o ar atmosférico, o que lhes possibilita habitar ambientes não suportados por outros grupos de peixes (Ferreira et al., 1998).

Quanto a filogenia desse grupo, muitos pesquisadores concordam que Siluriformes e Gymnotiformes são grupo-irmão, embasados sobretudo por evidências morfológicas (Fink, 1986; Lauder et al., 1983; Diogo et al., 2008). Entretanto, algumas

análises cladísticas com base em dados moleculares publicadas nos últimos anos, suportam que o grupo-irmão dos Gymnotiformes seria Characiformes (Dimmick et al., 1996; Mayrinck, 2015), e outros autores sugerem que os Siluriformes são grupo-irmão dos Characiformes (Lavoué et al., 2005; Nakatani, 2011).

1.3 Auchenipteridae

Auchenipteridae é uma família limitada à região Neotropical é composta por 25 gêneros e 127 espécies validadas (Fricke et al., 2021). Juntamente com Doradidae e Aspredinidae, Auchenipteridae pertence à superfamília Doradoidea (Sullivan et al., 2006; Nelson et al., 2016). Os Auchenipteridae são conhecidos como bagres de tronco, organizados em duas subfamílias, Auchenipterinae com 78 espécies e Centromochlinae com 49 espécies. No entanto, várias novas espécies aguardam uma descrição formal, como em *Gelanoglanis*, *Glanidium*, *Spinipterus*, *Tatia*, *Trachelyichthys*, *Trachelyopterus* e *Tympanopleura* (Calegari, 2019).

A inseminação interna é uma particularidade destacada em Auchenipteridae, e que sustenta a hipótese de monofiletismo da família. Fêmeas depois de inseminadas são capazes de manter os espermatozoides em “pacotes” no ovário por algum tempo antes de ocorrer fecundação (Baumgartner et al., 2012). Apresentam comumente um modo de vida noturno, hábitos alimentares diversos que incluem frutas, e insetos presentes na superfície da água, enquanto alguns poucos representantes do grupo são inicialmente planctívoros e piscívoros (Ferraris, 2003).

Algumas famílias pertencentes aos Siluriformes exibem a capacidade de produção de sinais sonoros. Especialmente Doradoidea (Auchenipteridae, Aspredinidae e Doradidae), possuem uma variante bioacústica singular. Espécies desta superfamília emitem sinais sonoros em situações agonísticas, reprodutivos e de perturbações, além de exibirem habilidade de distinção de seus próprios sons (Kaatz, 2002; Kaatz et al., 2012). Sendo assim, a bioacústica dos Doradoidea é considerada um caráter taxonômico (Kaatz et al., 2012).

1.4 Divergências em “*Parauchenipterus*” e *Trachelyopterus*

Com mais de dois séculos de estudos e discussões por diversos autores,

“*Parauchenipterus*” é conhecido por apresentar uma taxonomia problemática, principalmente pela similaridade morfológica entre as espécies destes gêneros (Cerqueira, 2015; Felicetti, 2018). Segundo Akama (2004), o gênero “*Parauchenipterus*” tem histórico taxonômico confuso e com problemas desde seu relato. A primeira ilustração de um exemplar do gênero foi feita por Seba em 1759 (Figura 1), um desenho simples com representações morfológicas que poderiam corresponder a qualquer espécie de “*Parauchenipterus*”/*Trachelyopterus*. Além do mais, informações sobre a localidade de coleta desse exemplar não é conhecido e o material zoológico onde se encontrava a espécime foi leiloado e seu destino é incerto (Akama, 2004).

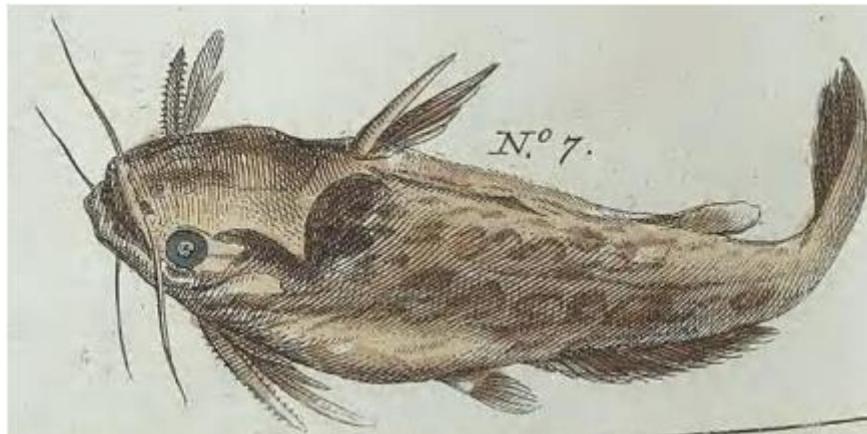


Figura 1. Primeira ilustração de “*Parauchenipterus*” (Seba, 1759).

Mesmo diante dessa falta de informações morfológicas e do local de coleta do exemplar, Linnaeus em 1766 descreve a espécie apenas baseado na ilustração de Seba (1759), o que adiante tornou a taxonomia do gênero ainda mais insegura. Em atenuante, Bloch (1794) passa a utilizar *Silurus galeatus* (Linnaeus, 1766) como espécie-tipo para caracterizar “*Parauchenipterus*”, descrevendo a mesma espécie que já havia sido descrita por Linnaeus (1766). Dessa forma, as primeiras descrições do gênero “*Parauchenipterus*” foram fundamentadas em uma cascata de potenciais erros e poderiam ser equivalentes a qualquer espécie atual do gênero, resultando em uma fragilidade taxonômica que perdura até a atualidade (Akama, 2004). Diante desse paradoxo, várias revisões foram feitas na sistemática do grupo, sendo um breve histórico das considerações taxonômicas feita por autores sobre “*Parauchenipterus*” e *Trachelyopterus*, o que está sumarizado na Tabela 1.

A primeira tentativa de adequação foi realizada por Gunther em 1864, 105

anos após a primeira ilustração do gênero ser apresentada, que resultou em intitular “*Parauchenipterus*” como sinônimo de *Auchenipterus* Valenciennes, 1840. Transcorrido 24 anos, Eigenmann e Eigenmann (1888) propuseram o gênero como equivalente a *Trachycorystes* Bleeker, 1862 removendo a validação anterior cunhada por Gunther (1864). Contudo, a problemática ainda não havia sido resolvida e passados 84 anos, Mess (1974) revalidou o gênero “*Parauchenipterus*” e retirou a sinonímia com *Trachycorystes* Bleeker. Após 14 anos, Ferraris Jr. (1988) propôs pela primeira vez que “*Parauchenipterus*” seria sinônimo de *Trachelyopterus* (Akama, 2004).

Divergências acerca da taxonomia continuaram entre os autores, com Curran (1989) validando os dois gêneros “*Parauchenipterus*” e *Trachelyopterus*, e seguindo a mesma linha Royero (1999) publicou seu estudo dos gêneros como unidades distintas. Em 2003, Ferraris Jr. voltou a defender a sinonímia, reforçando novamente sua interpretação no livro “Check List of Freshwater Fishes of South and Central America”. No ano seguinte, Akama discordou de Ferraris com relação a “*Parauchenipterus*” e *Trachelyopterus*, considerando gêneros distintos.

Tabela 1. Histórico resumido das considerações taxonômicas em *Trachelyopterus* e “*Parauchenipterus*”.

ANO	AUTOR	CONSIDERAÇÕES
1759	Seba	Pela primeira vez ilustrou <i>Parauchenipterus</i>
1766	Linnaeus	Descreveu a espécie
1794	Bloch	Utilizou como espécie-tipo <i>Silurus galeatus</i> para caracterizar <i>Parauchenipterus</i>
1864	Gunther	Sinonimizou <i>Parauchenipterus</i> com <i>Auchenipterus</i>
1888	Eignmann e Eignmann	Retirou <i>Parauchenipterus</i> de <i>Auchenipterus</i> , considerando-o sinônimo de <i>Trachycorystes</i>
1972	Britski	Corroborou a hipótese de Eignmann e Eignmann
1974	Mees	Revalidou o gênero <i>Parauchenipterus</i>
1988	Ferraris Jr	Propôs pela primeira vez que <i>Parauchenipterus</i> seria sinônimo de <i>Trachelyopterus</i>
1989	Curran	<i>Parauchenipterus</i> foi desconsiderado como sinônimo de <i>Trachelyopterus</i> , validando os dois gêneros
1999	Royero	Considerou <i>Parauchenipterus</i> e <i>Trachelyopterus</i> gêneros distintos e válidos
2003	Ferraris Jr	Considerou os gêneros <i>Parauchenipterus</i> e <i>Trachelyopterus</i> sinônimos, colocando todas as espécies dentro de <i>Trachelyopterus</i>
2004	Akama	Novamente separou <i>Parauchenipterus</i> e <i>Trachelyopterus</i> , como gêneros distintos e válidos
2007	Ferraris Jr	Reafirmou <i>Parauchenipterus</i> e <i>Trachelyopterus</i> como sinônimos e todas as espécies destes dois gêneros em <i>Trachelyopterus</i>
2007	Buckup et al.	Consideram os dois gêneros válidos
2007	Graça e Pavanelli	Consideram os dois gêneros válidos

Fonte: Haerter (2021).

Com base em nove sinapomorfias, Akama (2004) propôs o gênero “*Parauchenipterus*” como grupo irmão de *Trachelyopterus* são elas: (1) presença de uma conexão ligamentosa entre o epoccipital e a parapófise da quinta vértebra, caráter proposto por Ferraris (1988) para definir o gênero *Trachelyopterus*; (2) inexistência de conexão entre o epoccipital e a placa nugal posterior; (3) presença de um ramo medial do processo epoccipital menor ou igual ao ramo; (4) presença de uma barra frontal separando as duas fontanelas; (5) presença de duas aberturas na margem externa do hiomandibular que divide o ramo do nervo trigêmeo em dois; (6) presença de bexiga natatória com dois cecos voltados para frente exclusiva nas espécies de “*Parauchenipterus*”. Características observadas pela primeira vez por Britski (1972) e propostas como caracteres diagnósticos por Royero (1999); (7)

alongamento do acúleo dorsal de machos, apesar de “*Parauchenipterus striatulus*” e “*Parauchenipterus porosus*” apresentarem o acúleo alongado; (8) em todas as espécies do gênero o barbilhão maxilar tem certo grau de ossificação podendo ser totalmente ossificado em algumas espécies, (9) em “*Parauchenipterus*” sp., “*P. striatulus*” e “*P. porosus*”, este caráter relaciona-se com o dimorfismo sexual nas espécies de “*Parauchenipterus*”, contradizendo as hipóteses de Ferraris Jr. (1988) e Royero (1999), que negaram a existência do dimorfismo sexual no gênero (Akama, 2004).

Além disto, Akama (2004) sugeriu a remoção de espécies antes incluídas em “*Parauchenipterus*” para um novo gênero, denominado “*Amplexiglanis*”, similar à proposta feita por Royero em 1999, trazendo as seguintes espécies: “*Amplexiglanis insignis*”, “*Amplexiglanis amblops*”, “*Amplexiglanis fisheri*”, “*Amplexiglanis badeli*”, e “*Amplexiglanis teaguei*”, para este novo gênero, correspondendo a um grupo-irmão de *Ageneiosus* e *Tetranematichthys*. Esta nova divisão, apesar de não validada, carrega um papel importante na discussão envolvendo *Trachelyopterus*, pois parte das espécies que compunham o gênero “*Parauchenipterus*” (atual *Trachelyopterus*) foi impactado em sua organização e filogenia, estabelecendo um importante elo para localizar e identificar parte do rearranjo realizado por Akama (2004), pois as novas espécies indicadas pelo autor para os gêneros “*Parauchenipterus*” e *Trachelyopterus*, foram mantidos os epítetos específicos, permitindo localizá-las na literatura contemporânea.

Dando continuidade na dificuldade de esclarecer a taxonomia, Ferraris Jr. (2007) publicou um novo trabalho e manteve sua concepção, considerando mais uma vez “*Parauchenipterus*” equivalente a *Trachelyopterus*. Outros estudos envolvendo os gêneros foram realizadas por Buckup et al. (2007), Graça et al. (2007) e Birindelli (2014), que reapresentam ambos os gêneros como válidos, concordando com a classificação proposta por Akama (2004). Porém, em um trabalho analisando a morfologia e dados moleculares, os gêneros foram considerados sinônimos (Calegari, 2019). Contudo, o bancos de dados Eschmeyer's Catalog of Fishes (Fricke et al., 2023) continua por adotar em sua base de dados “*Parauchenipterus*” como sinônimo de *Trachelyopterus*. Tais divergências na última década demonstram que incertezas taxonômicas ainda estão presentes no grupo (Haerter, 2021).

Na atual circunstância, com imprecisões acerca da filogenia de *Trachelyopterus* e “*Parauchenipterus*”, além da identificação de novas espécies com

o uso de ambas as nomenclaturas gerando discordância na literatura. Ao longo da sua proposta de revisão taxonômica, Akama (2004) considerou para estes gêneros 7 espécies, número reduzido comparado a outros autores, sugerindo uma junção baseada na morfologia das espécies atualmente válidas para o gênero *Trachelyopterus*. Contrastando com os bancos de dados atuais, 16 espécies são validadas em *Trachelyopterus* pelo Eschmeyer's Catalog of Fishes (Fricke et al., 2023), um aumento significativo quando comparado aos descritos por Akama (2004), ainda a última revisão focada nesse grupo de peixes. Os locais da distribuição das espécies estão descritos na Tabela 2.

Muitas espécies atualmente válidas se encontram avulsas em comparação a revisão taxonômica por Akama (2004), tendo como resposta que a diversidade por traz da descrição é possivelmente muito maior. Sendo assim, estudos para compreender o tamanho dessa diversidade são de extrema importância, para trazer conhecimento a divergências do gênero, trazendo mais informações evolutivas e taxonômicas de *Trachelyopterus*.

Tabela 2. Distribuição geográfica das espécies de *Trachelyopterus* conforme Eschmeyer's Catalog of Fishes (Fricke et al., 2023).

Espécies de <i>Trachelyopterus</i> (2023)	Distribuição Geográfica	
	Bacias Hidrográficas	País
<i>Trachelyopterus albicrux</i>	Rio La Plata	Argentina e Uruguai
<i>Trachelyopterus amblops</i>	Rio Tuira	Panamá
<i>Trachelyopterus analis</i> *	Lago Arari, Pará	Brasil
<i>Trachelyopterus brevibarbis</i> *	Bacia do Alto Rio Amazonas	Peru
<i>Trachelyopterus ceratophysus</i>	Rios Paraná, Guaporé, Branco e Negro	Brasil, Argentina e Bolívia
<i>Trachelyopterus coriaceus</i>	Rios costeiros, Rio Amazonas	América do Sul, Guianas e Brasil
<i>Trachelyopterus cratensis</i>	Bacia do Rio Granjeiro, Ceará	Brasil
<i>Trachelyopterus fisheri</i>	Bacia do Rio Sucio	Colômbia
<i>Trachelyopterus galeatus</i>	-	América do Sul
<i>Trachelyopterus immaculatus</i> *	-	Suriname
<i>Trachelyopterus insignis</i>	Rio Sinú	Colômbia
<i>Trachelyopterus isacanthus</i>	Amazônia Peruana	Peru
<i>Trachelyopterus lacustris</i>	Bacia do Rio das Velhas e Lagoa Santa	Brasil
<i>Trachelyopterus leopardinus</i>	Bacia do Rio São Francisco	Brasil

<i>Trachelyopterus lucenai</i>	Drenagem do Rio Jucuí	Brasil, Argentina e Uruguai
<i>Trachelyopterus peloichthys</i>	Bacia do Rio Maracaibo	Venezuela e Colômbia
<i>Trachelyopterus porosus</i>	-	Bolívia e Brasil
<i>Trachelyopterus robustus*</i>	-	Guyana
<i>Trachelyopterus striatulus</i>	Rios Costeiros do Sudeste do Brasil até a Bacia do Rio Paraná	Argentina, Brasil, Bolívia, Paraguai e Uruguai
<i>Trachelyopterus teaguei</i>	Bacia do Rio Uruguai	Argentina, Bolívia e Uruguai

Fonte: Dados oriundos de *Eschmeyer's Catalog of Fishes* (Fricke, 2023). Edição do autor. *Species inquirenda in *Trachelyopterus*.

