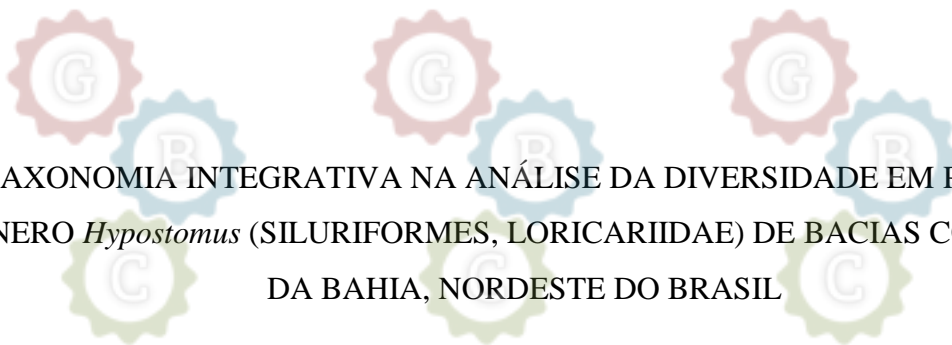




Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO



TAXONOMIA INTEGRATIVA NA ANÁLISE DA DIVERSIDADE EM PEIXES DO
GÊNERO *Hypostomus* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) DE BACIAS COSTEIRAS
DA BAHIA, NORDESTE DO BRASIL

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

MARCIA DA SILVA ANJOS



JEQUIÉ / BA
2016

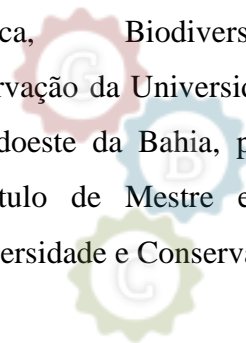
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



MARCIA DA SILVA ANJOS

**TAXONOMIA INTEGRATIVA NA ANÁLISE DA DIVERSIDADE EM PEIXES
DO GÊNERO *Hypostomus* (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) DE BACIAS
COSTEIRAS DA BAHIA, NORDESTE DO BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Genética, Biodiversidade e
Conservação da Universidade Estadual
do Sudoeste da Bahia, para obtenção
do Título de Mestre em Genética,
Biodiversidade e Conservação



Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso

Co-Orientadores: Prof^a Dr^a Luisa Maria Sarmiento Soares

Prof. Dr. Daniel Cardoso de Carvalho

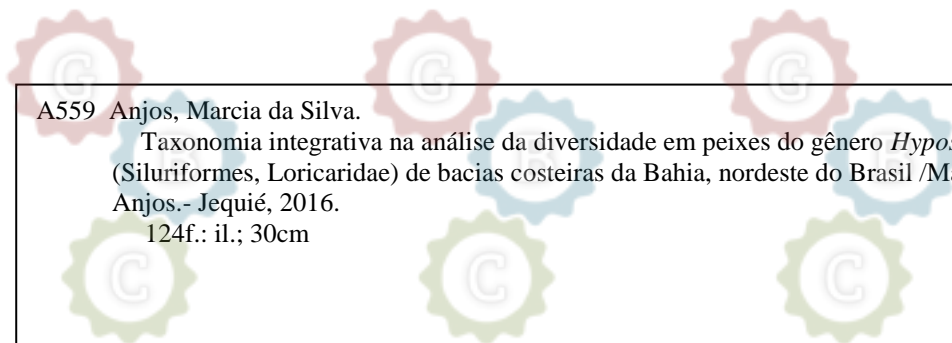


JEQUIÉ/BA

2016



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



A559 Anjos, Marcia da Silva.
Taxonomia integrativa na análise da diversidade em peixes do gênero *Hypostomus* (Siluriformes, Loricaridae) de bacias costeiras da Bahia, nordeste do Brasil / Marcia da Silva Anjos.- Jequié, 2016.
124f.: il.; 30cm

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação da Prof. Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso e co-orientação do Prof^a. Dr^a. Luisa Maria Sarmento Soares; Prof. Dr. Daniel Cardoso de Carvalho)

1. Atlântico Leste 2. Cascudos 3. DNA *barcode* 4. Especiação 5. Sistemática
I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II. Título

CDD – 597.0981

Rafaella Cância Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E

Genética, Biodiversidade e Conservação

CONSERVAÇÃO

Campus Jequié-BA

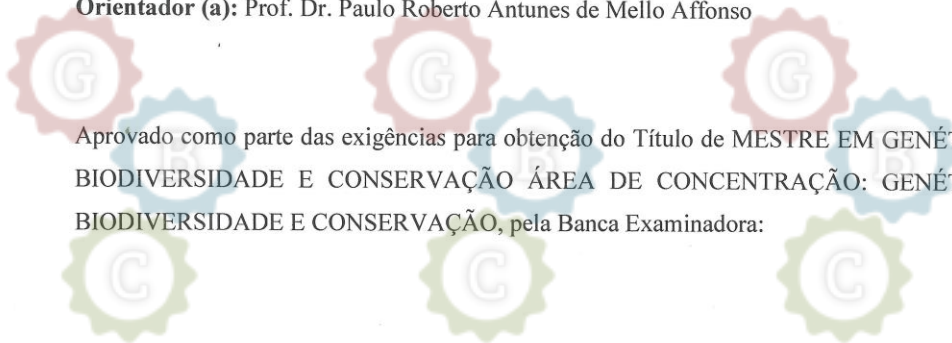
DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: Taxonomia Integrativa na Análise da Diversidade em Peixes do Gênero *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) de Bacias Costeiras da Bahia, Nordeste do Brasil.

Autor (a): Márcia da Silva Anjos

Orientador (a): Prof. Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, pela Banca Examinadora:



Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso

Prof. D. Sc. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso – UESB / Jequié-BA

Lidia Nogueira Silva

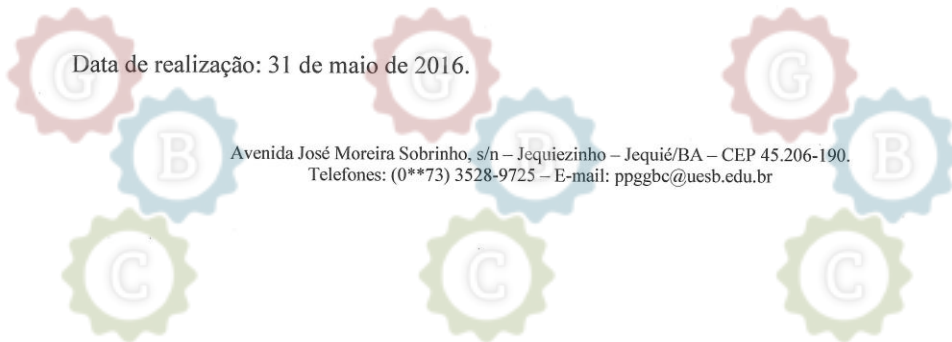
Profa. D. Sc. Lídia Nogueira Silva – IFBA / Valença-BA

Jamille de Araújo Bitencourt

Profa. D. Sc. Jamille de Araújo Bitencourt – UESB / Jequié-BA

Data de realização: 31 de maio de 2016.

Avenida José Moreira Sobrinho, s/n – Jequiezinho – Jequié/BA – CEP 45.206-190.
Telefones: (0**73) 3528-9725 – E-mail: ppggbc@uesb.edu.br



Genética, Biodiversidade e Conservação



AGRADECIMENTOS

Não existem palavras que me permitam expressar o quanto sou grata a todos que estiveram comigo durante a realização desse trabalho. As experiências vividas e compartilhadas durante esse período permitiram tamanho crescimento pessoal e profissional jamais cogitado por mim. Na vida temos que entender que não se vive só.

Assim, tentarei resumidamente expressar minha gratidão a todos pela força que nos une na longa jornada da vida.

Agradeço à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação (PPGGBC), pelo apoio e estrutura concedidos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FASPEB), pela bolsa de mestrado.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), pela licença de coleta concedida, e ao Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UESB) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pela aprovação dos experimentos.

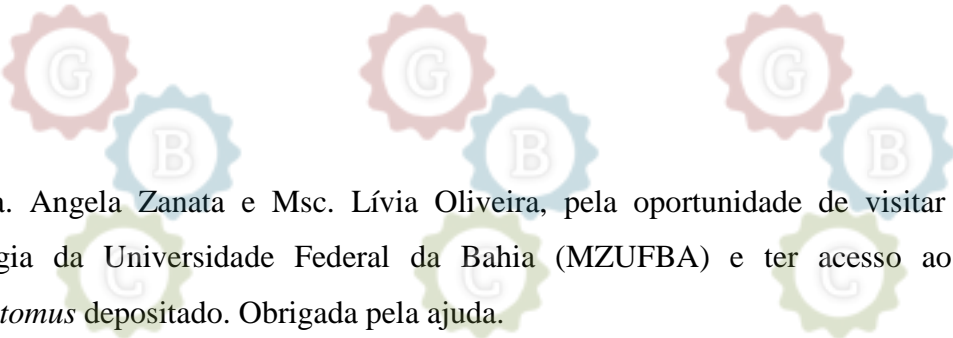
Sou grata ao Prof. Dr. Paulo Affonso, pela oportunidade e confiança concedidas a mim para a realização desse trabalho. Obrigada por ser o meu Orientador e estar sempre me incentivando com palavras e principalmente por ser um exemplo de profissional que busco ser.

Agradeço à Prof. Dra. Luisa Maria Sarmiento-Soares pela co-orientação e por todo o carinho e cuidado que teve comigo ao me receber em sua linda cidade Santa Tereza - ES. Sou grata pelos incentivos, ensinamentos, confiança e enorme contribuição. Agradeço também ao Ronaldo Fernando Martins-Pinheiro pelo carinho e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Daniel Cardoso de Carvalho pela co-orientação, pelos ensinamentos e contribuição. Por ter me recebido no Laboratório de Genética e Conservação da PUC Minas onde pude aprender um pouco mais sobre as análises moleculares.

À Prof. Dra. Jamille Bitencourt que me ensinou praticamente tudo sobre as técnicas moleculares e citogenéticas. Sou grata pela disponibilidade em sanar minhas dúvidas em todos os momentos, por me incentivar e acreditar em meu potencial. Sua determinação me incentiva muito mais.

À Prof. Dra. Lorena Nunes, por ter me ensinado a morfometria geométrica, pela colaboração, disponibilidade e contribuição nas coletas. Foi uma das melhores coletas que fiz!



À Dra. Angela Zanata e Msc. Livia Oliveira, pela oportunidade de visitar o Museu de Zoologia da Universidade Federal da Bahia (MZUFBA) e ter acesso ao material de *Hypostomus* depositado. Obrigada pela ajuda.

À Prof. Dra. Marluce Galvão, pelo incentivo e carinho desde a graduação. Por me ensinar a trabalhar com amor, a buscar sempre me dedicar o máximo possível, pois trabalhar com o que gostamos é se divertir trabalhando.

Agradeço aos colegas e amigos dos laboratórios de Citogenética (Jamille, Silvia, Falcão, Fernando, João, Léo Aragão, Paulinha, Hannah, Érica, Vanderlan, Milena, Marcelle, Taty e Sheila) e Biologia Molecular (Rebeca, Juli, Rúbia, Nathanna, Leidy, Jack, Cássio, Samela, Renatinha), pela convivência, pela ajuda e conhecimento compartilhado.

Agradeço aos meus eternos professores que me incentivaram até aqui.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Genética e Conservação da PUC Minas (Daniel Teixeira, Pamela, Bruno, Laís, Izabela, Lucas, Thaís e Luara) e aos professores Dra. Luciana, Dra. Gisele e Dr. Conrado que me receberam com muito carinho e atenção. Foram dias maravilhosos e divertidos. Sou imensamente grata ao Ricardo e à Barbara pela hospedagem em sua casa. Mais que isso, agradeço por compartilharem comigo a sua família.

A todos que me acompanharam nas coletas (Jamille, Paulo Affonso, Alvrinho, Lorena Nunes, Dani Melo, Rayana Dutra, Ana Beatriz, Hannah, Erica, João, Falcão, Vanderlan, Taty, Aléxia, Sr. Valdemir, Sr. Roque, Paulo Henrique (*in memoriam*) e Lia) meu mais sincero obrigada.

A Luiz Alberto, meu amor, amigo, companheiro de sempre e em todos os momentos. Obrigada por dividir comigo cada instante, seja de angústia ou de comemoração durante todo o mestrado. Obrigada pela companhia em muitas coletas, pela descontração em tantos momentos difíceis.

Agradeço a toda minha família, minha querida mainha Bel e meus irmãos Marcio, Marcela e Rafinha, que sempre estão do meu lado. Obrigada pela compreensão e por me incentivar a buscar conhecer o mundo. Não importa aonde eu vá, vocês serão sempre o meu porto seguro. O cais de onde partirei e para onde voltarei. Meu único reino.