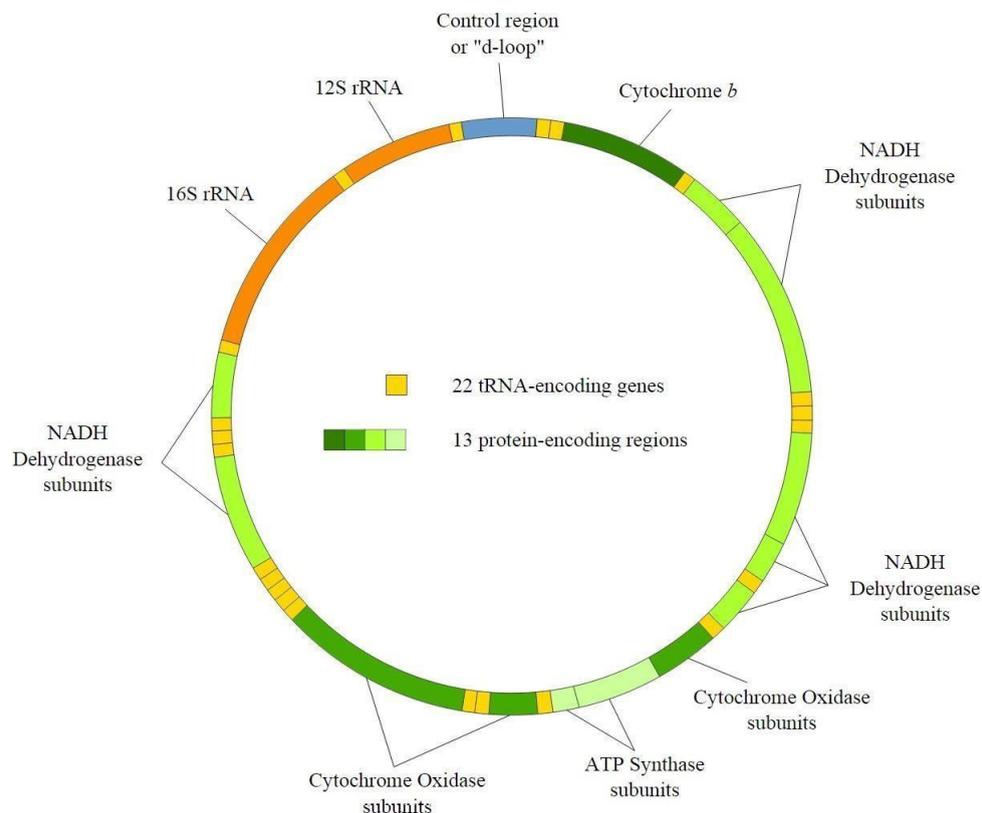
1.5 DNA mitocondrial

As mitocôndrias desempenham um papel fundamental no metabolismo celular, estas organelas tem como função a fosforilação oxidativa, a qual é uma das vias bioquímicas mais importantes na produção de ATP. Acredita-se que esta organela, assim como os cloroplastos, teve sua origem em uma possível relação simbiótica com células eucariontes primitivas, e continuam a desempenhar muitas das funções bioquímicas e fisiológicas de seus antepassados bacterianos (Boore, 1999; Timmis *et al.*, 2004). Contém seu próprio genoma, circular, relativamente pequeno, variando de 15 a 20 Kb de comprimento, sem íntrons, e codificam 37 genes, dos quais 24 estão envolvidos com o mecanismo de expressão gênica do próprio DNA mitocondrial, sendo 22 relacionados a síntese de tRNA, 2 relacionados a síntese de rRNA (12S e 16S), e 13 que codificam polipeptídeos (3 citocromo oxidase c, 7 NADH desidrogenase, citocromo b e ATPase 6 e 8) (Wolstenholme, 1992; Okimoto *et al.*, 1992; Garesse *et al.*, 1997; Ballard & Withlock, 2004). Além disso, contém uma região não codificante chamada *D-loop*, que é responsável pela replicação do mtDNA (Figura 2) (Meyer, 1994; Garesse & Vallejo, 2001).

O DNA mitocondrial é um eficaz marcador molecular para análises intra e inter- específicas, podendo ter múltiplas aplicações, entre elas, em estudos de biogeografia histórica, análises de zonas de hibridação, estimativas do grau de variabilidade genética, caracterização de estrutura populacional, relações filogenéticas, estudos de conservação genética, auxílio na resolução ou na identificação de conflitos taxonômicos (Arias *et al.*, 2003; Miya *et al.*, 2003; Silva, 2004; Hardman, 2005; Hardman & Lundeberg, 2006; Sullivan *et al.*, 2006; Chiachio *et al.*, 2008; Cunha, 2008; Prioliet *al.*, 2010). A elaboração de filogenias moleculares permite também testar hipóteses de relacionamento construídas com base

em outros caracteres, como os morfológicos, o que pode tornar as discussões sobre grupos mais robustas.

Figura 2. Esquema da molécula de DNA mitocondrial de vertebrados



1.6 DNA Barcode e sua importância para estudar a biodiversidade

Métodos apoiados em análise de DNA ganharam grande destaque entre a comunidade científica, devido ao fato de o DNA ser uma molécula relativamente estável, adquirida em qualquer estágio de vida a partir de pequenas amostras do indivíduo, além de ser altamente reprodutível (Ward et al., 2005). Grupos de pesquisa voltaram sua atenção para a utilização de sequências de DNA para explicar as relações filogenéticas entre grupos de organismos (Gaeresse et al., 1997). Com notória diversidade, a busca por assistência tecnológica fez-se fundamental para descrição inicial e reconhecimento subsequente das espécies (Godfray, 2002; Blaxter, 2003). Explorações criaram sistemas de identificação baseados na análise de diversidade através de pequenos segmentos de DNA (Tauttz, 2003).

Na iniciativa de padronizar o marcador empregado para a identificação de

espécies, pesquisadores de uma universidade do Canadá sugeriram a criação de um sistema universal de diagnóstico, embasado em um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases. Hebert et al. (2003) propuseram um sistema de código de barras de DNA, baseado na diversidade de sequências da subunidade 1 do citocromo C oxidase (COI). Gene este que por ter origem mitocondrial, é de fácil amplificação. Além disso, possui ausência de íntrons, herança haploide, exposição limitada para recombinação genética e evolução rápida, o que permite uma alta semelhança intraespecífica e alta divergência interespecífica, caracterizando-o assim como um bom gene de identificação de espécies (May, 2010).

As espécies são representadas por sequências particulares ou por um grupo de sequências muito similares do fragmento gênico COI, o qual é conhecido como o “DNA barcode” que objetiva criar um “código de barras” padronizado, e o acúmulo de mutações entre as sequências barcode de duas espécies quando comparadas forneceria distância genética entre elas para diferenciá-las (Waugh, 2007; Frezal e Leblois, 2008; Baker et al., 2009; Tavares et al., 2011). A ideia segue o código de barras universal de produtos do mercado varejista, que utiliza 10 números alternados em 11 posições para gerar 100 bilhões de identificadores únicos (Hebert et al., 2003). Porém, no caso do DNA barcode há quatro possibilidades de nucleotídeos (adenina, timina, citosina e guanina) combinando-se de forma aleatória, gerando um padrão único de identidade para cada espécie com uma cadeia de sítios maior que 11 disposições (Hebert, 2003).

Uma combinação aleatória de 15 desses nucleotídeos criaria um bilhão de códigos únicos, número maior do que o de espécies de seres vivos conhecidos, que acaba por permitir que cada táxon seja identificado por apresentar uma sequência única de DNA e, conseqüentemente, uma série exclusiva de DNA Barcode (Hebert et al., 2003). Estabelecer essa diversidade na sequência de aminoácidos codificados pelo segmento deste gene mitocondrial foi suficiente para posicionar de forma confiável espécies em categorias taxonômicas mais altas (Hebert, 2003). Diante disso, o código de barras do DNA é um método para identificar espécies com base em uma sequência curta e padronizada de DNA, o que foi avaliado para diversos filos de animais e revelou alta robustez (Hebert et al. 2003). O mesmo ocorreu com vários outros estudos voltados para a ictiofauna Neotropical através do DNA barcode (e.g., Pereira et al., 2011; Rosso et al., 2012; Gomes et al., 2015; Ramirez, Galetti Jr., 2015; Melo et al., 2016; Ramirez et al., 2017; Guimarães et al., 2021; Rodrigues et al., 2023).

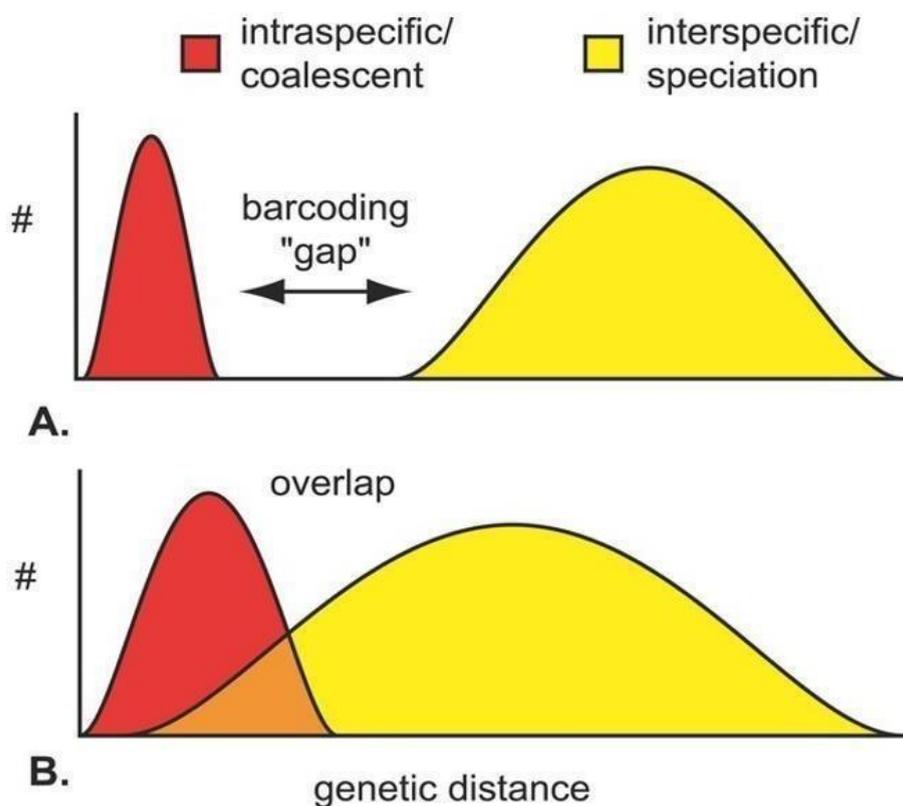
Grande parte dos métodos clássicos de identificação de espécies, como por exemplo os baseados em morfologia, dependem da interferência de taxonomistas muito especializados no determinado grupo do organismo, envolvendo considerável tempo,

além deste método requerer alta qualidade dos espécimes a serem analisados, o que acaba por impedir uma identificação confiável em grande escala e de forma rotineira (Eiziriki, 2009). Pardial et al. (2010) deixa explícito que a taxonomia tradicional, baseada em características morfológicas, não será substituída pelos métodos moleculares, os quais aumentam a credibilidade dos dados gerados, e que assim surge uma nova abordagem para identificação e caracterização de espécies a “taxonomia integrativa”. Quando já elaboradas hipóteses construídas com base nesses caracteres morfológicos, as filogenias moleculares permitem tornar as discussões sobre os grupos mais robustas.

Neste contexto, o uso de ferramentas moleculares tem crescido drasticamente como uma alternativa adicional para a identificação rápida, padronizada e confiável de organismos em nível de espécie. A aplicação de técnicas moleculares para identificação de espécies apresenta alta efetividade, permitindo a realização de análises em larga escala, padronizadas, reprodutíveis, e praticáveis no contexto da rotina de laboratórios técnicos (Eiziriki, 2009).

O principal pressuposto para a efetividade deste método, o DNA barcode, está ligado diretamente com a extensão e a separação entre as variações intra e a interespecífica do gene COI. Quanto maior for a sobreposição entre as variações intra e interespecífica dentro das espécies, o DNA *barcode* se torna menos eficaz. A proposta prega que um espécime desconhecido que difere de uma amostra existente por menos do que um valor limiar de dez vezes represente essa espécie, mas espécimes que diferem das sequências existentes por mais do que esse limiar, contendo um “*gap*” (Figura 2), é reconhecido como um novo táxon e a monofilia recíproca seria o principal fator para a existência deste (Figura 3) (Hebert *et al.*, 2003; Gregory, 2005; Meyer & Paulay, 2005).

Figura 3. Esquema do barcode gap. A distribuição da variação intraespecífica é mostrada em vermelho e da interespecífica em amarelo.



(A) Distribuição discreta e sem sobreposição das variações intra e interespecíficas, apresentando o *barcode gap*. (B) Versão alternativa com significativa sobreposição, não apresentando *gap* (Fonte: Meyer & Paulay, 2005).

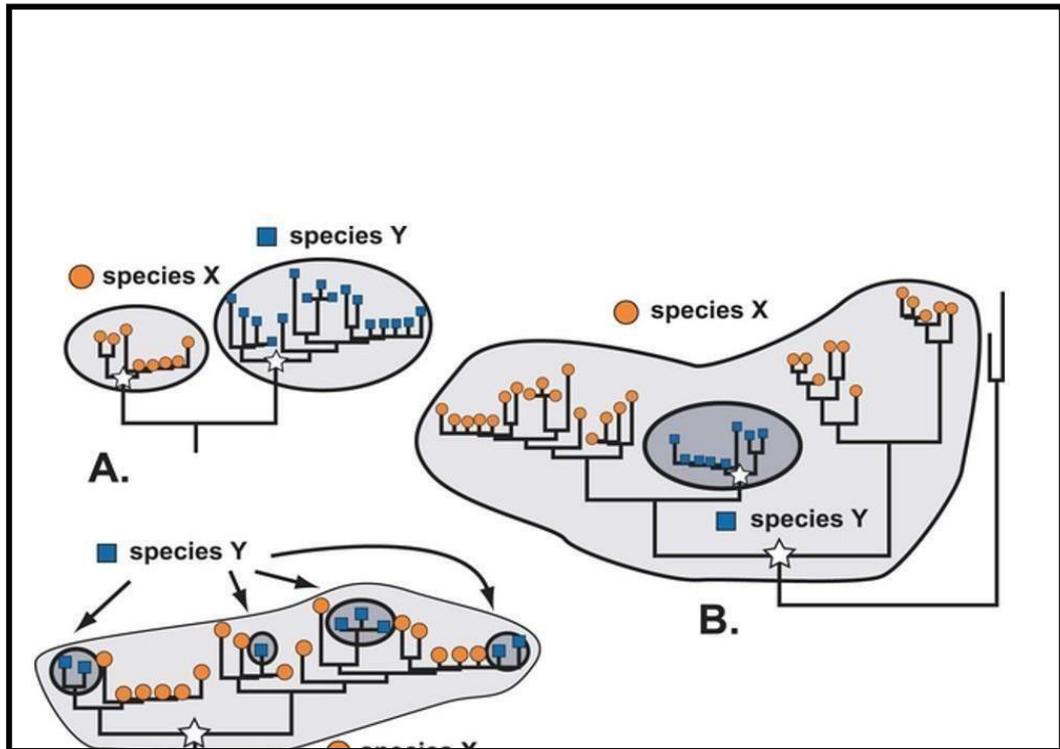


Figura 4. Esquema conceitual das relações Filogenéticas e Terminologia. (A) Monofilia recíproca: membros de cada espécie compartilham um único ancestral comum.

Para cada espécie, a estrela branca representa o coalescente, o ponto em que todos os haplótipos existentes compartilham uma ascendência comum. (B) Parafilia: uma espécie (Y) é monofilética, mas nidifica dentro de outra espécie reconhecida (X). Assim, o coalescente da espécie Y (pequena estrela) está contido dentro da coalescente da espécie X (estrela grande). (C) Polifilia. Nenhuma das duas espécies (X e Y) são monofiléticas, e ambas coalescem à estrela branca (Fonte: Meyer & Paulay, 2005).

A monofilia recíproca está diretamente ligada a diversidade intraespecífica e a estruturação populacional (Figura 3). A diversidade intraespecífica é inversamente proporcional ao tamanho do *barcode gap*. A estruturação populacional também pode afetar de maneira importante o *barcode gap* a medida que esta afeta a diversidade intraespecífica. Por isso, o papel da amostragem para efetividade do *DNA Barcode* é de grande importância (Meyer & Paulay, 2005). Segundo Ortiz (2010), tanto o número amostral quanto o número de localidades de coleta podem interferir nos resultados já que uma pequena amostragem pode subestimar as divergências intraespecíficas e superestimar as divergências interespecíficas, podendo facilitar a existência do *gap*.