BIOGRAFIA

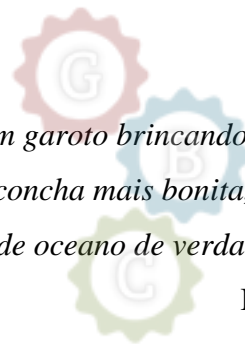
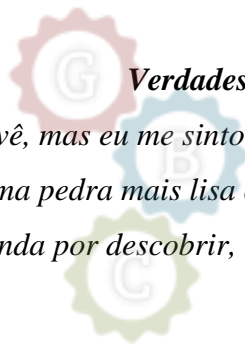
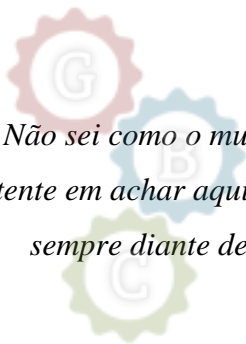
Marcia da Silva Anjos, filha de Maria Isabel Alvina da Silva Anjos e Roque Miguel dos Anjos, nasceu em 16 de novembro de 1986, na cidade de Jequié, Bahia, Brasil. Em 2005, ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* Jequié. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica FADURPE (2006-2007), bolsista voluntária de iniciação científica (2006-2008) e desenvolveu trabalho na área de Zoologia, sob a orientação da Prof. Dra. Marluce Galvão Barretto. Em fevereiro de 2010, concluiu o curso de graduação, com o trabalho de monografia intitulado: “A pesquisa em ensino de biologia no Brasil: um estudo baseado em dissertações e teses defendidas em 2005 e 2006”, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Marcelo Marini Teixeira. Em março de 2014, ingressou no curso de mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Jequié, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso, sendo bolsista FAPESB e desenvolvendo trabalhos na área de Citogenética e Biologia Molecular.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Verdades

Não sei como o mundo me vê, mas eu me sinto como um garoto brincando na praia, contente em achar aqui e ali, uma pedra mais lisa ou uma concha mais bonita, mas tendo sempre diante de mim, ainda por descobrir, "O grande oceano de verdades".

Isaac Newton

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

RESUMO

O gênero *Hypostomus* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) é um grupo de peixes Neotropicais taxonomicamente complexo, com várias espécies crípticas e incertezas taxonômicas. Nas bacias costeiras do Atlântico Leste, espécies novas tem sido descritas ou revalidadas, mas com base em caracteres sutis tais como padrão de coloração, gerando dúvidas sobre a diversidade do grupo na região. Assim, o objetivo desse trabalho foi usar a taxonomia integrativa para inferir a riqueza de espécies de *Hypostomus* nas bacias hidrográficas costeiras da Bahia, reunindo dados morfológicos, morfométricos e genéticos. Oito morfotipos foram identificados como *Hypostomus chrysostiktos*, *H. unae*, *H. jaguar*, *H. brevicauda*, *H. wuchereri*, *Hypostomus* aff. *wuchereri*, *Hypostomus* sp. n. 1 e *Hypostomus* sp. n. 2. Porém, a análise por morfometria geométrica revelou sobreposição entre a maioria dos morfotipos, com exceção de *H. chrysostiktos*, sugerindo um papel significativo do ambiente no formato do corpo e confirmando a plasticidade fenotípica do gênero. O DNA *barcode* a partir da análise de sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase I (COI) revelou distância genética entre os morfotipos de 0 a 7%. A maior divergência genética foi observada entre *H. chrysostiktos* e demais congêneres, colocando-a como um táxon mais relacionado com o gênero *Pterygoplichthys*. Entre os demais morfotipos, *H. unae* apresenta maior distância intraespecífica (2%) e interespecífica (1% a 2%), com indicações de formas crípticas para as bacias do rio Pardo e Recôncavo Sul. Os agrupamentos formados nas árvores de COI e os algoritmos de delimitação de espécies recuperaram três até cinco unidades taxonômicas, revelando que algumas espécies válidas precisam ser reavaliadas. Assim como as demais abordagens, a análise citogenética demonstrou maior diferenciação cromossômica (numérica e estrutural) para *H. chrysostiktos* ($2n=52$). Os demais morfotipos compartilharam o mesmo número diplóide ($2n=76$), porém com variações na fórmula cariotípica, nos pares portadores de DNAr e distribuição da heterocromatina, incluindo um caso exclusivo de RONS múltiplas para *Hypostomus* sp. n. 2. O conjunto desses dados valida com confiabilidade *H. chrysostiktos* e *H. unae*, discriminados por todas as metodologias, e *Hypostomus* sp. n. 2 por dados moleculares e citogenéticos. Ainda, propõe-se que *H. chrysostiktos* seja realocado em *Pterygoplichthys*. Os demais morfotipos parecem constituir sinonímias ou unidades evolutivas com divergência recente (especiação incipiente), apontando *Hypostomus* como um caso de radiação explosiva adaptativa em extensão Neotropical.

Palavras-chave: Atlântico Leste; Cascudos; DNA *barcode*; Especiação; Sistemática.

ABSTRACT

The genus *Hypostomus* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae) is a taxonomically complex Neotropical fish group with several cryptic species and taxonomic uncertainties. In the coastal basins of the eastern Atlantic, new species have been described or revalidated, but based on subtle characters such as color pattern, raising doubts about their actual diversity in this region. The goal of this work was to use the integrative taxonomy to infer the species richness of *Hypostomus* in coastal watersheds of Bahia, by associating morphological, morphometric, and genetic data. Eight morphotypes were identified: *Hypostomus chrysoantiktos*, *H. unae*, *H. jaguar*, *H. brevicauda*, *H. wuchereri*, *Hypostomus* aff. *wuchereri*, *Hypostomus* sp. n. 1 and sp. n. 2. However, the analysis by geometric morphometry revealed overlapped features among most morphotypes, except for *H. chrysoantiktos*, suggesting a significant role of environmental features over body shape, thus confirming the phenotypic plasticity of the genus. The DNA barcode based on the sequence analysis of cytochrome c oxidase I (COI) mitochondrial gene revealed genetic distances between morphotypes from 0 to 7%. The highest genetic divergence was observed between *H. chrysoantiktos* and other congeners, placing it as a closely related taxon to the genus *Pterygoplichthys*. Amongst the other morphotypes, *H. unae* presented higher intraspecific (2%) and interspecific (1% to 2%) distances, with indications of cryptic forms between Recôncavo Sul and Pardo river basins. The clusters obtained in COI trees and algorithms of species delimitation recovered three to five taxonomic units, revealing that some valid species need to be reevaluated. Similarly to the other approaches, cytogenetic analysis showed a higher chromosome differentiation (numerical and structural) for *H. chrysoantiktos* ($2n = 52$). The other samples shared the same diploid number ($2n = 76$), but with variations in karyotype formulae, rDNA bearing pairs and heterochromatin distribution, including a unique case of multiple NORs in *Hypostomus* sp. n. 2. This dataset provided reliable validation of *H. chrysoantiktos* and *H. unae*, being discriminated by all methodologies, and *Hypostomus* sp. n. 2 based on molecular and cytogenetic data. Furthermore, we propose that *H. chrysoantiktos* should be reallocated into *Pterygoplichthys*. The other morphotypes appear to represent synonyms or recently diverged evolutionary units under incipient speciation, placing *Hypostomus* as a case of explosive adaptive radiation in Neotropical level.

Keywords: Armored catfish; DNA barcode; Eastern Atlantic; speciation; systematics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da região Neotropical, evidenciando as bacias hidrográficas brasileiras, com destaque para a região hidrográfica Atlântico Leste e suas bacias componentes.....21

Figura 2. Árvore filogenética com base nas sequências de RAG1 e RAG2 mostrando clados suportados por proporção de *bootstrap* igual ou superior a 50%. Valores de *bootstrap* (acima dos ramos) e de probabilidade *a posteriori* (abaixo dos ramos) referem-se à análise de Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana, respectivamente. Setas pretas indicam sinapomorfias (modificada de Sullivan *et al.*, 2006).....30

Figura 3. Relação entre as tribos da subfamília Hypostominae com base em caracteres morfológicos externos, osteológicos e anatomia do trato digestório por análise de Parcimônia. Números acima dos braços representam número de clados e os números abaixo são índices de decaimento (Armbruster, 2004).....32

Figura 4. Relação filogenética da família Loricariidae com base na análise Bayesiana de dois genes mitocondriais (16S, Cit b) e três loci nuclear (RAG1, RAG2, MyH6). Números em vermelho indicam BI <0,90; números em itálico indicam ML <50. Asteriscos (*) indicam espécies coletadas próximas à localidade-tipo e as cruzes (†) indicam espécies-tipos (Lujan *et al.*, 2015)..... 33

Figura 5. Mapa da Bahia com localização e vista parcial dos pontos de coleta (A-T): A- rio Itapicuru; B- rio Paraguaçu (Iaçu-BA); C- rio Paraguaçu (Itaetê-BA); D- rio Una/bacia do Paraguaçu; E- rio Jequiriçá; F- rio Una/bacia do Recôncavo Sul; G- rio da Serra; H- rio Mutum; I- rio Preto do Costa; J- rio das Pedras; K- rio Preto do Criciúma; L- rio de Contas – Jequié-BA; M- rio Oricó; N- rio Vieira; O- rio Gongogi; P- rio Almada; Q- Rio Cachoeira; R- rio Una/bacia do Leste e S - rio Pardo.....54

Figura 6. Imagens dos espécimes de *Hypostomus* sp. de bacias costeiras da Bahia com identificação dos marcos e semimarcos utilizados para as análises morfométricas. A- vista dorsal, B- vista lateral esquerda e C- vista ventral.....58

Figura 7. Visualização do DNA total extraído de amostras de *Hypostomus* sp. (1 a 9) em gel de agarose 1%, revelando a integridade e alta concentração de DNA pela presença de bandas nítidas. A letra L indica o marcador de peso molecular de 100pb.....60

Figura 8. Gel de agarose a 1% revelando o perfil de amplificação do COI em amostras de *Hypostomus* sp. (1-9) com os primers VF1-t1 1/VR1-t11. A letra L indica o marcador de peso molecular de 100pb.....61

Figura 9. Morfotipos de *Hypostomus* de bacias da Bahia: *H. jaguar* (a); *H. chrysostiktos* (b); *H. unae* (rio da Serra) (c); *H. unae* (rio Pardo) (d); *H. brevicauda* (e); *H. wuchereri* (f); *H. aff. wuchereri* (g); *Hypostomus* sp. n. 1 (h); *Hypostomus* sp. n. 2 (rio Itapicuru) (i).....69

Figura 10. Análise de Componentes Principais (PCA) para a forma da vista dorsal de *Hypostomus* spp. da Bahia (a), com as grades de deformação e os contornos demonstrando a variação da forma dos morfotipos (azul escuro) em relação à forma média (azul claro) a partir do conjunto de dados dos escores positivos e negativos do PC1 (b, c) e PC2 (d, e) respectivamente.....72

Figura 11. Análise de Componentes Principais (PCA) para a forma da vista ventral de *Hypostomus* spp. da Bahia (a), com as grades de deformação e os contornos demonstrando a variação da forma dos morfotipos (azul escuro) em relação à forma média (azul claro) a partir do conjunto de dados dos escores positivos e negativos do PC1 (b, c) e PC2 (d, e) respectivamente.....73

Figura 12. Análise de Componentes Principais (PCA) para a forma da vista lateral esquerda de *Hypostomus* spp. da Bahia (a), com as grades de deformação e os contornos demonstrando a variação da forma dos morfotipos (azul escuro) em relação à forma média (azul claro) a partir do conjunto de dados dos escores positivos e negativos do PC1 (b, c) e PC2 (d, e) respectivamente.....74

Figura 13. Dendrograma gerado por UPGMA ilustrando as distâncias morfométricas médias entre a forma do corpo com base na vista dorsal dos indivíduos do gênero *Hypostomus* das bacias da região Atlântico Leste do Brasil, com 10.000 permutações.....75

Figura 14. Árvore representativa baseada em NJ das sequências do COI de *Hypostomus* spp. e espécies afins. Os valores acima dos ramos representam o grau de confiabilidade (>60%)

pelos métodos de NJ, ML e BI. As colunas indicam os resultados dos algoritmos de delimitação de espécie (BIN, ABGD, GMYC, bPTP). (*) valores abaixo de 60%.....79

Figura 15. Rede de haplótipos construída com sequências do gene COI, demonstrando as relações entre os haplótipos dos morfotipos de *Hypostomus* de bacias costeiras da Bahia. Cada cor representa um morfotipo e a dimensão dos círculos é proporcional ao número de indivíduos (indicado dentro de cada círculo) que compartilham cada haplótipo. Os números acima das linhas indicam a quantidade de mutações.....81

Figura 16. Cariótipos e pares portadores de Ag-RONs (detalhe) de (a) *H. jaguar* (rio Jequiriçá); (b) *H. jaguar* (rio Paraguaçu); (c) *H. chrysostiktos*; (d) *H. unae* (rio Pardo); (e) *H. wuchereri* (rio Cachoeira); (f) *H. brevicauda* (rio Almada); (g) *Hypostomus* sp. n. 2 (rio Itapicuru).....83





LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização dos pontos de coleta de *Hypostomus* spp. em bacias costeiras da Bahia.....55

Tabela 2. Número de espécimes de *Hypostomus* spp. coletados em bacias hidrográficas da Bahia de acordo com o método de análise.....56

Tabela 3. Marcos anatômicos inseridos em cada vista analisada de espécimes de *Hypostomus* spp. de bacias costeiras da Bahia.....59

Tabela 4. Distâncias genéticas intraespecíficas (D) e erro-padrão (S.E.) a partir do modelo K2P de cada morfotipo de *Hypostomus* spp. de bacias costeiras da Bahia.....76

Tabela 5. Distâncias genéticas interespecífica baseadas no modelo K2P entre morfotipos de *Hypostomus* spp. de bacias costeiras da Bahia.....77