Outra consideração essencial para a apresentação do *barcode gap* é o tamanho efetivo populacional (N_e). O N_e tem influência direta no tempo de divergência para

que a especiação ocorra entre as populações (Palumbi et al., 2001). Desta maneira, quanto maior o N_e , maior o tempo para que populações se diferenciem, ou seja, populações maiores demoram mais para apresentar a monofilia recíproca, conseqüentemente levam mais tempo para apresentar o gap característico da monofilia recíproca (Ortiz, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a diversidade genética do gênero *Trachelyopterus*.

2.2 Objetivos específicos

- (1) Aumentar a quantidade de sequências COI disponíveis nos bancos de sequências para DNA barcode de *Trachelyopterus*;
- (2) Confirmar através do DNA Barcode espécies morfologicamente válidas deste gênero;
- (3) Diagnosticar grupos de *Trachelyopterus* que possam apresentar diversidade críptica.

3 Material e Métodos

3.1 Locais de coleta e amostragem

Amostragem e depósito das amostras

A amostragem foi construída a partir de duas abordagens: (1) sequências disponíveis no banco de dados online Barcode of Life Data System v4 (BOLD), (disponível em <http://www.boldsystems.org/>, último acesso: junho de 2023); (2) novas sequências que em breve serão depositadas. Foram encontrados no BOLD 164 registros relativos ao gênero de *Trachelyopterus* provenientes de depósitos de 17 instituições, a busca por “*Parauchenipterus*” não foi encontrada. Destas sequências públicas, 75 relativas à espécie nominal *T. galeatus*; 1 de *Trachelyopterus* cf. *galeatus*; 6 de *Trachelyopterus* aff. *galeatus*; 26 de *T. insignis*; 7

de *Trachelyopterus* sp.; 2 de *T. amblops*; 1 de *T. albicrux*; 1 de *T. lucenai*; 27 de *T. striatulus* (entretanto nesta espécie em dois registros o arquivo da sequência não estava disponível para download); 6 de *T. porosus*; 6 de *T. coriaceus*; e 6 de *Trachelyopterus* aff. *coriaceus*. As novas amostras totalizaram 206 espécimes: 120 sendo nominalmente identificadas como *T. galeatus*; 53 de *T. porosus*; 15 de *Trachelyopterus* sp.; 6 de *T. striatulus*; 5 de *T. insignis*; 3 de *Trachelyopterus* cf. *galeatus*; 3 de *Trachelyopterus* sp. n.; 1 de *T. coriaceus*. Portanto, inicialmente foram utilizadas 368 sequências. É importante destacar que a identificação das amostras foi realizada por diferentes pesquisadores, sendo que as amostras que possibilitaram gerar as sequências inéditas deste estudo estão depositadas em distintas coleções ou museus, como na Coleção do Laboratório de Ictiologia e Pesca do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Rondônia (UNIR), do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), câmpus de Botucatu, do Laboratório de Ictiologia Neotropical da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus (INPA), do Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina (UEL), e do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP).

Extração, Amplificação, Purificação e Sequenciamento de DNA

O DNA genômico foi extraído das amostras de tecido hepático e muscular, conforme a disponibilidade de cada amostra, utilizando o kit de extração de GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). A amplificação parcial da subunidade I do gene Citocromo Oxidase (COI) foi realizada por PCR com o volume final de 12,5µL composta por água miliQ, Colorless GoTaq® Flexi Buffer (5X), MgCl₂ (25 mM), dNTP (25mM), primers forward FishF1 (5-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3C) e reverse FishR1 (5-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3A) (Ward et al. 2005), GoTaq® G2 Hot Start polymerase (5 un/mL) e 2µL de extração de DNA. A reação de PCR foi composta pelas etapas de pré-desnaturação, desnaturação, anelamento, extensão e extensão final seguindo o protocolo de 2 min a 94°C; 35 ciclos de 30s a 94°C; 40s a 52°C; 1 min a 72°C e 10 min a 72°C, respectivamente. Os produtos das reações de PCR foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose e quantificados em

espectrofotômetro (KASVI, NanoK). Em virtude do protocolo de sequenciamento, os produtos da PCR foram purificados conforme o kit de purificação The Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Subsequente, foram encaminhadas as amostras preparadas ao laboratório de sequenciamento no sentido forward. Para a reação de sequenciamento foi utilizado BigDye™ Terminator v.3.1 para inserir fluorescência, e após a purificação com BigDye XTerminator™. O sequenciamento de DNA foi realizado no equipamento ABI3130.

Edição, alinhamento e análises de sequências

A edição das sequências foi realizada manualmente através do software BioEdit Sequence Alignment (Hall, 1999). As sequências do BOLD foram alinhadas juntamente com as do presente trabalho utilizando-se do software Mega version X 10.0.5 (Kumar et al. 2018) sob o método de Bootstrap com 1000 repetições. Iniciamos com a geração de uma árvore ultramétrica usando Beast 2.6 (Bouckaert, et al. 2014), implementado na Cyber Infrastructure for phylogenetic Research (CIPRES; disponível em: <https://www.phylo.org>, acessado em junho de 2023) (Miller et al. 2010), com um relógio log normal relaxado, com o modelo de birth-death, e uma substituição GTR+I+G, modelo escolhido pelo jModelTest 2 (Darriba et al. 2012), com 350 milhões de gerações MCMC, amostradas a cada 30.000 iterações e um burn-in de 10%. Convergência e tamanho amostral adequado (maior que 200) foram avaliados no Tracer v. 1.7 (Rambaut et al. 2018). Empregamos três métodos de delimitação de espécies para identificação das MOTUs: o modelo generalizado misto Yule coalescente (GMYC) com um único limite (Pons et al. 2006), o processo de árvore Poisson (PTP) e a implementação bayesiana do modelo PTP (bPTP) (Zhang et al. 2013). O modelo GMYC identifica o valor limite na transição de padrões de ramificação que são características do processo de especiação (Yule, 1925), versus processo de coalescência (Hudson, 1990) e identifica mudanças significativas nas taxas de ramificação em uma árvore ultramétrica calibrada no tempo. A árvore de Poisson (PTP) e a implementação bayesiana do modelo PTP usam diretamente o número de substituições, em oposição ao método GMYC que usa o tempo. Os diferentes outputs de delimitação foram comparadas usando o pipeline SPdel (<https://github.com/jolobito/SPdel>, acessado em junho de 2023) que gera uma delimitação de consenso (Consensus MOTUs) e fornece visualizações de imagem.

Além disso, as distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas, com um modelo de substituição K2p, foram calculados para as MOTUs de consenso usando Spdel.

REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS)

- Akama, A. Sistemática dos gêneros *Parauchenipterus* Bleeker, 1862 e *Trachelyopterus Valenciennes*, 1840 (Siluriformes, Auchenipteridae). Tese de doutorado (não publicada). Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, p. 188-375, 2004.
- Arias, M. C., Francisco, F. O., Silvestre, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. In: G. A. R. Melo & I. Alves-dos-Santos, *Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure*. Editora UNESC, Criciúma, 2003.
- Batista, E.T.; Código de barras de DNA (DNA barcode) de espécies de bagres (Ordem Siluriformes) de valor comercial da Amazônia brasileira. Dissertação (Mestrado) Biotecnologia e Recursos Naturais. Universidade do Estado do Amazonas. Manaus. p. 52, 2017.
- Baumgartner, G., et al. Peixes do baixo rio Iguaçu. Siluriformes. Maringá:EDUEM, p. 138, 2012.
- Bickford, D.; Lohman, D.J.; Sodhi, N.S.; NG, P.K.L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K.K.; Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 22, n. 3, p. 148-155, 2006.
- Birindelli, J. L. O.; Phylogenetic relationships of the South American Doradoidea (Ostariophysi: Siluriformes). *Neotropic Ichthyol.* 2014;
- Buckup, P. A.; Menezes, N. A.; Ghazzi, M. S. *Catálogo das Espécies de Peixes de Água doce do Brasil*. Museu Nacional Universidade Federal do Rio de Janeiro. Série Livros 23. Rio de Janeiro, 2007, 116p.
- Britto M.R.; 2002. Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysi). Unpublished D.Phil. Thesis, Universidade de São Paulo.
- Blaxter, M.; Counting angels with DNA: subtítulo do artigo. *Nature*, Londres, v.421, n. 6919, p. 122-123, 2003.
- Calegari B. B., Vari R. P., Reis R. E.; Phylogenetic systematics of the driftwood catfishes (Siluriformes: Auchenipteridae): a combined morphological and molecular analysis. *Zool J Linn Soc.* 2019;
- Chiachio, M. C.; Montoya-Burgos, J. I.; Oliveira, C.; Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49, 606–617, 2008.

Cunha, J. M. F. L. Biodiversidade e Sistemática Molecular de Phreatobiidae (Ostariophysi, Siluriformes) – com uma Proposta Sobre sua Posição Filogenética em Siluriformes e uma Discussão Sobre a Evolução do Hábito Subterrâneo. Tese de doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, 2008.

Eschmeyer, W. N., R. Fricke & Laan, R. Van der.; 2017. Catalog of fishes: genera, species, references. San Francisco (CA): California, California Academy of Sciences.

Ferraris, C. Jr.; Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. Zootaxa 1418, 1-628, 2007.

Ferreira, E. J.; Zuanon, J. A.; Santos, G. M.; Peixes Comerciais de Manaus: região de Santarém, Pará. IBAMA. Coleção Meio Ambiente. Série Estudos Pesca, p. 15, 1998.

Fink S.V.; Fink W.L.; 1981. Interrelationships of the ostariophysian fishes (Teleostei). Zoological Journal of the Linnean Society 72: 297–353.

Fricke, R.; Eschmeyer, W. N.; Fong, J. D.; 2019. Species of fishes by family/subfamily. On-line version. Available at: <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>

Fricke, R.; Eschmeyer, W.N.; & Laan, R. V. D., (ed) 2023. ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES: GENERA, SPECIES.

Available: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.

Gois, G. B.; Utilização da técnica de DNA Barcode para a identificação de espécies de peixes de água doce comercializados nas regiões de Belo Horizonte e Muriaé.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Genética e Melhoramento Animal. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. p. 57. 2016.

Gonçalves, P. F. M.; O potencial do DNA barcode na identificação de espécies de aves neotropicais. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. p.71.2009.

Graça, W. J.; Pavanelli, C. S. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. Maringá: EDUEM, 308 p, 2007.

Haerter, C.A.G. Investigação da distribuição de elementos repetitivos no genoma de espécies de *Trachelyopterus* (Valenciennes, 1840). Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais) - Centro de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Cascavel, p. 126. 2021.

- Hardman, M.; Lundberg, J. G. Molecular phylogeny and chronology of diversification for “phractocephaline” catfishes (Siluriformes, Pimelodidae) based on mitochondrial DNA and nuclear recombination activating gene 2 sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40, 410-418, 2006.
- Hay, J.M.; Sarre, S.D.; Lamber, D.M.; Allendorf, F.W.; Daugherty, C.H.; Genetic diversity and taxonomy: a reassessment of species designation in tuatara (*Sphenodon*: Reptilia). *Conservation Genetics*, Netherlands, v. 11, n. 3, p. 1063- 1081, 2009.
- Hebert, P. D. N.; Cywinska, A.; Ball, S.L.; Dewaard, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.*, v. 270, p. 313–321. 2003a.
- Hebert, P. D. N.; Ratnasingham, S.; Dewaard, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R.Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.*, v. 270, p. 96-99, 2003b.
- Helfman, G.; Collette, B. B.; Facey, D. E.; Bowen, B. W.; *The Diversity of Fishes: Biology, Evolution, and Ecology*. 2. ed. Hong Kong: Wiley-Blackwell, 2009. p. 1-736.
- Lui R.L.; Blanco D.R.; Margarido V.P.; Moreira-Filho O.; Chromosome characterization and biogeographic relations among three populations of the driftwood catfish *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Auchenipteridae) in Brazil. *Biol J of the Linn Soc.* 2010; 99: 648-656. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01389.x>.
- Lowe-McConnell, R. H. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. São Paulo: EDUSP, p. 534, 1999.
- May, R. Tropical arthropod species, more or less? *Science*, v.329, p.41-42, 2010
- Mees, G. F. *The Auchenipteridae and Pimelodidae of Suriname (Pisces, Nematognathi)*. *Zoologische Verh.* 33 figs. Leiden 132, p. 1-256, 1974.
- Miya, M.; Takeshima, H.; Endo H.; Ishiguro, N. B. Inoue, J. G.; Mukai, T.; Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26, 121–138, 2003.
- Nelson, J.S.; *Fishes of the World*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006. P. 1-601.
- Nelson, J.S.; Grande T.R.; Wilson M.V.H.; *2016 Fishes of the World*. John Wiley e Sons, New Jersey, 5 ed. p. 707.

Padial, J.M.; Miralles, A.; De La Riva, I.; Vences, M.; The integrative future of taxonomy. *Fron. Zoo.*, v. 7, n. 16, 2010.

Silva, C. B. M.; Filogenia molecular e filogeografia do gênero *Salminus* (Characiformes) - São Carlos : UFSCar, 2016. 161 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, 2016.

Silva, P. B. Taxonomia e Filogenia do Gênero Neotropical *Synoestropsis* Ulmer, 1905 (Trichoptera: Hydropsychidae). Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, AM, 2014.

Sousa L.M.; 2010. Revisão taxonômica e filogenia de *Astrodoradinae* (Siluriformes, Doradidae). Unpublished PhD Dissertation, Universidade de São Paulo.

Sullivan, J. P.; Lundenberg, J. G.; Hardman, M. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei, Siluriformes) using rag 1 and rag 2 nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41: 636-662, 2006.

Ward R.D.; Zemlak T.S.; Innes B.H.; Last P.R.; Hebert P.D.N. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360:1847–1857. 2005.

Wilson, E.; The encyclopedia of life. *Trends in Ecology & Evolution*, Amsterdã, v. 18, n. 2, p. 77-80, 2003.

Wootton, R. J.; *Ecology of Teleost Fishes*. 2 ed. Nova York: Chapman and Hall Ltd, 1990. p.1-403.

CAPITULO 1

O DNA barcode em *Trachelyopterus* (Valenciennes, 1840). Quantas espécies são suportadas neste gênero amplamente distribuído na região Neotropical?

Resumo

Trachelyopterus é um gênero de peixes neotropicais, que ainda carece de adequada compreensão quanto a sua diversidade. Este gênero é atualmente compreendido por 16 espécies válidas e 4 *species inquirendae*. Considerando o potencial da ferramenta do DNABarcode para investigação da biodiversidade, principalmente quanto à delimitação de espécies, este trabalho teve por objetivo aplicar esta metodologia. Foram utilizadas 145 sequências da subunidade 1 do citocromo C oxidase (COI) disponíveis em banco de dados e 206 novas sequências a serem depositadas, totalizando 351 com alinhamento de 523 pb, as quais são provenientes de amostras de quase todas as bacias hidrográficas da região Neotropical. A análise gerou as Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs) através do emprego de três métodos de delimitação de espécies para identificar MOTUs: o modelo generalizado misto Yule coalescente (GMYC), o processo de árvore Poisson (PTP) e a implementação bayesiana do modelo PTP (bPTP). Os distintos outputs de delimitação foram comparados usando o pipeline Spdel, gerando consenso (MOTUs Consensus), o qual indicou 27 MOTUs. A partir dessas análises, é possível afirmar que a diversidade de *Trachelyopterus* encontra-se subestimada e mal compreendida, além disso, podemos afirmar que se faz necessária uma nova revisão do gênero, de preferência se baseando na taxonomia integrativa.

Palavras chave: Auchenipteridae, COI, mtDNA, taxonomia.

Introdução

Os peixes constituem um grupo altamente diversificado, ultrapassando a validação de 36 mil espécies, o equivalente a mais da metade dos vertebrados (Nelson, 2016; Frickie et al. 2023). Destas, mais de 18 mil espécies são correspondentes a peixes de água doce (Frickie et al. 2023). A região Neotropical que compreende do México Central ao Brasil, incluindo a América Central, as ilhas do Caribe e a América do Sul quase em sua totalidade (Murphy e Lugo 1986; Conservancy 2005; Antonelli e Sanmartin, 2011) é conhecida por abrigar uma incrível diversidade de espécies de peixes, com estimativas apontando para mais de 9 mil espécies (Reis et al. 2016), representando um oitavo de toda biodiversidade de vertebrados da região (Vari e Malabarba, 1998). É detentora de sete dos trinta e cinco hotspots de biodiversidade (Williams et al. 2011), o que é produto de eventos geológicos que moldaram as características biogeográficas (Carvalho e Almeida, 2011), juntamente com as condições climáticas favoráveis à vida aquática na região (Albert et al. 2011; Reis et al. 2016). Além disso, o neotrópico apresenta sub-regiões com alto grau de endemismo (Paraná, 2004; Ahmad, 2011; Guergel et al. 2012; Baumgartner et al. 2012). O Brasil é um importante constituinte da região, sendo que em termos de sistemas hidrográficos é a maior rede do planeta, e conseqüentemente, possui uma das maiores riquezas de espécies de peixes de água doce, no entanto, é importante ressaltar que apenas uma parte dessa diversidade é atualmente conhecida (Graça e Pavanelli, 2007). A abundância aquática na região Neotropical, especialmente no território brasileiro, destaca a importância contínua de estudos voltados para a área, visando a preservação e compreensão desse valioso patrimônio natural (Agostinho et al. 2007).