Tabela 6. Informações citogenéticas de morfotipos e espécies de *Hypostomus* de bacias costeiras da Bahia e táxons relacionados a partir de análises de DNA *barcode* (*)......84

Tabela 7. Sumário dos resultados das análises morfométricas e genéticas em morfotipos de *Hypostomus* spp. de bacias costeiras da Bahia. O símbolo (+) indica que o grupo foi bem apoiado pela análise, enquanto (*) indica sobreposição parcial entre morfotipos e (-) indica ausência de discriminação do morfotipo ou caráter não avaliado. Valores de suporte estatístico são apresentados para as análises NJ.....86

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ABGD - Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation	INMA – Instituto Nacional da Mata Atlântica
Ag-RONs – Regiões organizadoras de nucléolos impregnadas por nitrato de prata.	ITIS - <i>Integrated Taxonomic Information System</i>
ANOVA - Análise da Variância	K2P – Kimura 2 parâmetros
Bee-BOL - <i>Bee Barcode of Life Initiative</i>	MANOVA - Análise Multivariada da Variância
BI – Inferência Bayesiana	MarBOL- <i>Barcoding of Marine Biodiversity</i>
BINs - <i>Barcode Index Numbers</i>	MBI - <i>Mosquito Barcoding Initiative</i>
BLAST - <i>Basic Alignment Search Tool</i>	ML – Maxima verossimilhança
BOLD - <i>Barcode of Life Data System</i>	MrBayes - <i>Bayesian Inference of Phylogeny</i>
bPTP - Bayesian implementation of the PTP	mtDNA – DNA mitocondrial
CBOL - <i>Consortium for the Barcode of Life</i>	NCBI - <i>National Center for Biotechnology Information,</i>
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais	NF – número fundamental
CNPq - O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	NJ – <i>Neighbor-joining</i>
COI – Citocromos c Oxidase – subunidade I	NN - NEAREST NEIGHBOR – vizinho próximo
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente	PAST - <i>PALaeontological STatistics</i>
CS – grupo de bacias central-sul	PC – componente principal
DNA – Ácido desoxirribonucleico	PCA – Análise de Componentes Principais
DNASP - DNA Sequence Polymorphism	PhyML - <i>maximum likelihood phylogenies</i>
dNTP - deoxyribonucleotide triphosphates	OTUs – Unidades taxonômicas operacionais
- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados	RONs – regiões organizadoras de nucléolo
ES – grupos de bacias do extremo sul	SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
FISH-BOL - <i>Fish Barcode of Life Initiative</i>	Taq DNA - <i>Thermus aquaticus DNA polymerase</i>
F _{ST} - Índice de fixação	TPS - <i>thin-plate spline</i>
GenBank – <i>Genoma Bank</i>	UCs – Unidades de Conservação
GMYC - General Mixed Yule Coalescent	UNESP – Universidade Estadual Paulista
GPA - Análise Generalizada de Procrustes	UPGMA - <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
hd - diversidade haplotípica	VCA - Análise de Variáveis Canônica
IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis	
iBOL - <i>International Barcode of Life</i>	



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 REGIÃO HIDROGRÁFICA DO ATLÂNTICO LESTE NA BAHIA	20
2.1.1 Bacia do rio Itapicuru	22
2.1.2 Bacia do rio Paraguaçu	23
2.1.3 Bacia do Recôncavo Sul	24
2.1.4 Bacia do rio de Contas	24
2.1.5 Bacia do Leste	26
2.1.6 Bacia do rio Pardo	27
2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE LORICARIIDAE E O GÊNERO HYPOSTOMUS	27
2.3 DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES E TAXONOMIA INTEGRATIVA	37
2.4 MORFOMETRIA GEOMÉTRICA	41
2.5 DNA BARCODE	43
2.6 CITOGENÉTICA E CITOTAXONOMIA	49
3. OBJETIVOS	52
3.1 OBJETIVO GERAL:	52
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	52
4. MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO	53
4.3 ANÁLISES MOLECULARES	60
4.3.1 Extração de DNA total	60
4.3.2 Amplificação da região de interesse	60
4.3.3 Sequenciamento de DNA	61
4.3.4 Análise das sequências	62
4.4 ANÁLISES CITOGENÉTICAS	64
5. RESULTADOS	65
5.1 ANÁLISE DOS MORFOTIPOS	65
5.1.1 <i>Hypostomus jaguar</i> (Zanata <i>et al.</i> , 2013)	65
5.1.2 <i>Hypostomus chrysostiktos</i> (Birindelli <i>et al.</i> , 2007)	65
5.1.3 <i>Hypostomus unae</i> (Steindachner, 1878)	66
5.1.4 <i>Hypostomus brevicauda</i> (Günther, 1864)	66
5.1.5 <i>Hypostomus wuchereri</i> (Günther, 1864)	67
5.1.6 <i>Hypostomus</i> aff. <i>wuchereri</i> - “nova espécie”	67
5.1.7 <i>Hypostomus</i> sp. n. 1	68

5.1.8 <i>Hypostomus</i> sp. n. 2.....	68
5.2 MORFOMETRIA GEOMÉTRICA	70
5.3 DNA BARCODE.....	76
5.4 ANÁLISE CITOGENÉTICA.....	82
6. DISCUSSÃO	85
6.1 HYPOSTOMUS CHRYSOSTIKTOS.....	86
6.2 HYPOSTOMUS UNAE.....	88
6.3 HYPOSTOMUS SP. N. 2	89
6.4 HYPOSTOMUS JAGUAR + HYPOSTOMUS SP. N. 1 + HYPOSTOMUS AFF. WUCHERERI + HYPOSTOMUS WUCHERERI + HYPOSTOMUS BREVICAUDA	90
6.5 INFERÊNCIAS BIOGEOGRÁFICAS E EVOLUTIVAS EM HYPOSTOMUS.....	93
7. CONCLUSÕES	97
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
ANEXO 1. TABELA DE DISTANCIA INTERESPECÍFICA DO GÊNERO <i>HYPOSTOMUS</i> A PARTIR DE SEQUÊNCIAS DO GENE COI DEPOSITADAS NO GENBANK E BOLD SYSTEMS.	120
ANEXO 2. NÚMERO DE OBSERVAÇÕES E PERCENTUAL DE CLASSIFICAÇÃO COM BASE NA VALIDAÇÃO CRUZADA.	121
ANEXO 3. ÁRVORE RECUPERADA PELA ANÁLISE GMYC.....	122
ANEXO 4. ÁRVORE RECUPERADA PELA ANÁLISE BPTP E PLOT MOSTRANDO A CONVERGÊNCIA DAS CADEIAS.....	123

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade não está distribuída uniformemente pelo planeta, existindo regiões de megadiversidade como o Brasil. Similarmente, a publicação dos estudos sobre a biodiversidade ainda é heterogênea de modo que o conhecimento gerado ainda é insuficiente se comparado à riqueza estimada.

Esse é o caso da ictiofauna Neotropical, reconhecida como a mais rica do mundo. Cerca de 50% (~8.000 espécies) dos peixes de água doce descritos ocorrem somente na América do Sul (Reis, 2003; Nelson, 2006). Porém, esse número ainda é subestimado frente à riqueza biológica do continente. As condições climáticas, a extensão, a complexidade e a história geológica das redes hidrográficas sul-americanas são alguns dos fatores abióticos que, ao longo de milhares de anos, favoreceram a especiação e diversidade dos peixes Neotropicais.

No Brasil, o interesse pela descrição da biodiversidade tem aumentado nas últimas décadas. Em geral, esses estudos são direcionados à conservação de flora e fauna terrestres, mas alguns contemplam recursos hídricos. No entanto, esses relatos usualmente focam o rio principal de bacias hidrográficas de maior interesse econômico, desprezando assim os rios de menor porte como afluentes e áreas de nascente. Apesar desse viés, mais de 3.000 espécies de peixes válidas são conhecidas para os sistemas hidrográficos brasileiros (ICMBio, 2016), com novas descrições a cada ano.

Na Bahia, a cobertura hidrográfica é distribuída pela Região Hidrográfica do São Francisco e pela Região Hidrográfica do Atlântico Leste. O grande diferencial entre essas regiões de outras bacias brasileiras é a presença de rios e riachos de regime intermitente. Este regime foi responsável pela adaptação de características peculiares às espécies regionais, culminando com grandes índices de endemismo a despeito da escassez de estudos em peixes no semiárido.

De fato, a maioria dos estudos sobre a ictiofauna da Bahia é realizada nas áreas de remanescente de Mata Atlântica, revelando inúmeras espécies de distribuição restrita. Estudos recentes mostram uma elevada associação entre cobertura vegetal terrestre, em especial da mata ciliar, e a composição da comunidade aquática, sugerindo que o desmatamento causa impactos similares no decréscimo da diversidade terrestre e aquática, sendo essas áreas de importância fundamental para conservação.

Como a maior parte dos rios brasileiros, a ictiofauna regional é dominada por representantes das ordens Characiformes e Siluriformes (Nelson, 2006). No caso de áreas de riacho, as espécies desses grupos costumam ser de pequeno a médio porte, com hábitos ainda não bem descritos.

Em função da crescente ação antrópica sobre os recursos hídricos, faz-se imprescindível a identificação precisa das espécies aquáticas e níveis de riqueza regional. No cenário atual, é possível que o processo de defaunação ocorra antes que as espécies sejam formalmente descritas, visto que o processo de identificação e validação de um táxon não é tarefa simples.

Um exemplo de grupo taxonomicamente controverso e abundante na região Neotropical são as espécies de Loricariidae. Devido à ampla distribuição e complexidade morfológica relatada, várias incertezas sobre as relações filogenéticas e a classificação de unidades taxonômicas permanecem sobre esse grupo de peixes. Um dos melhores exemplos dessa problemática é o gênero *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae), cujas espécies, conhecidas popularmente como cascudos ou acaris, são encontradas em toda a região Neotropical. O reconhecimento das espécies desse gênero pelas metodologias tradicionais é extremamente complicado e vários complexos de espécies são assinalados. Assim, a riqueza e a diversidade desse grupo permanecem subestimadas, especialmente em regiões ainda pouco estudadas como as bacias do Atlântico Leste.

Para que as incertezas taxonômicas, tais como déficit de informações biológicas e ecológicas, não limitem os estudos da ictiofauna em sistemas hídricos vulneráveis como as bacias hidrográficas da Bahia, deve-se optar por estratégias integradas entre análises morfológicas e métodos mais refinados. Entre esses, destaca-se a metodologia DNA *barcode*, a qual consiste na análise de um fragmento do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase subunidade I (COI) para determinar a diferenciação intraespecífica e interespecífica. Na última década, muitos estudos foram desenvolvidos com essa metodologia, tornando-a ainda mais promissora na medida em que prós e contras vão sendo discutidos e as estratégias de análise dos dados são melhoradas frente ao desafio de identificar a biodiversidade global.

Do mesmo modo, a análise morfológica, fortemente utilizada pela taxonomia, tem adquirido novas ferramentas e maior suporte estatístico que tornam os resultados ainda mais confiáveis e informativos. Entre elas, a morfometria geométrica tem sido uma das grandes apostas da análise morfológica por permitir a comparação de diferentes táxons, além de representar uma análise menos subjetiva para mensurar a variação na forma.

Tanto o DNA *barcode* como a morfometria geométrica tem se mostrado eficientes para revelar espécies crípticas. Esses dados, associados a outras abordagens (citogenética, ecologia, biogeografia etc.) constituem a denominada taxonomia integrativa. Como premissa, a análise taxonômica integrada busca acelerar a caracterização da biodiversidade, diminuindo as incertezas presentes para o estudo de grupos complexos e, muitas vezes, negligenciados.

Nesse sentido, o presente trabalho visa reunir dados de DNA *barcode*, morfometria geométrica e citogenética que possam ser úteis para a resolução de incertezas taxonômicas e possível identificação de novas espécies do gênero *Hypostomus* nas bacias baianas. Espera-se assim contribuir para resolução da problemática citada para o grupo na região e estimar a diversidade do gênero nos rios da Bahia, especialmente daqueles sob grande influência antrópica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Região Hidrográfica do Atlântico Leste na Bahia

O Brasil é um país megadiverso e privilegiado em disponibilidade hídrica uma vez que cerca de 13% das reservas de água doce do mundo estão em território brasileiro (ANA, 2015). Especificamente, o Estado da Bahia, por apresentar grande extensão territorial e diversidade de ecossistemas, abriga uma extensa e complexa rede hidrográfica.

O território baiano é banhado por duas grandes regiões: a região hidrográfica do São Francisco e a do Atlântico Leste. A região hidrográfica do Atlântico Leste, localizada entre as coordenadas 9°40' a 19°00'S e 36°40' a 44°00'O, compreende os estados da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Sergipe. Ela ocupa cerca de 4% do território brasileiro, com 69% da área inserida no estado da Bahia (MMA, 2006), incluindo bacias de grande importância regional, tais como Itapicuru, Paraguaçu, Recôncavo Sul, Contas, Leste, Pardo, Jequitinhonha e Mucuri (Figura 1).

Essa região é marcada pela influência da latitude que garante uma variação discreta dos atributos naturais, sendo estes bastante heterogêneos e com domínios ambientais muito específicos. Encontra-se em clima predominantemente tropical e inclui formações florestais como a Mata Atlântica que vai cedendo espaço para formações vegetais amplamente adaptadas ao ambiente mais seco e quente do oeste (MMA, 2006). Muitos estudos vinculam a região do Atlântico Leste a áreas suscetíveis à desertificação, onde domina o padrão climático árido e semiárido. Conforme esperado, há um predomínio da caatinga nessa região, mas fragmentos de florestas costeiras e cerrado também são encontrados (Rosa *et al.*, 2005; Cetra *et al.*, 2010).