Dentro de um contexto histórico taxonômico conflituoso, encontra-se *Trachelyopterus* (Valenciennes, 1840), o qual já havia sido dividido em dois gêneros promovendo validação de “*Parauchenipterus*” (Mess, 1974; Curran, 1989; Royero, 1999; Akama, 2004), até que a abrangente hipótese filogenética de Calegari et al. (2019) recuperou os dois gêneros como sinônimos, o que já havia sido proposto anteriormente (Ferraris, 1988) (tese de doutorado não publicada). Espécies atualmente alocadas em *Trachelyopterus* já foram consideradas sinônimas de outros gêneros de Auchenipteridae, como por exemplo, *Auchenipterus* (Günther, 1864) e *Trachycorystes* (Eigenmann & Eigenmann, 1888, 1890; Regan, 1911; Britski, 1972). Na tentativa de resolver o status taxonômico de “*Parauchenipterus*”, Akama (2004) (tese de doutorado também não publicada) revisou, vale destacar que pela última vez, as espécies pertencentes aos grupos “*Parauchenipterus*” e *Trachelyopterus* propondo a validade

deles com base em dois caracteres morfológicos externos e internos.

Conforme Akama (2004), *Trachelyopterus* e “*Parauchenipterus*” seriam amplamente distribuídos na América do Sul, ocorrendo nas bacias dos rios Paraná/Paraguai, Amazonas, Orinoco, Guiana, São Francisco e rios costeiros do Brasil, sem registros de ocorrências nas bacias Transandinas. Tais resultados restringiram *Trachelyopterus* em apenas duas espécies, uma delas ainda não descrita: *Trachelyopterus coriaceus* (Valenciennes, 1840) ocorrendo nas bacias do Amazonas, São Francisco e Guiana Francesa, e *Trachelyopterus* sp. n. restrito as bacias dos rios Paraná e Paraguai (Akama, 2004). Cinco espécies seriam alocadas em “*Parauchenipterus*”, apresentando ampla distribuição, ocorrendo por toda América do Sul, estando presentes nas bacias do Paraná-Paraguai, Amazônica, Orinoco, Guianas, São Francisco e Leste do Brasil (Akama, 2004). Outras cinco espécies foram sugeridas por essa mesma tese em um novo gênero, “*Amplexiglanis*”, até hoje não descrito, o que corroboraria com proposta de Royero (1999). Em artigo recente com relevante amostragem e uma hipótese filogenética para Auchenipteridae, Calegari et al. (2019), propôs novos gêneros, porém “*Amplexiglanis*” nem foi citado. Essas 12 espécies estão alocadas em *Trachelyopterus*, o qual atualmente é constituído por 16 espécies válidas e 4 *species inquirenda*, de acordo com o *Eschmeyer’s Catalog of Fishes* (Fricke et al., 2023, Tab. 1).

Uma quantidade significativa de espécies já classificadas pode apresentar problemas em sua taxonomia devido a erros na interpretação dos dados ou à variabilidade críptica, podendo resultar em uma diversidade ainda maior (Hay et al. 2009; Helfman et al. 2009; Perreira et al. 2013; Reis et al. 2016). Estudos direcionados são necessários para melhor compreender a diversidade ictiofaunística, colaborando com a sistemática dos grupos e para a conservação e manejo das espécies (Bickford et al. 2006; Hay et al. 2009; Helfman et al. 2009). Além disso, compreender tanto a organização macroscópica quanto a microscópica permite a formulação de hipóteses filogenéticas mais conclusivas (Bickford et al. 2006). Desse modo, grupos de pesquisa voltam sua atenção para a utilização de sequências de DNA para explicar as relações filogenéticas entre grupos de organismos (Gaerresse et al. 1997; Pereira et al., 2013; Gomes et al., 2015; Ramirez e Galetti, 2015). Métodos apoiados nesta análise ganharam grande destaque entre a comunidade científica (Ward et al. 2005), e a busca por assistência tecnológica fez-se crucial para a descrição e reconhecimento das espécies (Godfray, 2002; Blaxter, 2003).

Na necessidade da padronização do marcador empregado para a identificação de espécies, pesquisadores do Canadá sugeriram a criação de um sistema universal de

diagnóstico utilizando um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases. Hebert et al. (2003) propuseram um sistema de código de barras de DNA baseado na diversidade de sequências da subunidade 1 do citocromo C oxidase (COI). Este gene de origem mitocondrial de fácil amplificação, não possui íntrons, tem herança haploide, exposição limitada para recombinação genética e evolução rápida, o que possibilita a detecção de alta semelhança intraespecífica e alta divergência interespecífica (May, 2010). Diante disso, o código de barras do DNA é um método para identificar espécies com base em uma sequência curta e padronizada de DNA, o que foi avaliado para diversos filos de animais e revelou alta robustez (Hebert et al. 2003). O mesmo ocorreu com vários outros estudos voltados para a ictiofauna Neotropical através do DNA barcode (e.g., Pereira et al., 2011; Rosso et al., 2012; Gomes et al., 2015; Ramirez, Galetti Jr., 2015; Melo et al., 2016; Ramirez et al., 2017; Guimarães et al., 2021; Rodrigues et al., 2023).

Normalmente, o limite de divergência utilizado é de 2% para discriminar espécies de peixes Neotropicais (Pereira et al., 2013). Um período após a proposta de identificação molecular (Hebert et al. 2003) uma multiplicidade de valores de corte de distâncias genéticas para espécies foram testadas, no mesmo tempo em que alguns aplicam um corte de 1% (Ratnasingham et al., 2007), valores de 2% e 3% são mais comuns em estudos de peixes neotropicais (Lara et al., 2010; Pereira et al., 2013). Outros parâmetros compreendem uma ordem de grandeza dez vezes maior que a média da divergência intraespecífica (Hebert et al., 2004) e a lacuna do código de barras (Meyer et al., 2005). É necessário ressaltar duas principais áreas de aplicação do DNA Barcode: o diagnóstico molecular de indivíduos e a descoberta de novas espécies, ambas relacionadas à filogenética e que precisam ser embasadas em taxonomia. Perante pesquisas com um único gene, espera-se identificar indivíduos, ou então indicar inconsistências entre variações moleculares e atuais percepções de limites de espécies, e não em uma batalha para resolver filogenias de grupo (Moritz & Cicero, 2004; Srivathsan & Meier, 2012).

As sequências de nucleotídeos geradas pela técnica de código de barras são frequentemente reunidas com base na similaridade, em unidades taxonômicas operacionais moleculares, as chamadas MOTUs (Powers et al. 2011). Por meio destas unidades, os táxons podem ser apresentados pela identidade da sequência. A identidade pode significar “o mesmo táxon”, ou então que “não há variação suficiente para definir táxons distintos”. Uma MOTU pode ser definida como um agrupamento de sequências que se enquadram na mesma identidade, designado por um valor de corte (Caron et al., 2009). Outra fundamentação chave contida na junção do DNA barcode com as MOTUs é o limite de distância genética usada para defini-las. Distância COI de 1% (Hubert et

al., 2008) a 2% (Pereira et al., 2013) foram atribuídos como limite para a análise de código de barras de DNA de peixe. Entretanto esses valores são relativos a análises entre grupos filogeneticamente diversos, por exemplo, a distinção da ictiofauna de um rio os 2% se mostra um eficiente valor de corte (Pereira et al., 2013). Quando centralizam as análises em um grupo de espécies intimamente próximos, como de um mesmo gênero, a referência dos valores de corte se tornam mais baixos (e.g., Carvalho et al., 2011; Pereira et al., 2011, 2013; Ramirez & Galetti, 2015). Segundo Pereira et al. (2013), o aumento de espécies de um gênero analisadas tornaria possível calibrar a metodologia do DNA barcode para o grupo, o que possibilitaria a descoberta de uma diversidade oculta até então não esperada para aquele grupo.

Tabela 1. Espécies atualmente alocadas em *Trachelyopterus* com informações sobre distribuição geográfica (Fricke et al., 2023), e relação comparando com a última revisão para o gênero. As species inquirendae em *Trachelyopterus* e a incerta *Trachelyopterus isacanthus* não foram incluídas em Calegari et al. (2019).

Espécies de <i>Trachelyopterus</i> (Calegari et al., 2019; Fricke et al., 2023)	Distribuição Geográfica (Fricke et al., 2023)		Relação com a última revisão do grupo (Akama, 2004)
	Bacia Hidrográfica	País	
<i>Trachelyopterus albicrux</i> (Berg, 1901)	Rio La Plata	Argentina e Uruguai	“ <i>Parauchenipterus</i> ” <i>galeatus</i>
<i>Trachelyopterus analis</i> (Eigenmann & Eigenmann, 1888)*	Lago Arari, Pará	Brasil	
<i>Trachelyopterus cratensis</i> (Miranda Ribeiro, 1937)	Bacia do Rio Granjeiro, Ceará	Brasil	
<i>Trachelyopterus immaculatus</i> (Valenciennes, 1840)*	-	Suriname	
<i>Trachelyopterus isacanthus</i> (Cope, 1878)**	Amazônia Peruana	Peru	
<i>Trachelyopterus lacustris</i> (Lutken, 1874)	Bacia do Rio das Velhas e Lagoa Santa	Brasil	
<i>Trachelyopterus leopardinus</i> (Borodin, 1927)	Bacia do Rio São Francisco	Brasil	
<i>Trachelyopterus robustus</i> (Gunther, 1864)*	-	Guiana	
<i>Trachelyopterus galeatus</i> (Linnaeus, 1766)	-	Argentina, Brasil, Equador, Colômbia, Bolívia, Paraguai, Uruguai, Guiana Francesa, Peru, Suriname, e Trinidad e Tobago	*** “ <i>Parauchenipterus</i> ” sp. n.
	*** Bacias dos rios Madeira, Purus e Amazonas	*** Brasil	
<i>Trachelyopterus striatulus</i> (Steindachner, 1877)	Rios Costeiros do Sudeste do Brasil até a Bacia do Rio Paraná	Argentina, Brasil, Bolívia, Paraguai e Uruguai	“ <i>Parauchenipterus</i> ” <i>striatulus</i>
<i>Trachelyopterus porosus</i> (Eigenmann & Eigenmann, 1888)	-	Bolívia, Brasil e Peru	“ <i>Parauchenipterus</i> ” <i>porosus</i>
<i>Trachelyopterus lucenai</i> Bertoletti et al., 1995	Drenagem do Rio Jucuí	Brasil, Argentina e Uruguai	
<i>Trachelyopterus ceratophysus</i> (Kner, 1857)	Rios Paraná, Guaporé, Branco e Negro	Brasil, Argentina e Bolívia	“ <i>Parauchenipterus</i> ” <i>ceratophysus</i>
<i>Trachelyopterus brevibarbis</i> (Cope, 1878)*	Bacia do Alto Rio Amazonas	Peru	
<i>Trachelyopterus coriaceus</i> (Valenciennes, 1840)	Rios costeiros das Guianas e do Brasil, bacias do Rio Amazonas	Brasil, Bolívia e Guiana Francesa	<i>Trachelyopterus coriaceus</i>
	**** Bacias dos rios Paraná e Paraguai	**** Brasil e Paraguai	**** <i>Trachelyopterus</i> sp. n.
<i>Trachelyopterus fisheri</i> (Eigenmann, 1916)	Bacia do Rio Sucio	Colômbia	“ <i>Amplexiglanis</i> ” <i>fisheri</i>
<i>Trachelyopterus amblops</i> (Meek & Hildebrand, 1913)	Rio Tuirá	Panamá	“ <i>Amplexiglanis</i> ” <i>amblops</i>
<i>Trachelyopterus teaguei</i> (Devincenzi, 1942)	Bacia do Rio Uruguai	Argentina, Bolívia e Uruguai	“ <i>Amplexiglanis</i> ” <i>teaguei</i>
<i>Trachelyopterus insignis</i> (Steindachner, 1878)	Baixo Rio Magdalena	Colômbia	“ <i>Amplexiglanis</i> ” <i>insignis</i>
<i>Trachelyopterus peloichthys</i> (Schultz, 1944)	Bacia do Rio Maracaibo	Venezuela e Colômbia	
---	***** Bacia do Caño Ti, Alto rio Negro	***** Colômbia	***** “ <i>Amplexiglanis</i> ” sp. n.

Fonte: Dados oriundos de *Eschmeyer's Catalog of Fishes* (Fricke, 2023) e Akama (2004). **Edição do autor.** (---) Não foi possível estabelecer relação com o *Eschmeyer's Catalog of Fishes*.

*Species inquirendae in *Trachelyopterus*.

**Incerto como *Trachelyopterus isacanthus*.

***“*Parauchenipterus*” sp. é citada por Akama (2004) como uma espécie a ser descrita filogeneticamente próxima a *Trachelyopterus galeatus*.

*****Trachelyopterus* sp. é citada por Akama (2004) como uma espécie a ser descrita filogeneticamente próxima a *Trachelyopterus coriaceus*; este novo táxon a ser descrito teria sua distribuição restrita às drenagens dos rios Paraná e Paraguai.

*****“*Amplexiglanis*” sp. é citada por Akama (2004) como uma espécie a ser descrita deste novo gênero; não há dados na tese sugerindo proximidade filogenética as demais do grupo; sua distribuição geográfica se restringiria apenas a bacia do Caño Ti, Alto rio Negro.

Considerando a história taxonômica relacionada à *Trachelyopterus* e o potencial da ferramenta DNA Barcode para investigação da biodiversidade, principalmente no que se refere à delimitação de espécies, este trabalho teve por objetivo aplicar esta metodologia no máximo possível de amostras desse gênero da região Neotropical. Buscamos avançar o conhecimento sobre a diversidade de *Trachelyopterus* através da diversidade genética relacionando com os mais recentes dados disponíveis baseados em dados morfológicos. Diante deste contexto, se fez necessário buscar por maior amplitude taxonômica e geográfica, o que passou por integrar dados de bancos de sequências e amostras inéditas. Para que tal amplitude taxonômica e geográfica fosse alcançada foi necessário escolher um marcador molecular que tornasse isto possível, portanto, a parte do gene mitocondrial citocromo C oxidase subunidade I comumente utilizado para peixes como DNA barcode.

Material e métodos

Amostragem e depósito das amostras

A amostragem foi construída a partir de duas abordagens: (1) sequências disponíveis no banco de dados online Barcode of Life Data System v4 (BOLD), (disponível em <http://www.boldsystems.org/>, último acesso: junho de 2023); (2) novas sequências que em breve serão depositadas. Foram encontrados no BOLD 164 registros relativos ao gênero de *Trachelyopterus* provenientes de depósitos de 17 instituições. Destas sequências públicas, 75 relativas à espécie nominal *T. galeatus*; 1 de *Trachelyopterus* cf. *galeatus*; 6 de *Trachelyopterus* aff. *galeatus*; 26 de *T. insignis*; 7 de *Trachelyopterus* sp.; 2 de *T. amblops*; 1 de *T. albicrux*; 1 de *T. lucenai*; 27 de *T. striatulus* (entretanto nesta espécie em dois registros o arquivo da sequência não estava disponível para download); 6 de *T. porosus*; 6 de *T. coriaceus*; e 6 de *Trachelyopterus* aff. *coriaceus*. As novas amostras totalizaram 206 espécimes: 120 sendo nominalmente identificadas como *T. galeatus*; 53 de *T. porosus*; 15 de *Trachelyopterus* sp.; 6 de *T. striatulus*; 5 de *T. insignis*; 3 de *Trachelyopterus* cf. *galeatus*; 3 de *Trachelyopterus* sp. n.; 1 de *T. coriaceus*. Portanto, inicialmente foram utilizadas 368 sequências. É importante destacar que a identificação das amostras foi realizada por diferentes pesquisadores, sendo que as amostras que possibilitaram gerar as sequências inéditas deste estudo estão depositadas em distintas coleções ou museus, como na Coleção do Laboratório de Ictiologia e Pesca do Departamento de Biologia da Universidade Federal

de Rondônia (UNIR), do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), câmpus de Botucatu, do Laboratório de Ictiologia Neotropical da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus (INPA), do Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina (UEL), e do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP).