O uso da água nessa região hidrográfica está relacionado às atividades de agricultura, pastagens, atividades industriais, saneamento, extrativismo mineral e constante expansão urbana, com ameaças antrópicas registradas para todas as suas bacias componentes (Rosa, 2004; Rosa *et al.*, 2005; MMA, 2006). O efeito dessas alterações sobre a assembleia de peixes

ainda precisa ser mais bem dimensionado de modo que possam ser adotadas medidas de manejo efetivas que permitam a conservação da diversidade regional (Severi *et al.*, 2010; ANA, 2012).

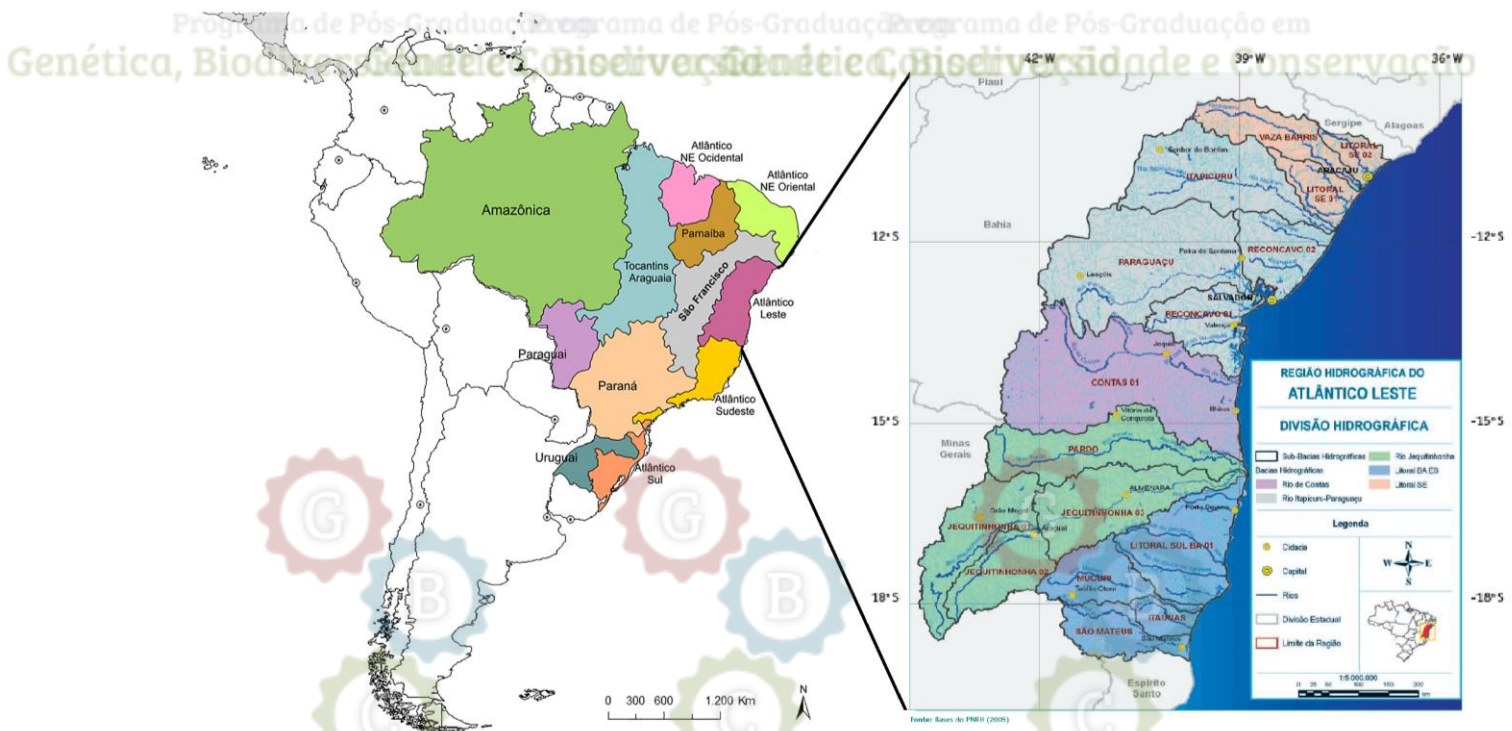


Figura 1. Mapa da região Neotropical, evidenciando as bacias hidrográficas brasileiras, com destaque para a região hidrográfica Atlântico Leste e suas bacias componentes.

De fato, muitos dos estudos ictiofaunísticos desenvolvidos na região sul e extremo sul da Bahia foram desenvolvidos visando à implantação de áreas de conservação (UCs) no bioma Mata Atlântica (Sarmiento-Soares *et al.*, 2007a; Sarmiento-Soares *et al.*, 2007b; Sarmiento-Soares *et al.*, 2009; Sarmiento-Soares & Martins-Pinheiro, 2009; Trindade *et al.*, 2010; Cetra *et al.*, 2010; Burger *et al.*, 2011). No entanto, a maior parte da ictiofauna da região hidrográfica do Atlântico Leste ainda permanece negligenciada em projetos de conservação.

Essa situação é alarmante, uma vez que 78 das 164 espécies válidas de peixes de água doce do estado da Bahia são descritas para as drenagens costeiras do Atlântico Leste, das quais 63 ocorrem apenas nas drenagens baianas e as outras 15 são descritas como endêmicas, embora tenham alguns relatos em sistemas adjacentes de outros estados, como Minas Gerais (Rosa & Lima, 2008). Em geral, atribui-se a alta taxa de endemismo e diversidade de ictiofauna dessa região à história evolutiva única e independente dos rios da região do Atlântico Leste

(Jacobina *et al.*, 2009). Ainda, 10 espécies de peixes da Bahia são classificadas como ameaçadas de extinção (Rosa & Lima, 2008; Camelier, 2010).

Como agravante, uma análise baseada na distribuição restrita de espécies de água doce identificou 21 pontos críticos para conservação de peixes da região Atlântico Leste (equivalente a 46% da região), número muito maior que o indicado em listas vermelhas. A maior parte desses pontos combina espécies simpátricas, alta taxa de endemismo, importante contribuição biogeográfica e elevada taxa de remoção da cobertura vegetal, com destaque para a Bahia (Nogueira *et al.*, 2010).

Acredita-se ainda que o número de espécies dos rios do Atlântico Leste da Bahia possa ser ampliado (Sarmiento-Soares *et al.*, 2008; Sarmiento-Soares *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2014). Por exemplo, Sarmiento-Soares *et al.* (2016) registraram, pela primeira vez, a ocorrência de *Imparfinis borodini* (Siluriformes) em uma bacia costeira do nordeste brasileiro (rio de Contas). Adicionalmente, um levantamento de dados da ictiofauna da ecorregião Mata Atlântica Nordeste permitiu dividir as bacias hidrográficas dessa área em três grandes grupos biogeográficos: Norte, Central e Sul (Camielier & Zanata, 2014).

No território baiano, o grupo Norte é composto pelos rios Itapicuru, Inhambupe, Pojuca e Paraguaçu. As bacias dos rios de Contas, Cachoeira, Almada, Una, Pardo e Jequitinhonha compõem o grupo Central enquanto o grupo Extremo Sul é formado pelos rios Buranhém, Frades, Jucuruçu, Itanhém, Peruípe, Mucuri, Itaúnas, São Mateus e Doce. Foi observado ainda que o grupo Central apresenta maiores semelhanças com o grupo Sul, apesar de atuar como uma barreira entre as ictiofaunas dos grupos Sul e Norte. Além disso, a composição ictiofaunística sofre uma mudança gradual com o aumento da latitude, variando de 7% (Norte), 36% (Central) e 57% (Sul) para os Siluriformes e de 30% (Norte), 80% (Central) e 25% (Sul) para os Characiformes (Camielier & Zanata, 2014). Muitas dessas bacias estão totalmente inseridas ou possuem grande número de sub-bacias em território baiano, sendo mais detalhadas a seguir.

2.1.1 Bacia do rio Itapicuru

Situada na região norte do estado, essa bacia ocupa uma área de drenagem de 36.440 km² com cerca de 350 km de extensão até a foz no Oceano Atlântico. Limita-se ao norte com as bacias do rio Real e Vaza Barris, ao oeste com a bacia do rio São Francisco e ao sul com a bacia do rio Paraguaçu. O principal rio dessa bacia é o Itapicuru, o qual constitui um dos maiores rios perenes da Bahia (CRA, 2001).

É um sistema hidrológico que fornece água em abundância ao semiárido baiano, sendo popularmente reconhecido como um oásis para a região. Ainda assim, as atividades antrópicas tem avançado rumo às nascentes dessa bacia nos últimos anos e a degradação ambiental da vegetação primária tem causado danos irreversíveis à biodiversidade, ainda pouco conhecida da região (Silva, 2008).

O grande número de barragens também é destacado como ameaça para a bacia, principalmente no trecho do Alto Itapicuru onde quatro barragens controlam a distribuição de recursos hídricos para o abastecimento urbano e irrigação (Silva, 2008). Adicionalmente, o risco de salinização do solo devido a esses processos oferece um grande impacto na agricultura (Brito, 2007).

Os estudos sobre a ictiofauna da bacia do rio Itapicuru ainda são escassos. Não obstante, indica-se uma forte semelhança entre a fauna de peixes dessa bacia com a do São Francisco, provavelmente por eventos de captura de cabeceira entre trechos do rio Itapicuru e a Bacia do rio São Francisco (Costa, 2001). Camelier e Zanata (2014) reforçam a alta similaridade da fauna de peixes do Itapicuru e São Francisco ao registrarem nove espécies compartilhadas apenas entre essas duas bacias.

Por outro lado, espécies endêmicas da bacia do Itapicuru também já foram identificadas, revelando que a riqueza de espécies dessa região pode ser maior que o pressuposto. Por exemplo, Costa (2011) descreveu a espécie *Hypsolebias nudiorbitatus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) com distribuição restrita à área de Caatinga no alto rio Itapicuru. Similarmente, Sarmiento-Soares *et al.* (2011) descreveram *Trichomycterus payaya* (Siluriformes: Trichomycteridae) para a bacia do rio Itapicuru, sendo o primeiro registro de *Trichomycterus* para o semiárido do nordeste brasileiro.

2.1.2 Bacia do rio Paraguaçu

A bacia do rio Paraguaçu ocupa 10% do território baiano, abrangendo 86 municípios (INEMA, 2015). A nascente do rio Paraguaçu está situada na Chapada Diamantina e a foz está situada a 500 km de distância na parte ocidental da Baía de Todos os Santos (Santos, 2005). A Chapada Diamantina forma um divisor de águas dessa e outras bacias da região do Atlântico Leste com a bacia do rio São Francisco.

Suas águas são utilizadas no abastecimento público e doméstico, barramentos, dessedentação de animais, lazer, esportes náuticos e pesca. As principais atividades que danificam a bacia são o lançamento de efluentes domésticos, a exploração mineral e a irrigação mecanizada (Santos, 2005). Integrando a bacia do Paraguaçu, destaca-se a sub-bacia

do rio Una, inserida no “Polígono das Secas”. De caráter intermitente, essa sub-bacia é caracterizada por água escura, fundo arenoso e pedregoso, sendo utilizada pela população ribeirinha para o abastecimento e atividades rurais (Carregosa & Andrade, 2012).

Devido a suas características, é esperada uma elevada taxa de espécies endêmicas na ictiofauna (Brito *et al.*, 2007). De fato, ainda que pouco estudada, a bacia do rio Paraguaçu apresenta a maior taxa de endemismo de peixes do estado da Bahia, incluindo uma subfamília, quatro gêneros e 22 espécies consideradas exclusivas (Birindelli *et al.*, 2007; Camelier, 2010).

2.1.3 Bacia do Recôncavo Sul

A bacia do Recôncavo Sul banha uma área de 17.788 km², situando-se entre as coordenadas 12°40’ a 14°20’S e 38°55’ a 40°20’O (INEMA, 2015). Assim como as demais bacias baianas, sofre com elevado grau de desmatamento, assoreamento e poluição em função do uso do solo para agricultura, pecuária, mineração e extração de recursos para construção civil (Garrido, 2003).

Os principais rios dessa bacia são o Jequiçá e Una (o qual não deve ser confundido com o rio Una da bacia do Paraguaçu ou o rio Una da bacia do Leste, descrito adiante). O primeiro escoar por região altamente degradada (Vale do Jequiçá) com margens compostas por monoculturas ou pasto e trechos estreitos devido ao assoreamento e urbanização (Garrido, 2003; Fisher, 2007). Por sua vez, o rio Una tem 93 km de extensão e drena área de 1.280 km², sendo um dos corpos de água mais utilizados nessa bacia (abastecimento urbano, agricultura, pecuária, extrativismo vegetal e mineração). Por conseguinte, ele apresenta alto nível de contaminação, principalmente causada por lançamento de efluentes domésticos de acordo com os valores estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/05 (Fischer, 2007).