Extração, Amplificação, Purificação e Sequenciamento de DNA

O DNA genômico foi extraído das amostras de tecido hepático e muscular, conforme a disponibilidade de cada amostra, utilizando o kit de extração de GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). A amplificação parcial da subunidade I do gene Citocromo Oxidase (COI) foi realizada por PCR com o volume final de 12,5µL composta por água miliQ, Colorless GoTaq® Flexi Buffer (5X), MgCl₂ (25 mM), dNTP (25mM), primers forward FishF1 (5-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3C) e reverse FishR1 (5-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3A) (Ward et al. 2005), GoTaq® G2 Hot Start polymerase(5 un/mL) e 2µL de extração de DNA. A reação de PCR foi composta pelas etapas de pré-desnaturação, desnaturação, anelamento, extensão e extensão final seguindo o protocolo de 2 min a 94°C; 35 ciclos de 30s a 94°C; 40s a 52°C; 1 min a 72°C e 10 min a 72°C, respectivamente. Os produtos das reações de PCR foram visualizados através da eletroforese em gel de agarose e quantificados em espectrofotômetro (KASVI, NanoK). Em virtude do protocolo de sequenciamento, os produtos da PCR foram purificados conforme o kit de purificação The Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Subsequente, foram encaminhadas as amostras preparadas ao laboratório de sequenciamento no sentido forward. Para a reação de sequenciamento foi utilizado BigDye™ Terminator v.3.1 para inserir fluorescência, e após a purificação com BigDye XTerminator™. O sequenciamento de DNA foi realizado no equipamento ABI3130.

Edição, alinhamento e análises de sequências

A edição das sequências foi realizada manualmente através do software BioEdit Sequence Alignment (Hall, 1999). As sequências do BOLD foram alinhadas juntamente com as do presentetrabalho utilizando-se do software Mega version X 10.0.5 (Kumar et al. 2018) sob o método de Bootstrap com 1000 repetições. Iniciamos com a geração de uma árvore ultramétrica usando Beast 2.6 (Bouckaert, et al. 2014), implementado na Cyber Infrastructure for phylogenetic Research (CIPRES; disponível em:

<https://www.phylo.org>, acessado em junho de 2023) (Miller et al. 2010), com um relógio log normal relaxado, com o modelo de birth-death, e uma substituição GTR+I+G, modelo escolhido pelo jModelTest 2 (Darriba et al. 2012), com 350 milhões de gerações MCMC, amostradas a cada 30.000 iterações e um burn-in de 10%. Convergência e tamanho amostral adequado (maior que 200) foram avaliados no Tracer v. 1.7 (Rambaut et al. 2018). Empregamos três métodos de delimitação de espécies para identificação das MOTUs: o modelo generalizado misto Yule coalescente (GMYC) com um único limite (Pons et al. 2006), o processo de árvore Poisson (PTP) e a implementação bayesiana do modelo PTP (bPTP) (Zhang et al. 2013). O modelo GMYC identifica o valor limite na transição de padrões de ramificação que são características do processo de especiação (Yule, 1925), versus processo de coalescência (Hudson, 1990) e identifica mudanças significativas nas taxas de ramificação em uma árvore ultramétrica calibrada no tempo. A árvore de Poisson (PTP) e a implementação bayesiana do modelo PTP usam diretamente o número de substituições, em oposição ao método GMYC que usa o tempo. Os diferentes outputs de delimitação foram comparadas usando o pipeline SPdel (<https://github.com/jolobito/SPdel>, acessado em junho de 2023) que gera uma delimitação de consenso (Consensus MOTUs) e fornece visualizações de imagem. Além disso, as distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas, com um modelo de substituição K2p, foram calculados para as MOTUs de consenso usando Spdel.

Resultados

O alinhamento contendo 368 sequências, as 162 sequências provenientes do banco de dados online Barcode of Life Data System v4 (BOLD) com as 206 sequências inéditas, apresentou 369 pb. Objetivando obter um alinhamento de no mínimo 500pb, foi necessária a exclusão de 12 sequências (ANGF43090-19; GBMIN126468-17; GBMIN126469-17; GBMIN126470-17; GBMIN97010-17; JEQUI127-12; LARI176-12; MNCE183-17; MNCE184-17; MNCE185-17; MNCE186-17; MNCE187-17) exclusivamente por estarem gerando tal encurtamento no alinhamento. Vale destacar que essas 12 sequências eram nominalmente identificadas como *T. galeatus*. Outras 5 sequências (GBGC4015-08; JEQUI123-12; CIUA699-20; CIUA702-20; MUCU129-14) também foram excluídas devido a ter sido diagnosticado má qualidade das sequências, tanto devido a análise dos eletroferogramas disponíveis quanto pelo alto nível de incongruências com as demais alinhadas. Dessas 145 sequências: 61 são provenientes de amostras nominalmente identificadas como *T. galeatus*, 1 de *Trachelyopterus* cf. *galeatus*, 6 de *Trachelyopterus* aff. *galeatus*, 24 de *T. insignis*, 7 de *Trachelyopterus* sp., 2 de *T. amblops*, 1 de *T. albicrux*, 1 de *T. lucenai*, 24 de *T. striatulus*, 6 de *T. porosus*, 6 de *T. coriaceus*, e 6 de *Trachelyopterus* aff. *coriaceus*. A incorporação das 145 sequências do banco de dados com as 206 deste trabalho formou um alinhamento de 351 sequências COI apresentando 523 pares de bases. O alinhamento das sequências foi composto de A (27.6%), C (25.6%), G (16.5%), T (30.4%). Dos 523 sítios, 358 são monomórficos e 165 polimórficos.

As análises de delimitação de espécies evidenciaram 99 MOTUs para o GMYC, 26 MOTUs para PTP e 27 MOTUs para as análises de bPTP. O SPdel resumiu os resultados anteriores em um consenso com 27 MOTUs (Figs. 1, 2, 3, 4). As distâncias médias intragrupo (MÉDIA), distância máxima intragrupo (MÁX), o vizinho mais próximo (NN) e a distância média entre as MOTUS mais próximas (DTONN) são mostradas na Tabela 2, assim como as bacias hidrográficas e as espécies nominais que inicialmente representam cada MOTU.

Tabela 2. MOTUs identificadas pelo estudo. Máximas (Máx) e médias (Média) de variação intraespecífica. MOTU mais próximo/similar (NN). Distância média entre as MOTUs (DTONN). Bacias hidrográficas relacionadas das amostras que integram a MOTU. Espécies nominais relacionadas às amostras que integram a MOTU.

MOTU	MÉDIA	MÁX	NN	DTONN	BACIAS HIDROGRÁFICAS	ESPÉCIES
MOTU_01	0.000000	0.000000	MOTU_17	19.38895	Bacia do rio Magdalena/Colômbia	<i>T. insignis</i>
MOTU_02	0.114942	0.19157	MOTU_27	6.24291	Bacia do Rio Orinoco/Venezuela	<i>T. galeatus</i>
MOTU_03	NaN	NaN	MOTU_04	2.95361	Alto rio Xingu	<i>Trachelyopterus</i> sp.
MOTU_04	0.255673	0.38388	MOTU_06	2.34877	Rio Mamoré/Rio Madeira/Amazonas Amazonas/Rio Madeira	<i>T. galeatus</i> <i>T. porosus</i>
MOTU_05	NaN	NaN	MOTU_06 MOTU_07	2.74606	Amazonas/Rio Madeira	<i>T. galeatus</i>
MOTU_06	0.000000	0.000000	MOTU_07	1.94956	Rio Macabu	<i>T. striatulus</i>
MOTU_07	0.058250	0.38342	MOTU_06	1.94956	Rio Mucuri Rio Itaúnas Rio Doce	<i>T. striatulus</i>
MOTU_08	0.000000	0.000000	MOTU_10	8.47631	Panamá/Rio Santa Maria	<i>T. amblops</i>
MOTU_09	0.000000	0.000000	MOTU_10	1.75115	Colômbia/Rio Atrato	<i>T. insignis</i>
MOTU_10	0.177175	0.38388	MOTU_09	1.75115	Colômbia/Magdalena	<i>T. insignis</i>
MOTU_11	0.000000	0.000000	MOTU_13	1.75115	Rio Araguaia	<i>T. coriaceus</i>
MOTU_12	0.000000	0.000000	MOTU_13	0.96370	Rio Araguaia	<i>Trachelyopterus</i> aff. <i>galeatus</i> <i>Trachelyopterus</i> sp.
MOTU_13	0.204736	0.38388	MOTU_12	0.96370	Amazonas/Rio Araguaia	<i>Trachelyopterus</i> aff. <i>galeatus</i> <i>T. galeatus</i>
MOTU_14	NaN	NaN	MOTU_15	1.35432	Bacia do rio Purus, afluente da bacia do rio Amazonas	<i>T. galeatus</i>
MOTU_15	NaN	NaN	MOTU_14	1.35432	Bacia do rio Juruá, afluente da bacia do rio Amazonas	<i>Trachelyopterus</i> sp.
MOTU_16	0.255920	0.38388	MOTU_14	3.35459	Bacia do rio Tapajós, afluente da bacia do rio Amazonas	<i>T. galeatus</i>
MOTU_17	NaN	NaN	MOTU_19 MOTU_18	1.94309	Córrego Piraí	<i>Trachelyopterus</i> sp. n.
MOTU_18	0.000000	0.000000	MOTU_19	1.15722	Amazonas/Rio Jari Amazonas/Igarapé do Bispo	<i>T. coriaceus</i> <i>Trachelyopterus</i> sp.
MOTU_19	0.159766	0.57610	MOTU_18	1.15722	Lagoa do Arrombado Rio Paraná/Rio Tietê Rio Paraguai Rio Paraná	<i>Trachelyopterus</i> aff. <i>coriaceus</i> <i>Trachelyopterus</i> sp. n. <i>T. porosus</i> <i>T. galeatus</i>
MOTU_20	NaN	NaN	MOTU_23 MOTU_22 MOTU_21	0.77073	Rio Paraná	<i>T. galeatus</i>

MOTU_21	NaN	NaN	MOTU_20	0.77073	Amazonas/Rio Madeira	<i>Trachelyopterus</i> sp.
MOTU_22	0.142706	0.57693	MOTU_20 MOTU_23	0.77073	Amazonas/Lago Catalão Amazonas/Aquário/Peru Amazonas/Rio Juruá Peru Rio Moá Amazonas/Rio Ucayali/Peru	<i>T. galeatus</i> <i>Trachelyopterus</i> sp.
MOTU_23	0.027864	0.38388	MOTU_20 MOTU_22	0.77073	Amazonas/Lago Catalão Rio Paraguai/Rio Miranda Genbank Rio Paraguai Amazonas/Rio Madeira Amazonas/Rio Purus Amazonas/Rio Jari Amazonas/Rio Manacapuru Lagoa dos Patos/RS	<i>T. porosus</i> <i>T. galeatus</i> <i>Trachelyopterus</i> sp. <i>T. lucenai</i> <i>Trachelyopterus</i>
MOTU_24	0.000000	0.00000	MOTU_27	1.35432	Baía de Todos os Santos/Rio Paraguaçu	<i>T. galeatus</i>
MOTU_25	0.078877	0.57693	MOTU_27	1.35667	Rio São Francisco Paraná/Rio Paraopeba Genbank Lagoa da Prata/Lagoa dos Trapeiros	<i>Trachelyopterus</i> cf. <i>galeatus</i> <i>T. galeatus</i> <i>Trachelyopterus</i> sp. <i>T. striatulus</i>
MOTU_26	0.161669	0.57610	MOTU_27	0.76952	Rio Itapecuru São Francisco Rio Parnaíba	<i>T. porosus</i> <i>T. galeatus</i>
MOTU_27	0.254675	1.16059	MOTU_26	0.76952	Reserva de Itaipu Amazonas/Lago Catalão Rio Paraguai/Rio Miranda Rio Igarapé Genbank Rio Paraná Amazonas/Rio Purus Amazonas/Rio Madeira Amazonas/Rio Guamá Amazonas/Lago Sampaio Rio Paraná/Paranapanema Rio São Francisco Rio Preguiças Rio Jaciparaná Rio Machado Rio Jatuarana Rio Ibicuí	<i>T. galeatus</i> <i>T. striatulus</i> <i>Trachelyopterus</i> sp. "placa larga" <i>T. porosus</i> <i>T. albicrux</i> <i>Trachelyopterus</i> sp.

Fonte: Spdel. Edição do autor.

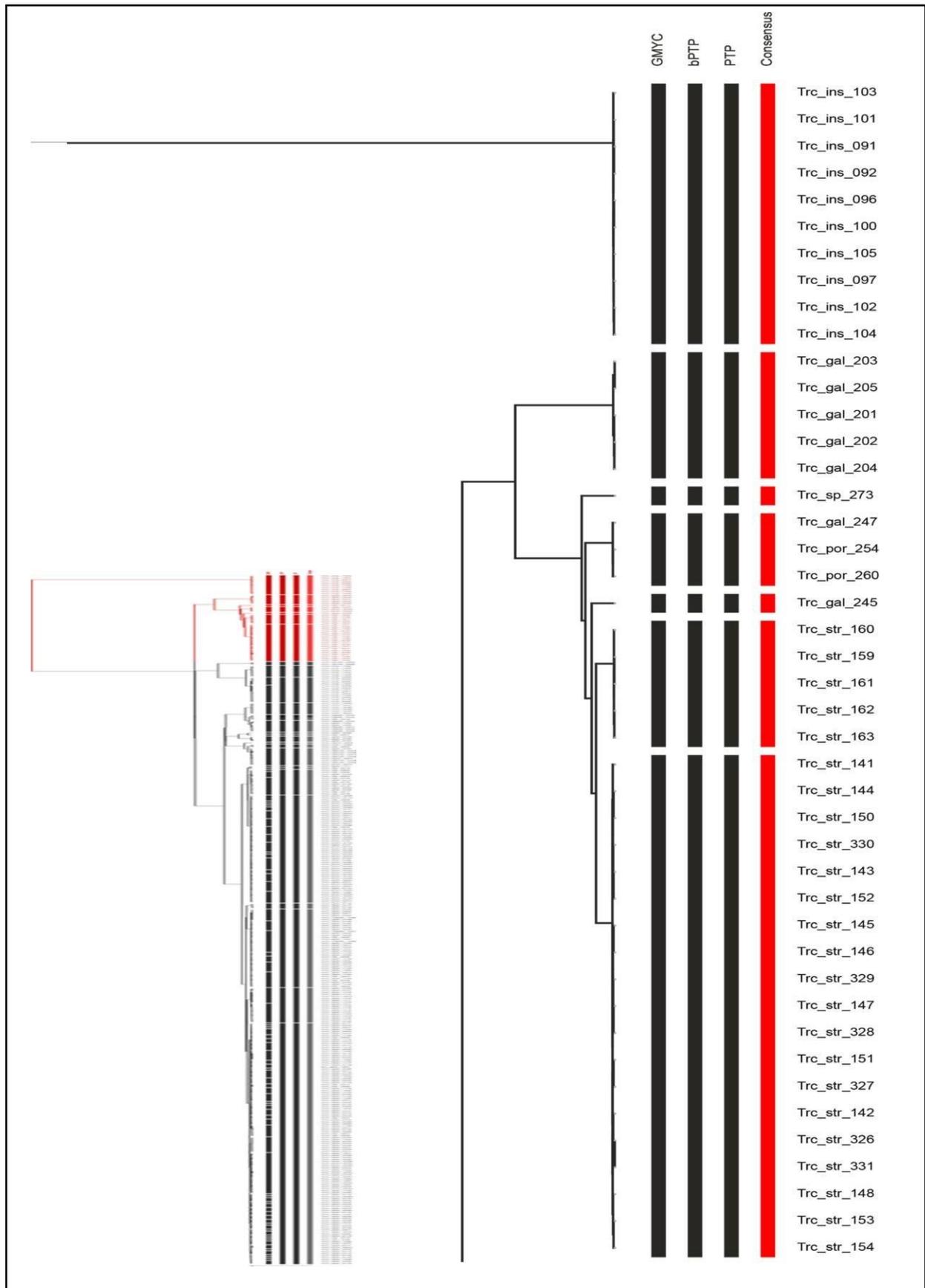


Figura 1. Arvore obtida pelas análises de delimitações de espécies para o gênero *Trachelyopterus*. Enfoque das MOTUs 01 a 07, de cima para baixo.