Quanto à ictiofauna, Cetra *et al.* (2010) listaram 14 espécies de peixes de água doce para os rios das Almas e Jequiçá, sendo oito identificadas até nível específico. Posteriormente, Burger *et al.* (2011) listaram 41 espécies pertencentes a 28 gêneros de 12 famílias das 6 ordens que se distribuem pela região Neotropical. Nesse mesmo estudo, espécimes do gênero *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) dentre outros, não foram identificados a nível específico e podem ser indícios de espécies novas.

2.1.4 Bacia do rio de Contas

A bacia hidrográfica do rio de Contas está inserida na região hidrográfica do Atlântico Leste. Situa-se no centro-sul do estado da Bahia, entre as coordenadas 12°55’ a 15°30’ de latitude sul e 39°00’ a 42°35’ de longitude oeste (MMA, 2006).

O rio de Contas tem sua nascente na Chapada Diamantina (Serra do Espinhaço), a aproximadamente 1.500m de altitude e percorre 620 km até a foz em Itacaré - BA (CRA, 2001). É um dos mais importantes rios da região Atlântico Leste e da Bahia, com área de 55.000 km², dos quais 75% situam-se no “Polígono das Secas”. Seu curso conecta três biomas: o cerrado na Chapada Diamantina (região de cabeceiras), a caatinga em seu trecho médio e a Mata Atlântica na bacia inferior ao longo de região cacauzeira. Apresenta caráter torrencial e, com exceção do leito principal, os afluentes dos trechos médio e superior são intermitentes (Severi *et al.*, 2010).

Na região semiárida de Jequié - BA, o rio é represado pelo Reservatório da Barragem de Pedra para controle de cheias e geração de energia. À jusante da Barragem da Pedra, o rio é novamente represado para geração de energia na Usina do Funil, localizada a 8 km da sede do município de Ubatã. A Usina do Funil e a da Barragem da Pedra garantem fornecimento energético ao sudeste da Bahia em condições de contingência da malha de transmissão. A bacia do rio de Contas também é utilizada para irrigação, mineração e, principalmente, para agropecuária (Severi *et al.*, 2010).

Os impactos mais relevantes associados aos recursos hídricos e à biodiversidade dessa bacia referem-se ao assoreamento, lançamento de efluentes domésticos e deposição de resíduos sólidos nos seus principais afluentes como resultado das ações supracitadas, além das atividades industriais (Jesus *et al.*, 2014).

Outra grande ameaça à ictiofauna do rio de Contas foi a introdução de espécies não nativas, com o intuito de aumentar a produtividade pesqueira e a renda das comunidades ribeirinhas (Rosa *et al.*, 2005; Severi *et al.*, 2010). Entre os efeitos danosos dessa prática estão a exclusão de espécies nativas por predação ou competição, as alterações do ambiente pela redução de locais de desova e, até mesmo, a eutrofização (Agostinho *et al.*, 2005).

Os estudos da ictiofauna nativa da bacia do Rio de Contas ainda são pontuais, mas revelam predominância de espécies de peixes de pequeno a médio porte das ordens Characiformes e Siluriformes, se enquadrando no padrão geral para os rios Neotropicais (Lowe-McConnell, 1999). Ainda assim, a região parece abrigar grande riqueza de espécies, sendo muitas endêmicas, tal como *Cyphocharax pinnilepis* (Vari *et al.*, 2010), ou com necessidade de identificação até o nível específico (Severi *et al.*, 2010; Cetra *et al.*, 2010; Camelier & Zanata, 2014). Unidades evolutivas e formas crípticas também foram identificadas para alguns grupos de peixes, como observado entre populações de *Hypostomus* (Bitencourt *et al.*, 2011a), *Astyanax* (Medrado *et al.*, 2012; Medrado *et al.*, 2015) e *Geophagus brasiliensis* (Oliveira *et*

al., 2016) entre afluentes do rio de Contas e bacias adjacentes a partir de marcadores citogenéticos.

2.1.5 Bacia do Leste

A bacia do Leste faz limite ao norte com a bacia do rio de Contas, ao sul e ao oeste com a bacia do rio Pardo e ao leste com o Oceano Atlântico. Alguns autores ainda separam essa região em sub-bacias ou bacias propriamente ditas como as do rio Almada, Cachoeira, Una e Doce (INEMA, 2014).

A bacia do rio Almada apresenta descrições da ictiofauna para algumas espécies, principalmente para ordem Characiformes. Por exemplo, *Lignobrycon myersi*, atualmente ameaçada, foi descrita nessa região (Miranda-Ribeiro, 1956), tendo como localidade-tipo o afluente rio do Braço (entre Uruçuca e Ilhéus). Contudo, *L. myersi* foi posteriormente descrita para a bacia do rio de Contas (Barragem da Pedra em Jequié-BA) e no rio Salgado (Floresta Azul, BA), afluente da sub-bacia do rio Cachoeira (Castro & Jucá-Chagas, 2008; Rosa & Lima, 2008; Camelier & Zanata, 2014). Por outro lado, a espécie *Astyanax vermillion* tem distribuição conhecida apenas para os rios Almada e Cachoeira enquanto *Astyanax burgerai* parece ser exclusiva para o rio Almada (Zanata & Camelier, 2009). Situação similar é observada em outras ordens nessa região, como os Siluriformes. *Parotocinclus cristatus* (Loricariidae) foi descrita para a bacia do rio Almada e tem ocorrência registrada para outras drenagens costeiras próximas ao município de Ilhéus, Bahia (Schaefer, 2003).

Contudo, a ictiofauna típica dessa região tem sido ameaçada pela presença de espécies introduzidas como *Prochilodus argenteus*, *Oreochromis niloticus* e *Clarias gariepinus*. Essas espécies foram encontradas inclusive em áreas de proteção ambiental (APA) e de grande interesse biológico, como a APA da Lagoa Encantada (Rocha & Schiavetti, 2007).

A sub-bacia do rio Cachoeira está situada no sudeste do estado, entre as coordenadas 14°42'/15°20'S e 39°01'/40°09'O (INEMA, 2015). Ela é limitada ao norte pelas bacias dos rios de Contas e Almada e ao sul pelas bacias dos rios Pardo e Una, com nascente no município de Itororó. O rio Cachoeira passa a ser assim denominado após a junção de dois afluentes principais, o rio Salgado e o rio Colônia, até sua foz no município de Ilhéus (MMA, 2006).

A ictiofauna dessa sub-bacia é composta por 19 espécies pertencentes a 11 famílias (Cetra *et al.*, 2010). Porém, esses autores ressaltam a dificuldade de se identificar os espécimes a nível específico pela falta de informações da ictiofauna regional e pela carência de estudos com os peixes de pequeno porte da região Neotropical.

A sub-bacia do rio Una (1.700 km²) está inteiramente contida nos domínios da Mata Atlântica, sendo utilizada essencialmente para fins rurais. Em seu curso médio, o rio principal atravessa a pequena cidade de Una com 24.000 habitantes, enquanto restingas e manguezais pouco impactados estão presentes em seu estuário. A cobertura vegetal ainda é preservada, sem presença relevante da pecuária, representando a drenagem de menor pressão de uso para a bacia do Leste (de Paula *et al.*, 2012).

2.1.6 Bacia do rio Pardo

A bacia do rio Pardo é limitada ao sul pela bacia do Jequitinhonha e ao norte pela bacia do rio de Contas. É a segunda maior bacia do sul da Bahia, com superfície de 33.480 km². O rio Pardo nasce no estado de Minas Gerais e deságua no estado da Bahia percorrendo cerca de 565 km. Abrange 16 municípios e apresenta grande potencial para pesca artesanal e lazer. Diferentemente da maioria dos sistemas hídricos do Atlântico Leste, o monitoramento da qualidade da água indica padrões de aceitável a bom a despeito dos efluentes domésticos e industriais. Porém, no território baiano, o rio Pardo passa por trechos mais urbanos, apresentando assim algumas áreas de contaminação por esgoto doméstico, mas mantendo a potabilidade (Pinto, 2013).

Assim como as demais bacias citadas, a ictiofauna do rio Pardo é pouco estudada. Porém, a riqueza de espécies de peixes dessa região parece ser significativa. Somente para o afluente Catolé Grande no município de Itapetinga-BA, foram descritas 50 espécies pertencentes a 31 gêneros de 12 famílias de quatro ordens (Characiformes, Siluriformes, Cyprinodontiformes e Perciformes) (Pinto, 2013).

Há alguns estudos ictiofaunísticos desenvolvidos na região sul e extremo sul da Bahia, visando à implantação de áreas de conservação (UCs) na Mata Atlântica (e.g. Sarmiento-Soares *et al.*, 2007a; Sarmiento-Soares *et al.*, 2007b; Sarmiento-Soares *et al.*, 2008; Sarmiento-Soares e Martins-Pinheiro, 2009; Trindade *et al.*, 2010; Cetra *et al.*, 2010; Burger *et al.*, 2011). Porém, a ictiofauna da região hidrográfica do Atlântico Leste em geral ainda é pouco amostrada e, portanto subestimada.

2.2 Considerações sobre Loricariidae e o gênero *Hypostomus*

A ictiofauna Neotropical é subdividida em três grupos distintos, resultantes do processo evolutivo ocorrido desde a separação da Gondwana: 1- táxons de origem Gondwana que sobreviveram à separação da América do Sul e África (e.g. Characiformes e Siluriformes); 2- táxons com um ancestral marinho semelhante ao do continente (e.g. Sciaenidae e Cichlidae) e

3- táxons que apareceram após radiação adaptativa de um grupo-irmão de água doce (e.g. alguns clados de Characiformes e Siluriformes) (Brito *et al.*, 2007).

Dentre os Ostariophysi (grupo de peixes com aparato de Weber, cadeia de ossículos que conecta a bexiga natatória ao sistema auditivo), a ordem Siluriformes é a mais diversificada e distribuída com 37 famílias, 477 gêneros e 3.829 espécies válidas (Eschmeyer, 2016). Essa diversificação está intimamente relacionada a barreiras biogeográficas e mudanças climáticas ao longo da história evolutiva que limitaram a dispersão e determinaram eventos de vicariância desse grupo, favorecendo o isolamento reprodutivo e a especiação (Nelson, 2006; Ribeiro, 2006; Lujan *et al.*, 2015).

A maioria dos representantes dessa ordem que inclui os bagres e os cascudos ou acaris é de água doce, com exceção de duas subfamílias (Ariinae e Galeichthynae) tipicamente marinhas (Acero & Betancur-R, 2007). Os siluriformes são caracterizados pelo corpo achatado dorso-ventralmente e coberto com pele espessa ou placas ósseas ao invés de escamas. Geralmente, apresentam barbilhões ao redor da boca, hábitos noturnos e nadam próximos ao leito dos rios (Lowe-McConnell, 1999).

Os Siluriformes são divididos em duas subordens: Siluroidei e Loricarioidei. A primeira é composta por 30 famílias classificadas informalmente em dois grandes grupos continentais - "*Big Asia*" (predominantemente asiáticos) e "*Big Africa*" (predominantemente africanos) juntamente com outros grupos ainda mal resolvidos. Por outro lado, a subordem Loricarioidei inclui sete famílias predominantemente neotropicais, enquanto Diplomystidae (Neotropical) permanece indefinida (Sullivan *et al.*, 2006; Brito *et al.*, 2007; Armbruster, 2011) (Figura 2).

Os Gymnotiformes, grupo-irmão dos Siluriformes, também estão presentes exclusivamente na América do Sul (Fink & Fink 1981; 1996; Peng *et al.*, 2006), indicando que Loricarioidei seria um grupo antigo e que a região Neotropical atuaria como centro de origem da subordem (Sullivan *et al.*, 2006). Ainda segundo esses autores, uma forte relação filogenética é encontrada entre os Siluriformes africanos e asiáticos, mas não entre Siluroidei e Loricarioidei, reforçando a hipótese da origem Neotropical (Figura 2).

O monofiletismo da subordem Loricarioidei é apoiado por estudos morfológicos e moleculares (Sullivan *et al.*, 2006; Armbruster, 2011). Com ampla distribuição Neotropical e alta riqueza, esse grupo de peixes passou por notória radiação evolutiva em escala subcontinental, similar àquela ocorrida em ciclídeos africanos (Schaefer & Stewart 1993; Lecointre *et al.*, 2013). Esse fenômeno é particularmente evidente na família Loricariidae.

De fato, Loricariidae representa a família de maior distribuição Neotropical (Costa Rica à Argentina) e com maior riqueza entre os Siluriformes, totalizando 1.056 espécies (919 válidas), das quais 213 foram descritas na última década (Eschmeyer, 2016). Os peixes dessa família, conhecidos como cascudos ou acaris apresentam corpo coberto por placas ósseas, enquanto a forma do corpo e os padrões de coloração são variáveis (Reis *et al.*, 2013). Porém, a característica mais marcante do grupo é a boca modificada em disco oral ventral, relacionada ao seu elevado grau de especialização ecológica (Pinna, 1998; Ferraris, 2007; Roxo *et al.*, 2014; Covain *et al.*, 2016).

Atualmente, os loricarídeos estão agrupados em sete subfamílias, com base em caracteres morfológicos: Delturinae, Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Loricariinae, Neoplecostominae e Othothyrinae (Reis *et al.*, 2006; Chiachio *et al.*, 2009; Zawadzki *et al.*, 2015). Porém, a ampla distribuição e a formação de populações restritas contribuem para a complexidade sistemática de Loricariidae (Chiachio, 2009) de tal modo que as origens e relações evolutivas dentro desse grupo continuam mal compreendidas (Lujan *et al.*, 2015).

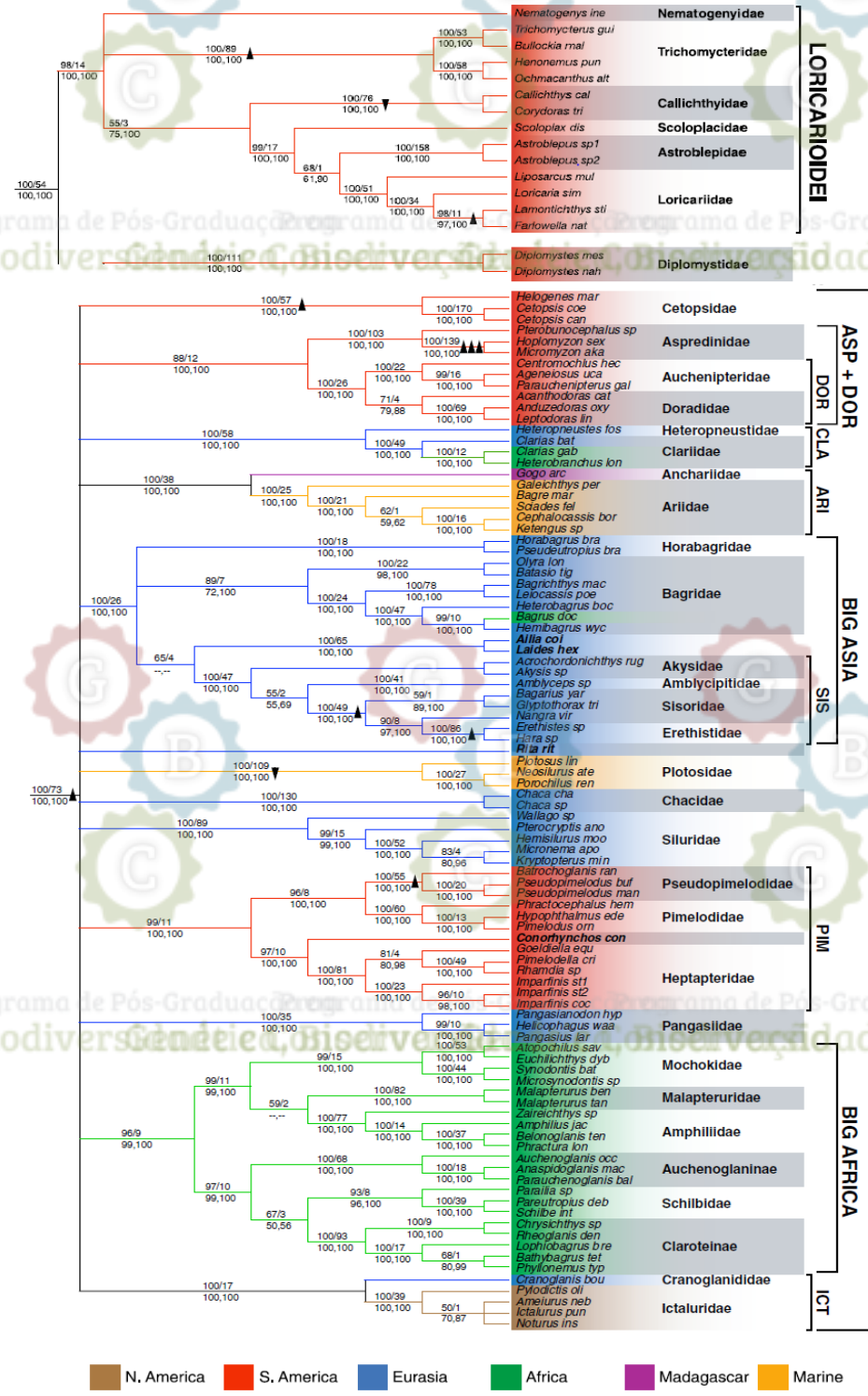


Figura 2. Árvore filogenética com base nas sequências de RAG1 e RAG2 mostrando clados suportados por proporção de *bootstrap* igual ou superior a 50%. Valores de *bootstrap* (acima dos ramos) e de probabilidade *a posteriori* (abaixo dos ramos) referem-se à análise de Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana, respectivamente. Setas pretas indicam sinapomorfias.

Ainda, a família Loricariidae é caracterizada por altas taxas de parafilia entre a grande maioria das subfamílias e mesmo gêneros (e.g. *Hypostomus* e *Pterygoplichthys*), conforme descrito por Armbruster (2004) com base em morfologia externa, osteologia e anatomia do trato digestório. No caso das tribos Ancistrini e Hypostomini da subfamília Hypostominae (Figura 3), esse autor propõe a remoção ou sinonimização de alguns gêneros para que a subfamília seja monofilética. Por exemplo, em *Hypostomus*, reconhecidamente parafilético, Armbruster (2004) sugere a inclusão de *Aphanotorulus*, *Cochliodon* e *Isorineloricaria*.

Outra proposta de reorganização das subfamílias de Loricariidae é apresentada por Cramer *et al.* (2011) a partir de análises moleculares com os genes de ativação de recombinação (RAG1 e RAG2), citocromo *c* oxidase subunidade I (COI), e F-Reticulon 4. Nesse trabalho, Hypostominae mantém-se monofilética com base na sugestão de Armbruster (2004), porém outras subfamílias (e.g., Hypoptopomatinae e Neoplecostominae) e vários gêneros ricos em espécies e de ampla distribuição não formam grupos naturais. Cramer *et al.* (2011) ressaltam a dificuldade de organizar filogeneticamente Loricariidae a partir de dados morfológicos subjetivos ou com sequências de DNA isoladamente, sugerindo que as análises devam combinar diferentes ferramentas e maior amostragem de táxons.

Recentemente, uma ampla análise filogenética foi realizada em Hypostominae por Lujan *et al.* (2015) (Figura 4) a partir de marcadores de DNA mitocondrial (16S e Cytb) e nuclear (RAG1, RAG2 e MyH6) incluindo espécimes da Argentina, Guiana e sudeste do Brasil com intuito de discutir a monofilia de todas as tribos. Esse estudo reorganiza a família que passa a apresentar seis subfamílias, com algumas das famílias citadas em estudos anteriores formando tribo, como por exemplo, Neoplecostominae que passa a Neoplecostomini dentro de Hypoptopomatinae, enquanto que Rhinelepini seria elevada ao status de subfamília Rhinelepinae. De acordo com esses dados, a tribo Hypostomini é composta pelos gêneros *Hypostomus* e *Pterygoplichthys* (que antes compunha a tribo Pterygoplichthini), compreendendo 170 espécies válidas. Nessa tribo, *Hypostomus* é o gênero mais diversificado e complexo, com cerca de 143 espécies válidas (Fishbase, 2016).

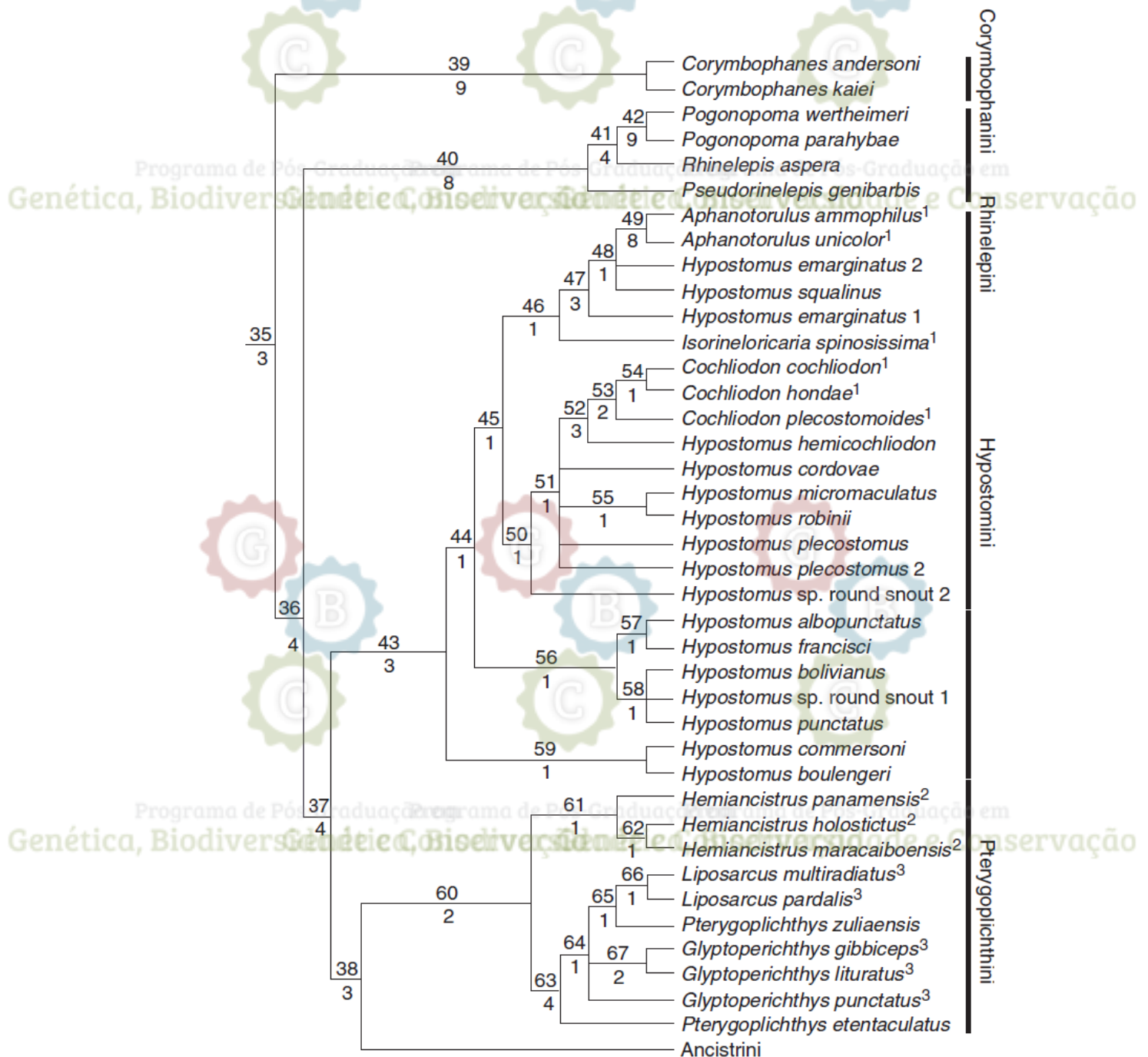


Figura 3. Relação entre as tribos da subfamília Hypostominae com base em caracteres morfológicos externos, osteológicos e anatomia do trato digestório por análise de Parcimônia. Números acima dos braços representam número de clados e os números abaixo são índices de decaimento (Armbruster, 2004).

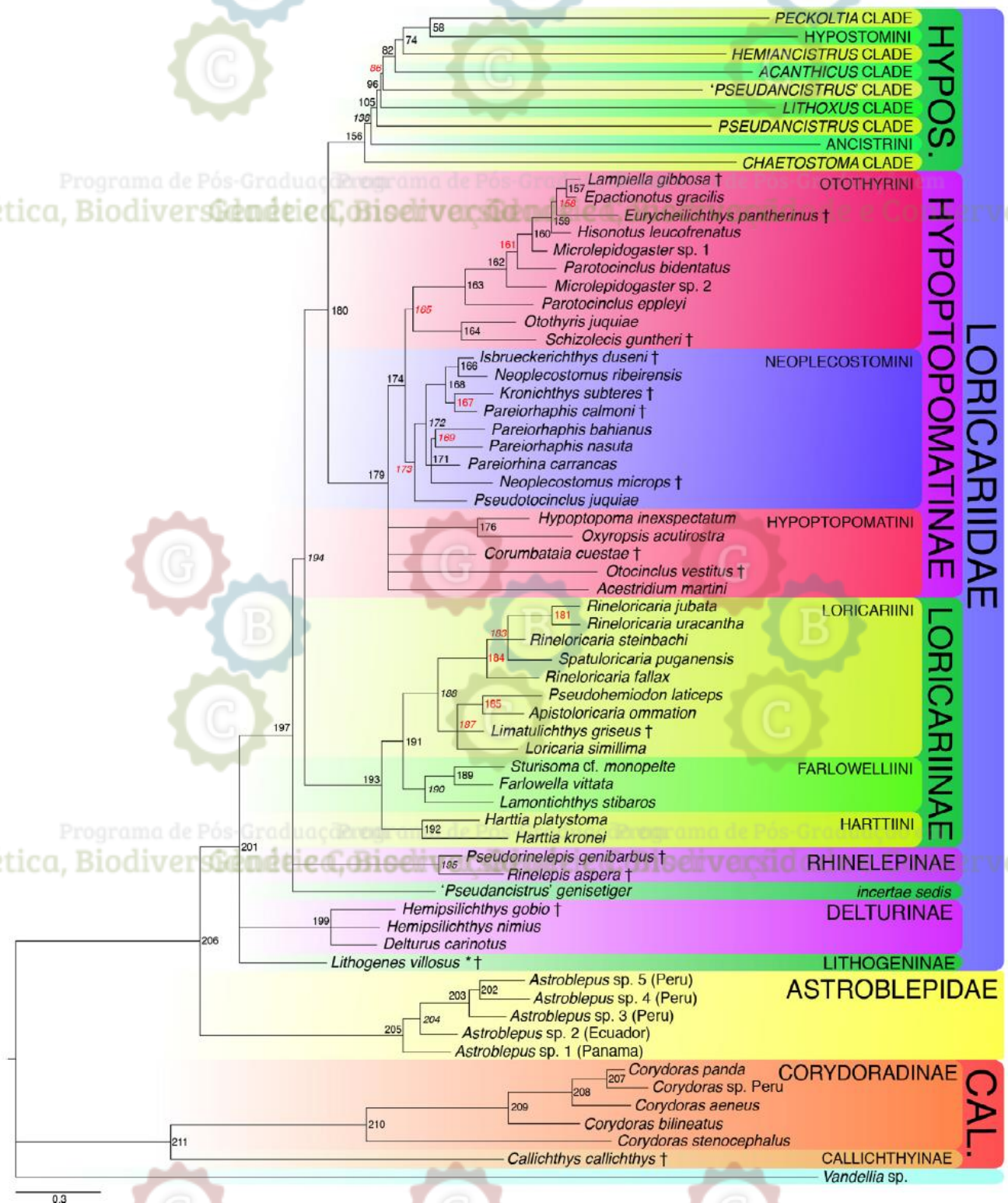


Figura 4. Relação filogenética da família Loricariidae com base na análise Bayesiana de dois genes mitocondriais (16S, Cit b) e três loci nuclear (RAG1, RAG2, MyH6). Números em vermelho indicam BI < 0,90; números em itálico indicam ML < 50. Asteriscos (*) indicam espécies coletadas próximas à localidade-tipo e as cruzes (†) indicam espécies-tipos (Lujan *et al.*, 2015).