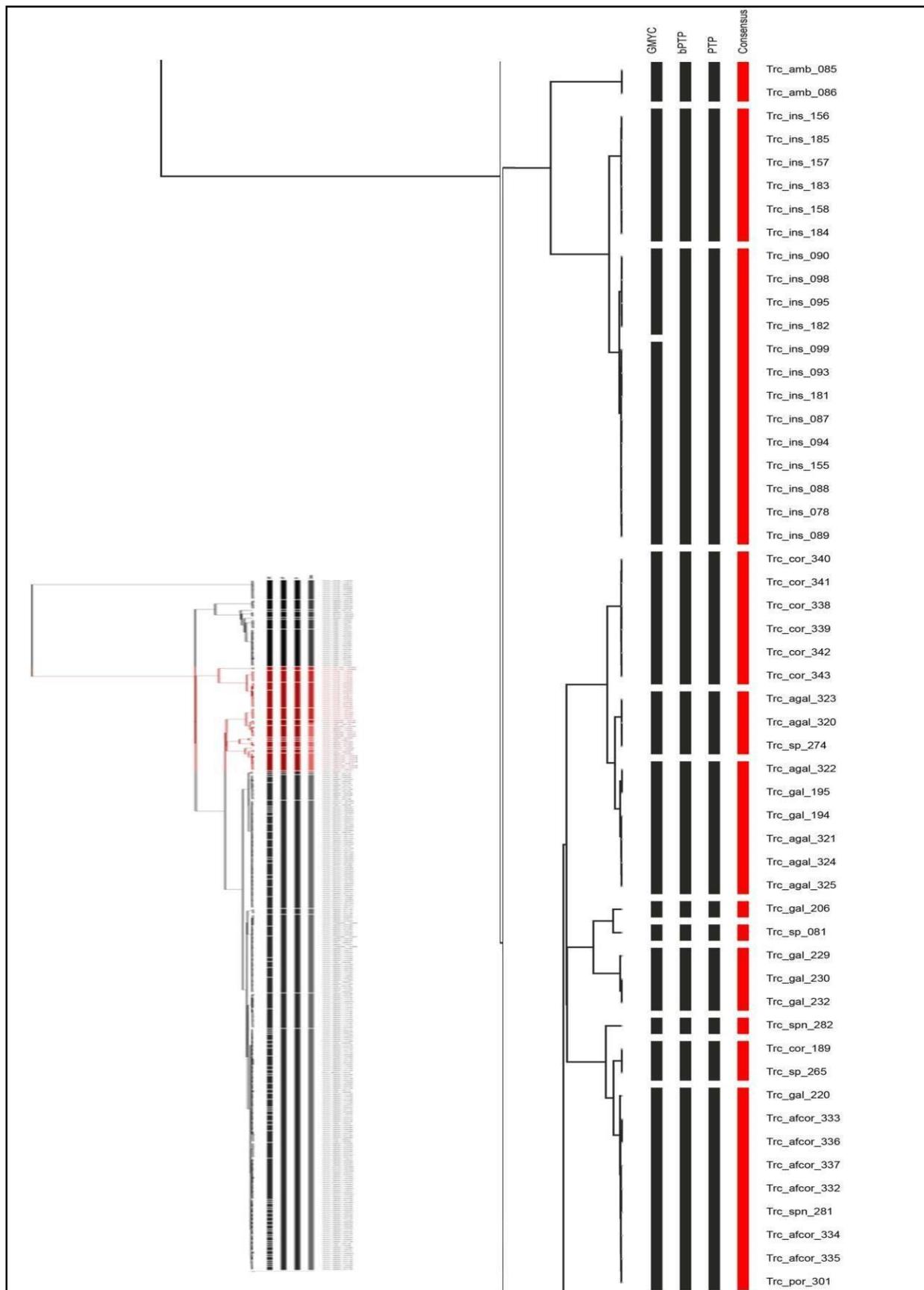


Figura 2. Arvore obtida pelas análises de delimitações de espécies para o gênero *Trachelyopterus*. Enfoque das MOTUs 08 a 19, de cima para baixo.

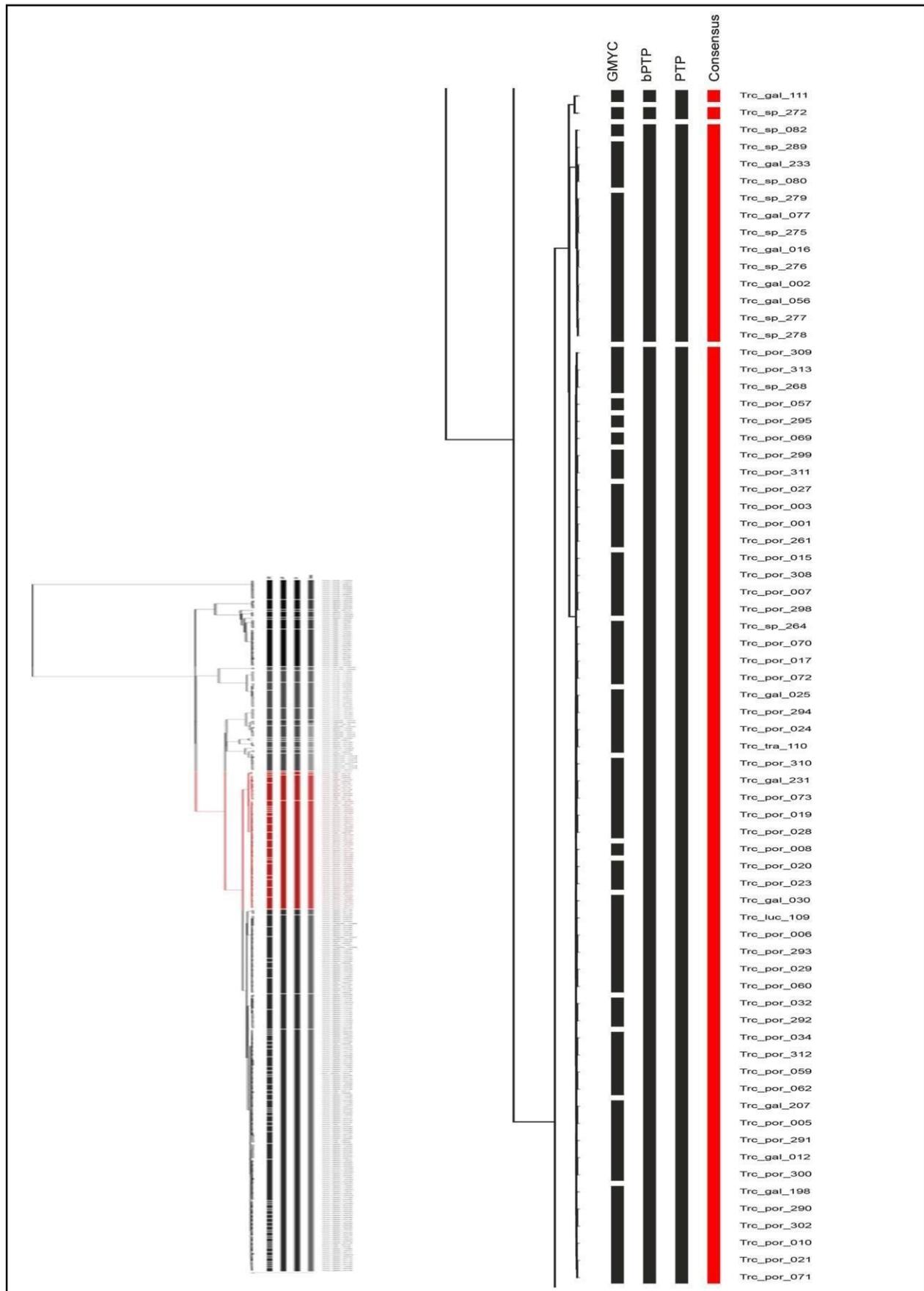


Figura 3. Arvore obtida pelas análises de delimitações de espécies para o gênero *Trachelyopterus*. Enfoque das MOTUs 20 a 23, de cima para baixo.

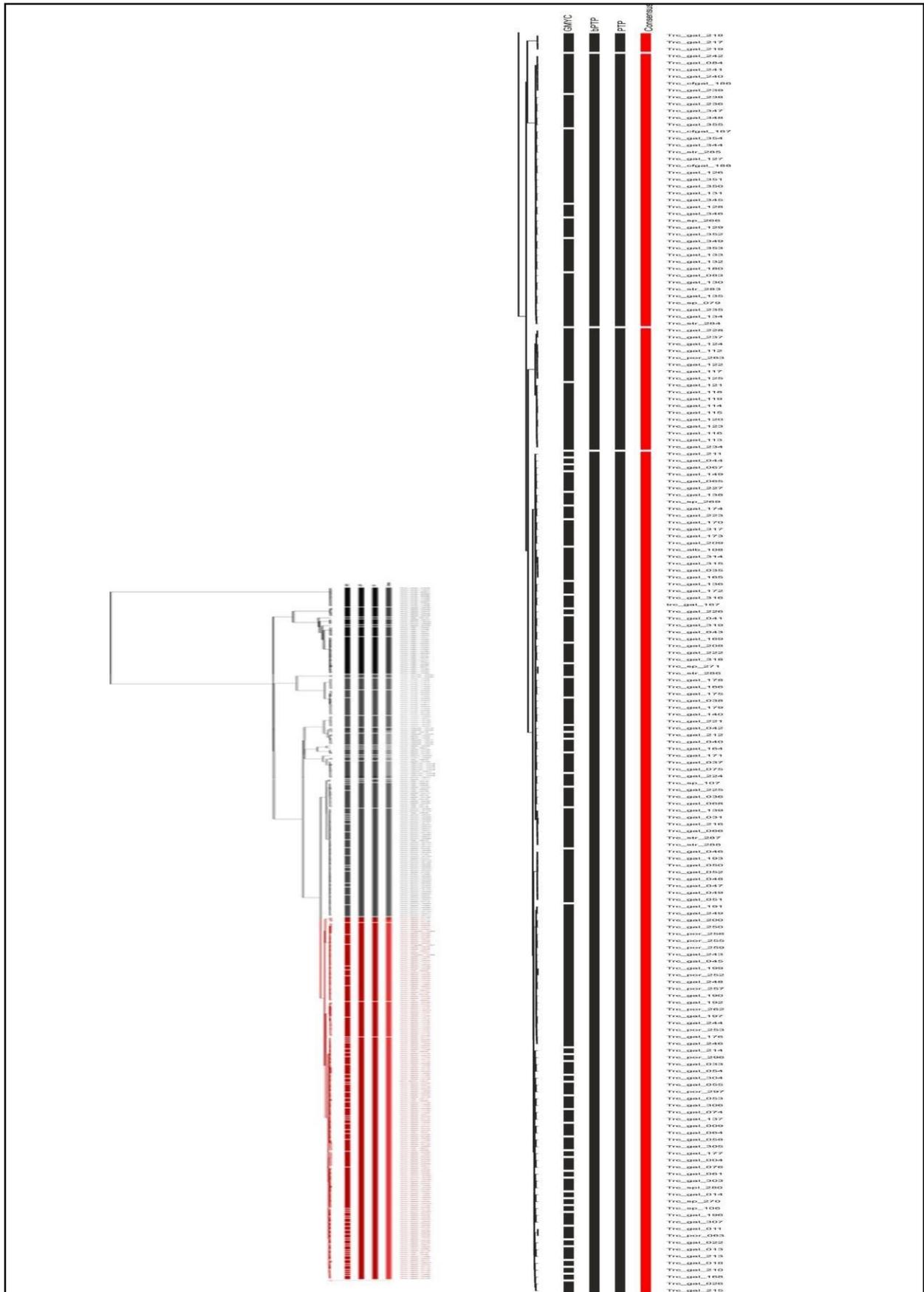


Figura 4. Árvore obtida pelas análises de delimitações de espécies para o gênero *Trachelyopterus*. Enfoque das MOTUs 24 a 27, de cima para baixo.

Discussão

Incongruências entre número de espécies nominais identificadas, número de MOTUs e diversidade atualmente conhecida para *Trachelyopterus*.

As 145 sequências provenientes banco de dados Barcode of Life Data System v4 (BOLD) representam 41% do total utilizado neste trabalho, portanto, 206 novos registros serão em breve disponibilizados em bancos públicos de sequências, representando uma significativa contribuição fruto deste estudo. *Trachelyopterus* é um grupo de peixes neotropicais que apesar de alguns estudos tentando esclarecer sua diversidade (e.g., Lui et al. 2009, Lui et al. 2010, Calegari et al. 2019, Lui et al. 2021, Felicetti et al. 2021) ainda permanece em um desafiante contexto quanto a sua taxonomia. Diante disso e da promissora ferramenta que o DNA Barcode representa principalmente para estudos de delimitação de espécies, é que este estudo se situa, o que pode ser confirmado através da detecção de 27 MOTUs consenso a partir de 351 sequências. Segundo Fricke et al. (2023), *Trachelyopterus* é constituído atualmente por 20 espécies, sendo 16 como válidas e 4 como *species inquirenda* (Tab. 1). Independentemente se 27 MOTUs identificadas representam o mesmo número de espécies ou menos, fica evidente a partir dessa observação inicial dos dados a incongruência no que se refere à diversidade de *Trachelyopterus*. Apesar das amostras que integram este estudo serem provenientes de muitas bacias hidrográficas representando relevante amostragem para a região Neotropical, a amplitude geográfica não abrangeu toda a distribuição do gênero, o que se soma a incongruência citada reforçando o seguinte cenário: a diversidade de *Trachelyopterus* parece estar subestimada, ou no mínimo mal compreendida. Em alguns grupos de peixes a carência de diversidade morfológica causa equívocos na classificação taxonômica e complica a organização sistemática (Keat-Chuan Ng et al., 2017).

As 27 MOTUs foram geradas a partir de amostras nominalmente relacionadas a oito nomes de espécies atualmente válidas (*T. insignis*, *T. galeatus*, *T. porosus*, *T. striatulus*, *T. amblops*, *T. coriaceus*, *T. lucenai* e *T. albicrux*) e outras sete denominações duvidosas (*Trachelyopterus* sp., *Trachelyopterus* aff. *galeatus*, *Trachelyopterus* sp. n., *Trachelyopterus* cf. *galeatus*, *Trachelyopterus* aff. *coriaceus*, *Trachelyopterus* sp. “placa larga”, ou apenas *Trachelyopterus*). Não há congruência entre o número de espécies nominais e o número de MOTUs. Outro aspecto que deve ser destacado é a presença de nomes de espécies constituindo mais do que uma MOTU, como: *T. galeatus* aparece citada em 14 MOTUs, sendo que em uma destas também aparece *Trachelyopterus* cf.

galeatus; *T. porosus* aparece citada em 5 MOTUs; *T. striatulus* aparece citada em 4 MOTUs; *T. insignis* aparece citada em 3 MOTUs; *T. coriaceus* e *Trachelyopterus* aff. *galeatus* aparecem cada uma citadas em 2 MOTUs; além disso, as denominações duvidosas (*Trachelyopterus* sp., *Trachelyopterus* sp. n., *Trachelyopterus* sp. “placa larga”, ou apenas *Trachelyopterus*) aparecem citadas em 10 MOTUs, o que podem ser representadas por amostras identificadas apenas pertencentes ao gênero ou a novas espécies a serem descritas. Cada uma das outras denominações (*Trachelyopterus* aff. *coriaceus*, *T. amblops*, *T. lucenai*, *T. albicrux*) aparecem citadas em apenas 1 MOTU. Diante desse cenário, é provável que uma parte das amostras que integram o estudo esteja identificada erroneamente. Alternativamente, não podemos descartar a possibilidade de que as diagnoses disponíveis para o grupo não sejam adequadas. Mesmo neste contexto, e considerando informações sobre a localidade das amostras e dados provenientes dos cálculos de variação intraMOTU(s) e distâncias entre MOTUs, é possível que algumas relações e interpretações possam ser realizadas, o que se configura como as demais etapas dessa discussão.

MOTUs versus identificação nominal versus distribuição geográfica

A MOTU 01 (Fig. 1) é representada por uma população de dez espécimes identificados como *Trachelyopterus insignis* pertencente ao Rio Magdalena da Colômbia, as quais foram provenientes apenas de banco de sequências. Segundo Fricke et al. (2023), essa espécie está distribuída no Baixo rio Magdalena (Tab. 1). Tal MOTU não apresentou variação intraespecífica, sendo a MOTU que mais se distinguiu das demais do trabalho, o que pode ser representado pela distância de 19,38% para a MOTU 17, a qual é representada por apenas uma sequência pertencente a este trabalho, identificada como *Trachelyopterus* sp. n. do Rio Paraguai. Segundo Akama (2004), *Trachelyopterus* sp. n. se assemelharia a *T. coriaceus*, com ocorrência restrita às drenagens dos rios Paraná e Paraguai. De maneira surpreendente, as amostras de *T. insignis* da MOTU 01 não se agruparam as outras amostras também identificadas como *T. insignis*, as quais ficaram nas MOTUs 09 e 10 (Fig. 2), ambas da Colômbia de uma mistura de sequências provenientes do BOLD e inéditas. A MOTU 09 contém sequências de amostras provenientes do Rio Atrato, com seis indivíduos e variação intraMOTU nula. Segundo Fricke et al. (2023), na bacia do rio Sucio, o qual é afluente do rio Atrato é encontrada a espécie *Trachelyopterus fisheri*, portanto, é provável que tais amostras não correspondam a *T. insignis*, e sim a *T. fisheri*. A MOTU mais próxima

a MOTU 09 foi a MOTU 10, a qual é constituída por treze sequências da bacia do Rio Magdalena, onde duas amostras deste trabalho se uniram a sequências disponíveis no BOLD, apresentando variação intraMOTU média de 0,17% e a máxima de 0,38% (Tab. 2). A distância entre as MOTUs 09 e 10 é de 1,75%, o que claramente mostra barcode gap. Diante disso, nossa análise sugere que amostras provenientes da bacia do rio Magdalena (MOTUs 01 e 10) possam representar mais do que uma espécie, o que a princípio poderia apontar para diversidade críptica. Apesar dessa óbvia interpretação, não podemos deixar de lembrar que há um táxon já válido relacionado a esse grupo de peixes, e que atualmente é sinônimo de *T. insignis*, o qual antes de ser sinonimizado foi citado pela última vez válido como “*Parauchenipterus*” *magdalena*e e que poderia ser encontrado na bacia do rio Magdalena.