A riqueza de espécies de *Hypostomus* parece estar associada à ampla distribuição, a qual inclui: duas espécies na bacia dos rios Magdalena e Atrato (Colômbia), seis na bacia do rio Orinoco (Colômbia e Venezuela), 20 em rios costeiros das Guianas e rio Oiapoque (Guiana francesa e Brasil), 16 em rios costeiros da região sudeste do Brasil, duas no rio Parnaíba, 28 em rios amazônicos, 44 em rios da bacia do Prata (destaque para a bacia do Alto Paraná) e 19 em rios costeiros do nordeste do Brasil (Carvalho, 2011; Fishbase, 2016).

Esse último grupo, interesse do presente estudo, seria composto por duas espécies para o Rio Grande do Norte (*Hypostomus pularum* Starks, 1913, *H. papariae* Fowler, 1941), quatro para o Ceará (*H. jaguribensis* Fowler, 1915, *H. carvalhoi* Miranda Ribeiro, 1937, *H. eptingi* Fowler, 1941 e *H. nudiventris* Fowler, 1941), oito para a bacia do rio São Francisco (*H. alatus* Castelnau 1855, *H. subcarinatus* Castelnau, 1855, *H. francisci* Lütken, 1874, *H. lima* Lütken, 1874, *H. johnii* Steindachner, 1877, *H. vaillanti* Steindachner, 1877, *H. macrops* Eigenmann e Eigenmann, 1888 e *H. garmani* Regan, 1904), e cinco descritas para a região costeira do estado da Bahia (*H. brevicauda* Günther, 1864, *H. wuchereri* Günther, 1864, *H. unae* Steindachner, 1878, *H. chrysoptiktos* Birindelli *et al.*, 2007, *H. jaguar* Zanata *et al.*, 2013). Dentre estas, *H. chrysoptiktos* e *H. jaguar* são as únicas que apresentam distribuição restrita, sendo consideradas endêmicas da bacia do rio Paraguaçu (Birindelli *et al.*, 2007; Zanata *et al.*, 2013).

H. brevicauda e *H. wuchereri* foram coletadas pelo naturalista Otto Edward Heinrich Wucherer e descritas em 1864 por Günther. A localidade-tipo na descrição original é “Bahia”, o que por muito tempo dificultou a limitação da distribuição dessas espécies nas bacias hidrográficas da região (Pitanga, 2015). Pitanga (2015) redescreveu essas espécies com base em caracteres morfológicos, propondo que *H. brevicauda* ocorreria nas drenagens do sul do estado (rios Colônia, Cachoeira e Almada). Essa espécie distingue-se por possuir pequenas manchas pretas medindo de um terço a metade do diâmetro do olho no corpo e nadadeiras, mas de tamanhos similares na cabeça e tronco. Nas membranas inter-radiais da nadadeira dorsal, essas manchas estariam organizadas usualmente em três séries.

Por sua vez, *H. wuchereri* (Günther, 1864) foi redescrita para os sistemas hidrográficos dos rios Aliança (Una), Cachoeira e Santana, também no sul da Bahia. Essa espécie seria caracterizada por pequenas manchas escuras no corpo e nadadeiras que variam de um terço a metade do diâmetro do olho. Essas manchas seriam um pouco maiores no tronco que na cabeça e estariam presentes em duas séries nas membranas inter-radiais da nadadeira dorsal (Pitanga, 2015).

Adicionalmente, sugere-se que exemplares da bacia do rio de Contas, tentativamente identificados como *H. cf. wuchereri* e *H. aff. unae* correspondam a uma possível nova espécie ainda a ser descrita (Sardeiro, 2012). Possivelmente, essas espécies ocorrem em simpatria em certas regiões, o que poderia gerar dúvida entre os taxonomistas quanto a uma possível sinonímia com *H. brevicauda*. De fato, a diagnose morfológica de *H. brevicauda* e *H. wuchereri* deixa margens para especulação uma vez que as diferenças estão baseadas no número, coloração e disposição de manchas.

Hypostomus unae (Steindachner, 1878) foi descrita originalmente com localidade-tipo para o rio Una-Bahia. No entanto, como comentado anteriormente (item 2.1), há três rios com esta denominação pertencentes a diferentes bacias hidrográficas da Bahia (Recôncavo Sul, Paraguaçu e Leste), comprometendo a exatidão da distribuição dessas espécies. Segundo Sardeiro (2012), essa espécie teria ocorrência nos rios Una, Almas e Jequiçá que fazem parte da bacia do Recôncavo Sul.

Hypostomus chrysoptiktos (Birindelli *et al.*, 2007), considerada endêmica da bacia do rio Paraguaçu, foi originalmente identificada como *Pterygoplichthys* sp. (Higuchi *et al.*, 1990). Erros na classificação de *Pterygoplichthys* e *Hypostomus* são comuns na literatura sobre Hypostominae devido à alta similaridade de caracteres morfológicos e critérios subjetivos de distinção desses gêneros, conforme verificado para *H. duodecimalis* Valenciennes, 1840 (Armbruster 2004) e *H. multiradiatus* Hancock, 1828 (Armbruster, 2004; Ferraris, 2007). De acordo com Birindelli *et al.* (2007), *H. chrysoptiktos* difere de *Pterygoplichthys* por três características principais: ausência ou redução do osso “interno” na porção posterior, presença de um estômago alargado ligado à parede abdominal por uma folha de tecido conjuntivo dorsal e placas laterais totalmente eversíveis. Quanto às características externas, destacam-se a ausência de abdômen completamente coberto por placas de odontóides, presença de um processo supraoccipital elevado e placas pré-dorsais e as placas laterais quilhadas (Armbruster & Page, 2006).

Por sua vez, essa espécie distingue-se morfológicamente da maioria das espécies de Loricariidae pelo grande número de raios ramificados da nadadeira dorsal (10-11), embora essa característica também seja encontrada entre alguns membros de gêneros *Chaetostoma*, *Delturus*, *Megalancistrus* e *Pterygoplichthys* (Birindelli *et al.*, 2007). A nova espécie pode ser ainda diagnosticada pela combinação dos seguintes caracteres: placas laterais da cabeça levemente eversíveis, quatro raios ramificados na nadadeira anal, abdômen nu e focinho quase completamente coberto por placas. As principais diferenças de *H. chrysoptiktos* em

relação às demais espécies citadas para a Bahia referem-se à presença de 10 a 11 raios ramificados na nadadeira dorsal e manchas amarelo-ouro nos exemplares *in situ* destacando-se sobre uma cor de mais escura do corpo (Birindelli *et al.*, 2007).

A quinta e mais recente espécie descrita para rios costeiros da Bahia é *H. jaguar* (Zanata *et al.*, 2013), com distribuição restrita para a bacia do rio Paraguaçu em simpatria com *H. chrysoptiktos*. Em relação às espécies congêneres anteriormente citadas e aquelas com ocorrência na bacia do rio São Francisco, *H. jaguar* se difere por apresentar manchas pretas grandes, conspícuas e de tamanho semelhante, distribuídas por todo o corpo, cabeça e nadadeiras sobre um fundo claro. A espécie também apresenta ausência de quilhas, ventre nu ou parcialmente coberto por placa na região da cabeça e tórax e o lobo inferior da nadadeira caudal não muito mais longo que o superior (Zanata *et al.*, 2013).

Os exemplos supracitados, bem como vários estudos morfológicos em outras espécies de *Hypostomus* mostram a dificuldade de resolver a taxonomia do gênero. Em geral, a acentuada plasticidade fenotípica do grupo e o caráter subjetivo das diferenças diagnósticas levam à sobreposição de caracteres morfológicos ou ausência de características espécie-específicas conspícuas (Ward *et al.*, 2009; Pante *et al.*, 2014; Lujan *et al.*, 2015). Esses fatores parecem ser ainda influenciados pela ampla área de ocorrência do grupo com a formação de isolados populacionais.

De fato, a dispersão e vicariância do gênero *Hypostomus* na região Neotropical parece ter sido fortemente influenciada por eventos tectônicos ao longo de toda sua área de distribuição, tais como eventos históricos de conexão e separação entre bacias hidrográficas (Silva *et al.*, 2016). Em espécies de *Hypostomus* da bacia do Amazonas e da bacia Platina, Cardoso *et al.* (2012) estimam que tenham ocorrido pelo menos quatro eventos de especiação alopátrica independentes entre o sistema Amazônico e os rios do agrupamento composto pelas bacias do rio Paraná, rio São Francisco e costeiras da América do Sul. Esse cenário levou à formação de dois grandes grupos de espécies, cuja separação teria se iniciado a cerca de 12,5 Mya (Silva *et al.*, 2016).

O evento vicariante entre o sistema amazônico do sistema Platino teria então originado os grupos *Hypostomus cochliodon* e *Hypostomus* sp. como resultado da separação de fronteiras e circulação da água entre as bacias paleo-Amazonas-Orinoco e La Plata (11.8–10 Mya). Essa proposta está de acordo com as inferências de Lundberg *et al.* (1998) no primeiro trabalho que associava a biogeografia de peixes com eventos tectônicos em escala continental.

Montoya-Burgos (2003), Cardoso *et al.* (2012) e Roxo *et al.* (2014) discutem os agrupamentos compostos por espécies desses dois grandes sistemas hidrográficos evidenciando que a diversificação da ictiofauna Neotropical (incluindo assim o gênero *Hypostomus*) ocorreu no sentido Norte-Leste. Essa hipótese foi também reforçada por Ribeiro *et al.* (2011), Unmack *et al.* (2012) e Silva *et al.*, (2016). O agrupamento que inclui espécies distribuídas tanto no sistema Amazônico quanto no rio Paraná + rios costeiros da região Atlântico Leste (Cardoso *et al.*, 2012) são datados a cerca de 9,3 Mya, sendo resultante de eventos de circulação de água entre essas bacias principais, com possíveis trocas entre cabeceiras seguidas de isolamento dos sistemas fluviais.

Além dos efeitos de eventos tectônicos na distribuição de *Hypostomus*, o oportunismo ecológico desse gênero parece ter desempenhado um papel relevante para o sucesso evolutivo e variação morfológica do grupo nas bacias ao leste da Cordilheira dos Andes e, principalmente, no sistema hídrico do Alto Paraná. Os fatores que podem ter favorecido o rápido processo de especiação e radiação adaptativa de *Hypostomus* ao invadir um novo ambiente incluem menor predação e a redução na competição por alimento e recursos de habitat, associada à ampla tolerância de dieta e de habitat dos Loricariidae (Silva *et al.*, 2016).

Além da variação interespecífica, estudos moleculares usando marcadores enzimáticos também têm detectado acentuada diferenciação genética entre populações de *Hypostomus*, compatíveis com formas crípticas em várias regiões do Brasil (Zawadzki *et al.*, 2008a; 2008b; Bitencourt *et al.*, 2011a; Carvalho *et al.*, *in prep.*). Igualmente, dados citogenéticos em *Hypostomus* mostram notável variabilidade cariotípica numérica e estrutural (Cereali *et al.*, 2008; Bueno *et al.*, 2012). Além das diferenças interespecíficas, os estudos cariotípicos em *Hypostomus* têm revelado a existência de cariomorfos divergentes entre populações de uma mesma unidade taxonômica. Por exemplo, análises cromossômicas em *H. aff. unae* e *H. cf. wuchereri* de bacias costeiras da Bahia sugerem a existência de unidades evolutivas únicas nos rios das bacias do Rio de Contas e Recôncavo Sul (Bitencourt *et al.*, 2011a; 2011b; 2012).

Esses dados reforçam que a diversidade do grupo pode ainda ser subestimada nas drenagens costeiras da Bahia. Assim, estudos de taxonomia integrada são imprescindíveis para que as espécies sejam apropriadamente identificadas para as bacias do Atlântico Leste.