No clado onde estão presentes as MOTUs 09 e 10 também está presente a MOTU 08 (Fig. 2), onde estão presentes as únicas duas amostras denominadas como *Trachelyopterus amblops*, originárias do Panamá. Segundo Fricke et al. (2023) e Akama (2004), esta é uma espécie da drenagem do oceano Pacífico, restrita ao rio Tuira, Panamá. Essas amostras não apresentam variação intraMOTU, e a vizinha mais próxima é a MOTU 10 com distância de 8,47% (Tab. 2), que juntas com as MOTUs 01 e 09 correspondem a amostras transandinas. Diante dos dados apresentados, a relação congruente entre identificação nominal e a localidade das amostras da MOTU 08 não deixam dúvida quanto a *T. amblops*, o que também possui suporte através dos dados de DNA Barcode devido ao robusto barcode gap quando a MOTU 08 é comparada a sua vizinha mais próxima.

Entre os clados que apresentam a MOTU 01 e as MOTUs 08, 09 e 10, está localizado um clado contendo as MOTUs 02, 03, 04, 05, 06 e 07 (Fig. 1). Nelas encontramos amostras classificadas como *T. galeatus*, *T. porosus*, *T. striatulus* e *Trachelyopterus* sp. As MOTUs 06 e 07 (Fig. 1) são constituídas por apenas *T. striatulus*. Segundo Fricke et al. (2023), *T. striatulus* é distribuído de rios costeiros do sudeste do Brasil até a bacia do rio Paraná. Segundo Akama (2004), *T. striatulus* seria restrito aos sistemas costeiros do leste do Brasil, sendo o limite sul o rio Paraíba do Sul e o limite norte o rio Paraguaçu, sendo que o material tipo seria proveniente dos rios Doce e Paraíba do Sul. A MOTU 06 é constituída de cinco sequências sem variação intraMOTU provenientes de banco de sequências, amostras provenientes do rio Macabu do estado do Rio de Janeiro. Tais sequências foram também utilizadas pelo estudo de Calegari et al. (2019). A MOTU 07 é integrada por dezenove sequências também de banco de dados, amostras provenientes dos rios Doce, Mucuri e Itaúnas, bacias hidrográficas sendo rios costeiros do leste do Brasil. É provável que as amostras das

MOTUs 06 e 07 em conjunto correspondam a *T. striatulus*. A variação média intra da MOTU 07 foi de 0,05% e a máxima de 0,38%, sendo a MOTU 06 a mais similar à MOTU 07. A distância média entre elas foi de 1,94%, o que considerando a baixa variação intra das duas MOTUs demonstra barcode gap podendo sugerir diversidade críptica em *T. striatulus*. Outras sequências geradas a partir de amostras identificadas como *T. striatulus* integram o estudo, as quais compõem as MOTUs 25 e 27 (Fig. 4). Na MOTU 25 temos três espécimes do rio Paraopeba, bacia do rio São Francisco, e na MOTU27 mais três com localidade do rio Cuiabá, bacia do Rio Paraguai. Considerando que das trinta amostras nominalmente identificadas como *T. striatulus*, vinte e quatro integram as MOTUs 06 e 07 (amostras provenientes de rios costeiros do Leste do Brasil), seis integram as MOTUs 25 e 27 (amostras provenientes das bacias dos rios São Francisco e Paraguai), e a distância/diferença entre as MOTUs 06 e 07 das MOTUs 25 e 27 (ver Fig. 1), é provável que as amostras nominalmente identificadas como *T. striatulus* integrantes das MOTUs 25 e 27 não correspondam a esta espécie.

As MOTUS 02, 03, 04 e 05 (Fig. 1) que se mostraram similares às MOTUs 06 e 07 (Fig. 1), apresentaram distância mínima delas com relação a outras MOTUs (mais próximas) variando de 2,34% a 6,24%, o que considerando os seus baixos valores de variação média e máxima intraMOTU, configuram a existência de barcode gap. As amostras dessas quatro MOTUs são provenientes das seguintes localidades: rio Orinoco, Venezuela (02); Alto rio Xingu (03); bacia do rio Madeira (04 e 05). As identificações nominais das amostras dessas quatro MOTUs são: *T. galeatus* (02), *Trachelyopterus* sp. (03), *T. galeatus* e *T. porosus* (04 e 05). É provável que tais identificações nominais não correspondam a essas MOTUs. Há algum dado histórico que possa apontar qual(is) espécies nominais corresponderiam a pelo menos parte dessas quatro MOTUs? De acordo com Akama (2004), “*Parauchenipterus*” seria dividido em dois grupos, Grupo *striatulus* e Grupo *galeatus*, os quais teriam suporte filogenético, sendo que o primeiro grupo seria composto pelas espécies “*Parauchenipterus*” *striatulus*, “*Parauchenipterus*” *ceratophysus*, e “*Parauchenipterus*” *porosus*. Independente de seus reais status fica evidente por este conjunto de MOTUs (de 02 a 05) (Fig. 1), que a diversidade de *Trachelyopterus* está, no mínimo, subestimada e mal compreendida, além da indicação de bacias hidrográficas que precisam ser mais bem amostradas possibilitando posterior revisão de caracteres diagnósticos para esse grupo de peixes.

As MOTUs 11 a 19 se mostram mais similares entre si do que quando comparadas com as outras 18 diagnosticadas pelo estudo, o que pode ser exemplificado pela formação de um clado (Fig. 2) e os dados de vizinhos mais próximos (Tab. 2). As sequências que integram a MOTU 11 são de seis amostras provenientes da bacia do rio

Araguaia, identificadas como *T. coriaceus*. Segundo Fricke et al. (2023), *T. coriaceus* é distribuído em rios costeiros das Guianas e do Brasil e bacia do rio Amazonas. Segundo Akama (2004), *T. coriaceus* estaria distribuído na bacia Amazônica e na Guiana Francesa. É provável que a MOTU 11 corresponda a *T. coriaceus* devido aos seguintes aspectos: (1) distribuição geográfica dessas amostras; (2) a menor distância para outra MOTU ser de 1,75%, havendo baixa ou nula variação intra das MOTUs mais próximas, portanto havendo barcode gap; (3) haver apenas mais uma sequência identificada como *T. coriaceus* na amostragem do estudo, que pertence a MOTU 18 (distância entre MOTUs 11 e 18 ser de 4,56%), a qual é de amostra proveniente da bacia do rio Jari, afluente do rio Amazonas; (4) haver seis sequências identificadas como *Trachelyopterus* aff. *coriaceus* que integram a MOTU 19 (distância entre MOTUs 11 e 19 ser de 4,17%), as quais são de amostras provenientes da bacia do rio Paraguai.

A MOTU 11 forma um agrupamento/clado com as MOTUs 12 e 13 (Fig. 2) sendo integradas por três e seis sequências, respectivamente, todas da bacia do rio Araguaia, entretanto, identificadas como *T. galeatus*, *Trachelyopterus* sp., e *Trachelyopterus* aff. *galeatus*. Considerando que as amostras da MOTU 11 seriam *T. coriaceus* e a localidade das amostras das MOTUs 12 e 13 são também da bacia do rio Araguaia, todo esse clado poderia ser considerado como *T. coriaceus*? As amostras identificadas como *Trachelyopterus* aff. *galeatus* (6) e as *T. coriaceus* da MOTU 11 são provenientes do estudo de Cerqueira (2017), o qual sugere que tais amostras tratadas como *Trachelyopterus* aff. *galeatus* possam ser consideradas como uma nova espécie a ser descrita de *Trachelyopterus*. Segundo tal autor, tais amostras foram coletadas em simpatria às amostras de *T. coriaceus* da nossa MOTU 11. Dentre essas seis sequências de *Trachelyopterus* aff. *galeatus* provenientes do BOLD (Cerqueira, 2017), duas integram a MOTU 12 e quatro integram a MOTU 13. Se unirmos as sequências das MOTUs 12 e 13 as tratando como um grupo, a variação intragrupo foi de apenas 0,63%. Tais informações possibilitam reforçar a existência dessa nova espécie. Ressaltamos que outras três sequências inéditas (Trc_gal_194, Trc_gal_195, Trc_sp_274) foram identificadas como possivelmente pertencentes a este novo táxon a ser descrito.

As MOTUs 17, 18 e 19 (Fig. 2) são integradas por sequências das amostras já citadas identificadas como *T. coriaceus* e *Trachelyopterus* aff. *coriaceus*, além de *Trachelyopterus* sp., *Trachelyopterus* sp. n., *T. galeatus* e *T. porosus*. Essas amostras são provenientes de alguns locais das bacias dos rios Paraná, Paraguai e Amazonas. A denominação *Trachelyopterus* sp. n. faz referência a revisão de Akama (2004), pois esse autor havia proposto uma nova espécie a ser descrita das bacias dos rios Paraná e

Paraguai, a qual era muito semelhante a *T. coriaceus* com relação aos dados merísticos e morfométricos e ao padrão de colorido. Se unirmos as sequências das MOTUs 17, 18 e 19 as tratando como um grupo, a variação intragrupo foi de apenas 0,75%. É provável que as amostras deste grupo correspondam a apenas uma espécie. Considerando as informações prévias, provavelmente uma espécie muito similar a *T. coriaceus*, que ainda carece de descrição como sugerido por Akama (2004), mas com amplitude geográfica maior do que inicialmente prevista por este autor. Sendo assim, as amostras deste agrupamento identificadas como *T. galeatus* e *T. porosus* estariam apenas identificadas erroneamente.

As MOTUs 14, 15 e 16 (Fig. 2) são integradas por sequências de amostras identificadas como *Trachelyopterus* sp. e *T. galeatus*. Entre estas três, as MOTUs 14 e 15 são mais similares apresentando diferença de 1,35%, e representadas por apenas uma sequência cada, respectivamente, de amostras das bacias dos rios Purus e Juruá, os quais são afluentes do rio Amazonas. Dependendo o valor de corte considerado (1% ou 2%), é possível suspeitar que tais amostras pertençam a distintas espécies, entretanto, a baixa amostragem dificulta tal interpretação. Não há menção especificamente de espécies que tenham sua distribuição em tais bacias hidrográficas (Purus e Juruá) no *Eschmeyer's Catalog of Fishes* (Fricke et al., 2023). No estudo de Akama (2004), foram utilizadas amostras da bacia do rio Purus, sendo que na bacia do rio Purus poderia haver duas espécies, "*Parauchenipterus*" *galeatus*, e a segunda ainda a ser descrita denominada "*Parauchenipterus*" sp. n. As bacias dos rios Purus e Juruá tem suas nascentes na Amazônia Peruana. Diante disso, ressaltamos que rios da Amazônia Peruana poderiam conter as seguintes espécies desse gênero: *Trachelyopterus ceratophysus* (atualmente válida); *Trachelyopterus isacanthus* e *Trachelyopterus brevibarbis* (ambas atualmente como identificações duvidosas); além das espécies com maior distribuição do gênero, *T. galeatus* e *T. porosus* (provavelmente relacionadas a MOTUs a serem discutidas). A MOTU 16, que é representada por três sequências, todas de amostras provenientes da bacia do rio Tapajós, o qual é afluente do rio Amazonas, se mostram mais similares à sequência da MOTU 14, com distância de 3,35%, configurando claramente um barcode gap. Não há menção especificamente de espécies que tenham sua distribuição na bacia do rio Tapajós no *Eschmeyer's Catalog of Fishes* (Fricke et al., 2023). No estudo de Akama (2004), as amostras provenientes desta bacia hidrográfica foram identificadas como "*Parauchenipterus*" *galeatus* e "*Parauchenipterus*" *porosus*. Se tratássemos essas cinco sequências que integram as MOTUs 14, 15 e 16 como um grupo, a variação intragrupo é de 2,37%, portanto, alta e indicando diversidade críptica. Independente, se as MOTUs 14, 15 e 16 correspondem a

duas ou três espécies ou qual sua adequada nomeação, novamente fica evidente que a diversidade de *Trachelyopterus* está, no mínimo, subestimada e mal compreendida, além da indicação de bacias hidrográficas que precisam ser mais bem amostradas.

Há outras amostras integrando este estudo provenientes das bacias dos rios Juruá (na MOTU 22) e Purus (nas MOTUs 23 e 27) (Fig. 4). Historicamente, na maioria dos estudos que envolvem amostras de *Trachelyopterus*, independente da metodologia utilizada ou do foco do estudo, há duas espécies que demonstram a maior amplitude geográfica, *T. galeatus* e *T. porosus*. Considerando que partidas demais MOTUs (de 20 a 27), (Figs. 3 e 4), apresenta ampla distribuição e há representantes dessas MOTUs de locais que representam a localidade-tipo de *T. galeatus* e *T. porosus*, é provável que faça sentido relações entre essas identificações nominais e as MOTUs citadas.

As MOTUs 20, 21, 22 e 23 se mostram mais similares entre si do que quando comparadas com outras 23 diagnosticadas pelo estudo, o que pode ser exemplificado pela formação de um clado (Fig. 3) e os dados de vizinhos mais próximos (Tab. 2). As MOTUs 20 e 21 formam um *subcluster* representadas por apenas uma única sequência em cada MOTU, nomeadas como *Trachelyopterus* sp. e *T. galeatus*, e que se distinguem de suas vizinhas mais próximas por apenas 0,77%. A distância entre elas fica abaixo do valor de corte de 1% e a ausência de mais sequências integrando as MOTUs inviabiliza uma interpretação mais robusta, mesmo que tais sequências tenham sido separadas em mais do que uma MOTU. As MOTUs 22 e 23 formam um *subcluster* com sessenta e oito sequências, treze na MOTU 22 (amostras nomeadas como *Trachelyopterus* sp. e *T. galeatus*) e cinquenta e cinco na MOTU 23 (amostras nomeadas como *Trachelyopterus* sp., *T. galeatus*, *T. lucenai* e *T. porosus*), e que também se distinguem de suas vizinhas mais próximas por apenas 0,77%. As variações intraMOTU média da 22 e 23 ficaram em, respectivamente, 0,14% e 0,02%. As distâncias máximas dentro das MOTUs 22 e 23 ficaram em, respectivamente, 0,57% e 0,38%. Apesar da distância entre as MOTUs ter ficado maior do que a máxima distância dentro das MOTUs, o que configura barcode gap, não podemos ignorar este valor como baixo. Se unirmos essas setenta sequências que integram as MOTUs 20, 21, 22 e 23 como um grupo, a variação intragrupo é de apenas 0,39%, portanto, o que reforça serem relacionadas a apenas uma espécie. Dessas setenta sequências, quarenta e cinco amostras foram denominadas como *T. porosus* e uma como *T. lucenai*, é provável que este conjunto de MOTUs (de 20 a 23) se refira a *T. porosus*.

Segundo Akama (2004), *T. lucenai* seria sinônimo de *T. porosus*. Nossos dados através do DNA barcode reforçam tal interpretação. Segundo Fricke et al. (2023), *T. lucenai* seria distribuída pela drenagem do rio Jacuí (Argentina, Brasil e Uruguai). O

holótipo de *T. lucenai* é originário da Ilha das Flores, rio Jacuí, estado do Rio Grande do Sul. A única sequência deste estudo identificada como *T. lucenai* está depositada no Genbank e foi gerada por Calegari et al. (2019). Há outra sequência (Trc_sp_268) integrando a MOTU 23 (Fig. 3), a qual é proveniente do sul da Lagoa dos Patos, sendo importante destacar que o rio Jacuí deságua nesta lagoa.

Como citado anteriormente, a outra espécie deste gênero que era esperado apresentar grande amplitude geográfica (*Trachelyopterus galeatus*) pode provavelmente ser relacionada ao clado formado pelas MOTUs 24, 25, 26 e 27 (Fig. 4), apontamento possível devido a principalmente alguns aspectos: (1) baixa diversidade/alta similaridade apresentada entre elas; (2) amplitude geográfica das amostras relacionadas a tais sequências; (3) uma sequência (Trc_gal_177) que integra a MOTU 27 de amostra proveniente provavelmente da localidade-tipo de *T. galeatus*, a qual foi previamente utilizada no estudo de Calegari et al. (2019). Se unirmos as cento e oitenta e quatro sequências que integram as MOTUs 24, 25, 26 e 27 como um grupo, a variação intragrupo é de apenas 0,84%, reforçando estarem relacionadas a uma mesma espécie, mesmo que tais sequências tenham sido separadas em mais do que uma MOTU.

O vizinho mais próximo das MOTUS 24 e 25 também é a MOTU 27, com valores de 1,35%, entretanto, as distâncias máximas dentro das MOTUs 24 e 25 ficaram, respectivamente, nula e 0,57%. Apesar da distância entre as MOTUs ter ficado maior do que a máxima distância dentro das MOTUs, o que configura barcode gap, não podemos ignorar tais valores como baixo. Obviamente, as três sequências que integram a MOTU 24 devem ser interpretadas com cuidado, pois são de amostras provenientes da bacia do rio Paraguaçu. Não há menção especificamente de espécies que tenham sua distribuição na bacia do rio Paraguaçu no *Eschmeyer's Catalog of Fishes* (Fricke et al., 2023). Segundo Akama (2004), as amostras provenientes desta bacia hidrográfica seriam "*Parauchenipterus*" *striatulus*, com a bacia do rio Paraguaçu como limite norte de sua distribuição. A distância dessas amostras da MOTU 24 com relação as que são provenientes da bacia do rio Doce e que provavelmente se relacionam a *T. striatulus* (MOTUs 06 e 07) sugerem que amostras de *Trachelyopterus* da bacia do rio Paraguaçu devam ser mais bem estudadas.

As únicas sequências de amostras provenientes da bacia do rio São Francisco estão nas MOTUs 25 (onze sequências), 26 (uma sequência) e 27 (uma sequência). Segundo Akama (2004), amostras da bacia do rio São Francisco pertenceriam a "*Parauchenipterus*" *galeatus*. Segundo Fricke et al. (2023), amostras da bacia do rio São Francisco pertenceriam a *T. leopardinus*, a qual é atualmente válida. Se as amostras que possibilitaram gerar essas treze sequências forem congruentes com a diagnose de *T.*

leopardinus, nossos dados através do DNA Barcode não sustentariam esta espécie como válida. Alternativamente, não podemos descartar a possibilidade de que tais amostras não possuam caracteres para tal diagnóstico, e essas amostras sejam da espécie com maior distribuição do gênero, *T. galeatus*, e que amostra de *T. leopardinus* ainda carecem de investigação. Outra espécie atualmente válida em situação similar a discutida envolvendo *T. leopardinus*, é *T. albicrux*, a qual teria distribuição na bacia do rio Prata (Argentina e Uruguai). Há em nosso estudo uma sequência (Trc_alb_108) com esta identificação e que foi previamente utilizada no estudo de Calegari et al. (2019), a qual integra a MOTU 27. Diante disso, nossos dados também não suportariam tal táxon como válido. Como há somente uma sequência integrando o estudo proveniente de amostras com esta identificação, é obviamente indicado que estudos subsequentes aumentem a amostragem.

A MOTU mais próxima a 27 é a 26 (Fig. 4), a distância entre elas é de apenas 0,76%, sendo que a máxima distância intra da MOTU 27 é de 1,16%, o que não demonstra barcode gap entre elas (Tab. 2). Se unirmos as dezoito sequências encontradas na MOTU 26 (nomeadas como *T. porosus* e *T. galeatus*), com as cento e vinte e três que fazem parte da MOTU 27 (nomeadas como *Trachelyopterus* sp., *Trachelyopterus* sp. placa larga, *T. galeatus*, *T. porosus*, *T. striatulus* e *T. albicrux*), a variação intragrupo é de apenas 0,42%, reforçando a interpretação de ser apenas uma mesma espécie, mesmo que tais sequências tenham sido separadas em mais do que uma MOTU. Portanto, a alta diversidade de identificações nominais relacionadas a tais MOTUs (24, 25, 26 e 27) sugere claramente estarem em parte identificadas erroneamente.

Conclusão

A análise realizada através das MOTUs se mostrou interessante e muito promissora para ser utilizada em conjunto aos dados baseados em morfologia interna e externa para elucidar a real diversidade de *Trachelyopterus*. Segundo Pereira et al. (2013), as sequências de códigos de barras tem potencial para sinalizar casos incongruentes, sendo necessária uma análise precisa, realizada por especialistas em cada grupo com base em uma taxonomia integrativa. Entendemos que este é o real cenário para *Trachelyopterus*, ser necessário expandir este estudo buscando áreas ainda não sem adequada amostragem, sendo que partes desses locais são inclusive apontados por nossos dados, de preferência integrando dados morfológicos.

Referências

- Agostinho, A.A.F.M.; Pelicice, A.C.; Petry, L.C.; Gomes, H.F.J.J. Fish diversity in the upper Paraná river basin: habitats, fisheries, management and conservation. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 10: 174-176, 2007.
- Akama, A. Sistemática dos gêneros *Parauchenipterus* Bleeker, 1862 e *Trachelyopterus Valenciennes*, 1840 (Siluriformes, Auchenipteridae). Tese de doutorado (não publicada). Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil, 2004.
- Albert, J.S.; Reis, R.E. Introduction to Neotropical Freshwaters. In: Albert J.S, Reis R.E., editors. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwaters Fishes*. Califórnia (CA): University of California Press, 21–56, 2011.
- Antonelli, A.; Sanmartin, I. Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon*, 60: 403-414, 2011.
- Bouckaert, R.; Heled, J.; Kühnert, D.; Vaughan, T.; et al. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Comput. Biol.* 10: e1003537, 2014.
- Baumgartner, G.; Paavanelli, C.S.; Baumgartner, D.; Bifi, A.G.; et al. *Peixes do baixo Rio Iguaçu*. Maringá, 2012.
- Blaxter, M.L. The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B*, 359: 669–679, 2004.
- Bickford, D.; Lohman, D.J.; Sodhi, N.S.; Meier, R.; et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22: 148-155, 2006.
- Britski, H.A. Sistemática e evolução dos Auchenipteridae e Ageneiosidae (Teleostei, Siluriformes) [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, 1972.
- Calegari, B.B.; Vari, R.P.; Reis, R.E. Phylogenetic systematics of the driftwood catfishes (Siluriformes: Auchenipteridae): a combined morphological and molecular analysis. *Zool J Linnean Soc*, 187: 661-773, 2019.
- Cardoso, Y.P.; et al. A continental-wide molecular approach unraveling mtDNA diversity and geographic distribution of the Neotropical genus *Hoplias*. *PLoS ONE*, 13, 2018
- Conservancy, T.N. Evaluación ecoregional del Gran Chaco Americano. *Wildlife Conservation Society Bolivia*, Buenos Aires, 24, 2005
- Curran, D.J. Phylogenetic relationships among the Catfish genera of the family Auchenipteridae (Teleostei: Siluroidea). *Copeia* 2, 408-419, 1989.
- Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R.; Posada, D. jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*, 9: 772, 2012.
- Eigenmann, C.H.; Eigenmann, R.S. Preliminary notes on South American Nematognathi. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 1: 119-172, 1888.
- Eigenmann, C.H.; Eigenmann, R.S. A revision of the South American Nematognathi, or catfishes. *Occasional papers of the California Academy of Sciences* 1: 1-508, 1890.

- Felicetti, D.; Haerter, C.A.G.; Baumgärtner, L.; Paiz, L.; et al. A New Variant B Chromosome in Auchenipteridae: The Role of (GATA)_n and (TTAGGG)_n Sequences in Understanding the Evolution of Supernumeraries in Trachelyopterus. *Cytogenet Genome Res*, 161:70-81, 2021.
- Fricke, R.; Eschmeyer, W.N.; Laan, R.V.D. (eds) (2023) *Eschmeyer's Catalog Of Fishes: Genera, Species, References* <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Electronic version accessed: 13 jun. 2023.
- Gaither, M.R.; Schultz, J.K.; Bellwood, D.R.; Pyle, R.L; et al. Evolution of pygmy angelfishes: recent divergences, introgression, and the usefulness of color in taxonomy, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 74: 38-47, 2014.
- Graça, W.J.; Pavanelli, C.S. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. Maringá: EDUEM, 308 p., 2007.
- Godfray, H.C.J. Challenges for taxonomy. *Nature*, 417: 17–19, 2002.
- Gomes, L.C.; Pessali, T.C.; Sales, N.G.; Pompeu, P.S.; et al. Integrative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a neotropical river basin. *Genetica*, 143: 581–588.
- Gurgel, L.L.; Verani, J.R.; Chellappa, S. Reproductive Ecology of *Prochilodus brevis* an Endemic Fish from the Semiarid Region of Brazil. *The Scientific World Journal*: 1-7, 2012
- Günther, A. Catalogue of the fishes in the British Museum. Catalogue of the Physostomi, containing the families Siluridae, Characinidae, Haplochitonidae, Sternoptychidae, Scopelidae, Stomiidae in the collection of the British Museum, Londres, 5: 455, 1864.
- Hay, J.M.; Sarre, S.D.; Lamber, D.M.; Allendorf, F.W.; et al. Genetic diversity and taxonomy: a reassessment of species designation in tuatara (*Sphenodon*: Reptilia). *Conservation Genetics*, Netherlands, 11: 1063- 1081, 2009.
- Hebert, P.D.; Ratnasingham, S.; Waard, J.R. Barcoding animal life: Cytochrome C Oxidase Subunit I divergences among closely related species. *Proceedings Of The Royal Society Of London. Series B: Biological Sciences*. 2003
- Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L.; Waard, J.R. Biological identification through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B*, 270:313–321, 2003.
- Hebert, P.D.N.; Ratnasingham, S.; Waard, J.R.; Barcode animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *The Royal Society*, 270: S96-S99, 2003.
- Hebert P.D.N.; Penton, E.H.; Burns, J.M., Janzen, D.H.; et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrapes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 101:14812–14817, 2004. doi: 10.1073/pnas.0406166101 PMID: 15465915
- Helfman, G.; Collete, B.B.; Facey, D.E.; Bowen, B.W.; *The Diversity of Fishes: Biology, Evolution, and Ecology*. 2. ed. Hong Kong: Wiley-Blackwell, p. 1-736, 2009.

Hudson, R.R. Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford Surv. Evol. Biol.*, 7: 44, 1990.

Keat-Chuang, N.C.; Aun-Chuan, O.P.; Wong, W.L.; Khoo, G. A review of fish taxonomy conventions and species identification techniques. *J Surv Fish Sci.*, 4:54–93, 2017.

Lara, A.; De León, J.L.P.; Rodriguez, R.; Casane, D., et al. DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Mol Ecol Resour* 10:421–430, 2010. Lui, R.L.; Blanco, D.R.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). *Micron*, 40: 552-559, 2009.

Lui, R.L.; Blanco, D.R.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. Chromosome characterization and biogeographic relations among three populations of the driftwood catfish *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) 40 (Siluriformes: Auchenipteridae) in Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99: 648-656, 2010.

Lui, R.L.; Traldi, J.B.; Blanco, D.R.; Margarido, V.P., et al. Possible Common Origin of B Chromosomes in Neotropical Fish (Siluriformes, Auchenipteridae) Reinforced by Repetitive DNA Mapping. *Braz Arch Biol Technol*, 64:e21190494, 2021.

Malabarba, L.R.R.E.; Reis, R.P.; Vari, Z.M.; Lucena, C.A. Lucena (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Edipucrs: 603, 1998.

May, R. Tropical arthropod species, more or less? *Science*, 329:41-42, 2010.

Mees, G.F. The Auchenipteridae and Pimelodidae of Suriname (Pisces, Nematognathi). *11 Zoologische Verh* 132: 1-256, 1974.

Melo, B.F.; Ochoa, L.E.; Vari, P.; Oliveira, C. Cryptic species in the Neotropical fish genus *Curimatopsis* (Teleostei, Characiformes). *Zool Scrip.*, 45:650-58, 2016.

Mendes, F.L.S.; Barthem, R.B. Hábitos alimentares de bagres marinhos (Siluriformes: Ariidae) do estuário amazônico. *Amazônia: Ciência & Desenvolvimento*, 5: 153-166, 2010.

Meyer, C.P.; Paulay, G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biol.*, 3:2229–2238, 2005.

Miller, M.A.; Pfeiffer, W.; Schwartz, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *Proceedings of the 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, IEEE, New Orleans, LA, USA, 14 November 2010.

Moritz, C.; Cicero, C. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *PLoS Biol* 2: e354, 2004.

Murphy, P.G.; Lugo, A.E. Ecology of tropical dry forest. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 17:67-88, 1986.

Nelson, J.S.; Grande, T.C.; Wilson, M.V.H. *Fishes of the world*. New Jersey: John Wiley & Sons: 752, 2016.

Paraná. *Governo Do Estado Do Paraná, Livro Vermelho Da Fauna Ameaçada No Estado Do Paraná*. Curitiba: Governo do Estado do Paraná, 2004.

- Pereira, L.H.G.; Maia, G.M.G.; Hanner, R.; et al. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22:71-79, 2011.
- Pereira, L.H.G.; Hanner, R.; Foresti, F.; Oliveira, C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics*; 14:1-14, 2013.
- Pons, J.; Barraclough, T.; Gómez-Zurita, J.; Cardoso, A.; et al. Sequence Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Syst. Biol.*, 55:595–6, 2006.
- Ratnasingham S.; Hebert, P.D.N. BOLD: The barcode of Life Data System (disponível em: www.barcodinglife.org). *Mol Ecology Notes*, 7:355–364, 2007;.
- Rambaut, A.; Drummond, A.J.; Xie, D.; Baele, G.; et al. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* 67, 901–904, 2018
- Ramirez, J.L.; Galetti, P.M.Jr. DNA barcode and evolutionary relationship within *Laemolyta* Cope 1872 (Characiformes: Anostomidae) through molecular analyses. *Mol. Phylogenet. Evol.* 93, 77–82, 2015.
- Ramirez, J.L.; Birindelli, J.L.; Carvalho, D.C.; Affonso, P.R.A.M. et al. Revealing Hidden Diversity of the Underestimated Neotropical Ichthyofauna: DNA Barcoding in the Recently Described Genus *Megaleporinus* (Characiformes: Anostomidae). *Front. Genet.*, 8:149, 2017
- Reis, R.E.; Albert, J.S.; Di Dario, F.; Mincarone, M.M.; et al. Fish biodiversity and conservation in South America. *J. Fish Biol.* 89:12–47, 2016.
- Rodrigues, J.L.C. Sistemática do gênero *Rhyacoglanis* Shibatta & Vari, 2017 (Siluriformes: Pseudopimelodidae). Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2023.
- Rossini, B.C.; Oliveira, C.A.M.; Melo, F.A.Gd.; et al. Highlighting *Astyanax* Species Diversity through DNA Barcoding. *PLoS ONE*, 11: e0167203, 2016.
- Rosso, J.J.; Mabragaña, E.; Castro, M.G.; Astarloa, G.; Díaz, J.M. DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the pampa plain, argentina: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. *Molecular Ecology Resources*, 12: 999-1011, 2012.
- Royero, R.L. Studies on the systematics and phylogeny of the catfish family Auchenipteridae 2 (Teleostei: Siluriformes). Unpublished D. Thesis. University of Bristol: 377, 1999.
- Srivathsan, A.; Meier, R. On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. *Cladistics*, 28:190-194, 2012.
- Williams, K.; Ford, A.; Rosauer, D.; Silva, N.; et al. Forests of East Australia: The 35th Biodiversity Hotspot. In: Zachos FE & Habel JC (eds.) *Biodiversity hotspots: distribution and protection of conservation priority areas*. Springer, New York. Pp. 295-310, 2011
- Ward, R.D.; Zemplak, T.S.; Bronwyn, I.H.; Last, P.R.; et al. DNA barcoding Australia's fish 14 species, *Proceedings of the Royal Society B. Biological Science*, 360: 1847–1857, 2005.

Yule, G.U. A Mathematical Theory of Evolution, Based on the Conclusions of Dr. J.C. Willis, F.R.S. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B Contain. Pap. Biol. Character*, 213, 21–87, 1925.

Zhang, J.; Kapli, P.; Pavlidis, P.; Stamatakis, A. A general species delimitation method with applicationsto phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29: 2869–2876, 2013.