2.3 Delimitação de Espécies e Taxonomia Integrativa

Por séculos, a taxonomia tem sido a ciência responsável pela identificação, classificação e nomenclatura da biodiversidade baseada no sistema binomial proposto pelo botânico sueco Carl Linnaeus em 1753. Trata-se de uma ciência com métodos minuciosos para identificar os

organismos por meio da morfologia externa e/ou interna (Ward *et al.*, 2009). Ao longo desses 250 anos, cerca de 1,2 milhões de espécies foram descritas, mas existem estimativas de que 86% das espécies existentes na Terra e 91% das espécies do oceano ainda permaneçam sem descrição formal (Mora *et al.*, 2011).

Com o intuito de tornar mais célere o processo de identificação da biodiversidade, foi proposta a denominada taxonomia integrativa (Dayrat, 2005), área da ciência que visa delimitar as unidades da diversidade da vida sob a perspectiva de várias ferramentas complementares (biologia molecular, morfologia comparativa, ecologia, desenvolvimento, comportamento, reprodução etc.). Também chamada de análise multidisciplinar ou taxonomia integrada, essa abordagem tem como premissa a associação de diversas áreas de pesquisas, sem excluir nenhum método que se mostre informativo, ainda que haja certa relutância por algumas escolas mais tradicionais (Wheeler, 2008).

O surgimento da taxonomia integrativa foi alavancado pela atual “crise taxonômica” que as ciências biológicas enfrentam. Essa crise é um problema global, causado pela falta de taxonomistas especializados (cerca de 10.000 de acordo com a *Swiss Academy of Sciences* em 2007), poucos investimentos do fomento à pesquisa taxonômica e crescente desinteresse entre os estudantes de biologia (Mallet & Willmott, 2003; Pires & Marinoni, 2010). Diante dessa situação, o tema vem sendo debatido em eventos que buscam reunir informações sobre a biodiversidade, especialmente na tentativa de elaborar projetos efetivos para conservação das espécies.

A partir dos estudos de taxonomia integrativa tem sido possível a identificação dos limites entre espécies, mesmo em grupos intimamente relacionados. Exemplos bem sucedidos com essa abordagem estão presentes em anfíbios (Gehara *et al.*, 2014), répteis (Aguilar *et al.*, 2013), mamíferos (Tocchio *et al.*, 2015), plantas (Rouhan & Gaudeul, 2014) e inúmeros táxons de peixes (Padiál *et al.*, 2010; Roxo *et al.*, 2015; Gomes *et al.*, 2015).

Conforme indicado por revisões taxonômicas, um dos maiores problemas atuais diz respeito à falta de informações sobre as espécies-tipo identificadas no passado (Armbruster, 2004; Sardeiro, 2012; Roxo *et al.*, 2012; Pitanga, 2015; Lujan *et al.*, 2015). Paralelamente, o aumento do número de espécies formalmente descritas, muitas vezes com auxílio de dados moleculares, ao longo das últimas décadas também gerou maior número de incertezas taxonômicas quanto à descrição de alguns grupos mais complexos com pouca ou recente diferenciação morfológica (Pereira *et al.*, 2011). Esses resultados conflitantes, também

conhecidos como “zonas cinzentas” (*grey zones*) confundem as tentativas de estimativas de biodiversidade (DeQueiroz, 2007).

De acordo com Bittner *et al.* (2010), dois tipos de “zonas cinzentas” podem ser encontrados: (1) grupos cujas propriedades que os definam tenham surgido em tempos diferentes ao longo da especiação e (2) grupos com sobreposição parcial de caracteres devido à separação incompleta das linhagens seja por especiação recente, introgressão, hibridação ou poliploidização. Casos desse tipo tem sido cada vez mais frequentes (Agapow *et al.*, 2004; Hebert *et al.*, 2004a; Alverson, 2008), pois as espécies claramente distintas, independentemente do método utilizado, tendem a ser descritas primeiramente.

Diante desse cenário, a taxonomia integrativa é cada vez mais necessária para obtenção de resultados confiáveis no que diz respeito ao erro inerente de cada ferramenta. As taxas de falha da morfologia e os distintos resultados genéticos na literatura sugerem cautela na utilização de uma única fonte de informação para caracterizar a biodiversidade (Bittner *et al.*, 2010). De fato, alguns trabalhos tem demonstrado que a análise genética isolada pode distorcer a taxonomia quando outros dados são negligenciados devido à carência de contextualização dos resultados (DeSalle *et al.*, 2005; Lipscomb *et al.*, 2003; Meyer & Paulay, 2005; Wiemers & Fiedler, 2007).

No entanto, a junção de diferentes ferramentas para a taxonomia perpassa por uma questão controversa e amplamente debatida: “qual conceito de espécie dentre os 26 vigentes deve ser utilizado?” (Frankham *et al.*, 2012). Uma vez que não há consenso, cada área poderia adotar conceituações distintas e não chegariam a um resultado convergente (Mace, 2004; Agapow *et al.*, 2004).

A partir dos estudos de Mayr (1963), o conceito biológico de espécie (CBE) passou a ser um dos mais difundidos, o qual preconiza o isolamento reprodutivo entre populações naturais de espécies distintas. Porém, esse conceito apresenta sérias deficiências, uma vez que as barreiras reprodutivas entre espécies podem ser semipermeáveis e que a ausência de fluxo gênico pode estar relacionada estritamente ao isolamento geográfico em espécies alopátricas (Mallet, 2008). Ainda, o CBE não é aplicável para espécies de reprodução assexuada, como bactérias (Klein & Martins-Ferreira, 2012).

Visando contornar essas limitações, Hausdorf (2011) cunhou o conceito de aptidão diferencial ou “fitness” (Hausdorf, 2011). De acordo com essa proposta, uma espécie pode ser definida como grupos de indivíduos que apresentam reciprocamente características que teriam efeitos de aptidão negativa caso entrem em contato reprodutivo. Esse conceito de espécie

considera mutações em genes, mudanças cromossômicas e outros elementos genéticos como transposons, genes e/ou grupos de genes adquiridos por transferência horizontal em procariotos. As diferenças entre os grupos podem ser resultantes de adaptação diferencial devido à seleção natural ou sexual, mas também pode ser resultado de deriva genética ou outros processos frequentemente não adaptativos tais como poliploidização ou infecções por simbiontes (Frankham *et al.*, 2012).

Outro conceito amplamente utilizado nos últimos anos graças ao advento de dados moleculares é o conceito filogenético. Esse conceito considera que espécie é o menor agrupamento diagnosticável de organismos de acordo com um padrão parental de ascendência e descendência, apresentando assim um padrão de ancestralidade filogenética entre unidades da mesma espécie (Cracraft, 1983; Frankham *et al.*, 2012). No entanto, esse conceito também é limitado, pois cada mutação poderia indicar uma espécie distinta em organismos uniparentais enquanto espécies estreitamente relacionadas e sujeitas à hibridação não revelariam o padrão de ascendência e descendência (Hausdorf, 2011).

Diante dessas controvérsias, DeQueiroz (2005b; 2007) sugere que todos os conceitos de espécies existentes compartilham uma base comum na qual a espécie é uma linhagem da metapopulação que passar a evoluir separadamente. Seguindo essa lógica, o conceito de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs), representando populações diferenciadas em termos genéticos, morfológicos e/ou ecológicos de populações próximas (coespecíficas), reflete o isolamento reprodutivo histórico (Schmidt *et al.*, 2015), sendo útil para estudos da biodiversidade.

Assim, Schlick-Steiner *et al.* (2010) propõem um protocolo no qual diferentes ferramentas sejam utilizadas separadamente e os resultados sejam então comparados para a elaboração de uma hipótese mais robusta na delimitação de uma nova espécie ou na reanálise da mesma. Para isso, as abordagens mais utilizadas fazem uso da análise morfológica, seguida por análise genética (nuclear e mitocondrial), ecológica, enzimática, citogenética e, recentemente, a genômica e metagenômica (Schlick-Steiner *et al.*, 2010; Bittner *et al.*, 2010). Em geral, recomenda-se o uso de, pelo menos, análises morfológicas e genéticas para a resolução do status taxonômico entre unidades evolutivas (Schlick-Steiner *et al.*, 2010).

2.4 Morfometria Geométrica

A morfometria tem sido utilizada pelos taxonomistas para mensurar as diferenças existentes entre espécies, porém eram baseadas na comparação de várias medidas isoladamente (Peres-Neto *et al.*, 1995). Desta forma, os dados obtidos eram praticamente específicos para cada táxon, dificultando ou mesmo impedindo a comparação entre organismos menos aparentados (Zelditch *et al.*, 2004).

Desde a década de 80, programas computacionais tornaram possível a análise de diversas variáveis em conjunto criando referências para comparações. No entanto, mesmo com ferramentas para análises multivariadas a partir de medidas lineares, a morfometria não era considerada um conjunto de teorias e métodos consistentes, pois carecia de fundamento estatístico (Kendall *et al.*, 2009; Fornel & Cordeiro-Estrela, 2012). Essa situação foi revertida quando, em 1983, Colin R. Goodall apresentou um teste estatístico para o estudo de forma em um espaço multivariado.

Em seguida, dois trabalhos foram publicados pelo matemático e estatístico David G. Kendall (Kendall, 1984) e pelo zoólogo e estatístico Fred L. Bookstein (Bookstein, 1991) propondo um novo método geométrico para estudar diferenças da forma em configuração de marcos anatômicos (*landmarks*). Os marcos anatômicos (*landmarks*) são pontos de referência bidimensionais (X, Y) ou tridimensional (X, Y e Z) que formam coordenadas cartesianas para a representação gráfica da forma em duas ou três dimensões (Bookstein, 1991).

A partir de então, surge a morfometria geométrica para a análise da variação entre formas com a visualização gráfica das diferenças (Lima, 2007) a partir de coordenadas cartesianas, reunindo biologia, estatística e geometria (Bookstein, 1991, Adams *et al.*, 2004). Essa abordagem passou a ser definida como um conjunto de métodos de aquisição, processamento e análise das variáveis da forma, de maneira que toda a informação geométrica contida nos dados originais e as informações sobre covariação espacial entre os pontos de referência são mantidas (Rohlf & Marcus, 1993; Slice, 2007).

Porém, para que a morfometria geométrica seja eficaz, os marcos anatômicos devem apresentar algumas características como: (1) homologia entre si, (2) cobertura adequada da forma do objeto estudado, e (3) mesma topologia dentro de uma estrutura maior (Albert *et al.*, 2003). Assim, três tipos de marcos anatômicos são classificados quanto ao grau de confiabilidade da homologia: Tipo I - pontos de homologia altamente confiáveis, tais como justaposição de tecidos; Tipo II - pontos de homologia com média confiabilidade (e.g., extremos de maior concavidade ou maior convexidade da estrutura); Tipo III - pontos de

baixa confiabilidade ou semimarcos, os quais representam bordas de estruturas (contornos) (Bookstein, 1991; Monteiro & Reis, 1999).

As coordenadas demarcadas com os marcos contêm informações geométricas que indicam suas posições e são necessárias para o processo de sobreposição a fim de eliminar os efeitos de escala, orientação e posição (Bookstein, 1991). Esse processo é realizado por meio da análise generalizada de Procrustes (GPA), um espaço curvo, chamado de Espaço de Kendall, no qual cada objeto é um ponto e a distâncias entre os pontos (ou entre duas formas) é dada pela distância de Procrustes (Rohlf & Slice, 1990).

Na GPA, a centralização de todas as coordenadas na origem (translação) remove os efeitos da posição. Em seguida, todas as configurações são escalonadas para gerar a medida do tamanho do centróide e todas as configurações são rotacionadas (rotação) para minimizar as diferenças entre os marcos correspondentes (Adams *et al.*, 2004). Esse processo garante a separação entre tamanho e forma de um mesmo conjunto em análise. Com esses dados, as variáveis de forma podem ser usadas para diversas análises estatísticas como, por exemplo, análise de componentes principais (PCA), análise multivariada da variância (MANOVA), análise de variáveis canônicas (VCA) e Função Discriminante.

Uma das principais vantagens da utilização da morfometria geométrica é a visualização dos pontos de maior variação na forma do corpo dos organismos comparados por meio de diagramas nas grades de deformação (*thin-plate spline* ou TPS) (Bookstein, 1991). Similarmente, as variações da forma entre os grupos estudados podem ser representadas pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), cuja distância dos ramos reflete o grau de similaridade entre os táxons. Esses dados visuais, quando associados com hipóteses filogenéticas e dados ecológicos, tornam-se ainda mais robustos e informativos (Catalano *et al.*, 2010; Schlick-Steiner *et al.*, 2010; Goloboff & Catalano, 2011).

Em peixes, a utilização dessa técnica tem sido ampla para estudos de variação intra e interespecíficas. Um dos grupos com alta complexidade morfológica, plasticidade fenotípica e modelo de radiação adaptativa que tem sido muito estudado por essa abordagem são os ciclídeos da América Central e dos grandes lagos africanos (Clabaut *et al.*, 2007; Stull *et al.*, 2014; Kavembe *et al.*, 2016). Eles fornecem a oportunidade de investigar as relações entre ecologia, diversidade morfológica e filogenia no processo de especiação, conforme exemplificado a seguir.

Em *Amphilophus citrinellus*, um complexo de espécies da Nicarágua, caracterizada por extenso polimorfismo trófico, a morfometria geométrica permitiu visualizar variação significativa entre os lagos sugerindo diferenciação local baseada em mecanismos genéticos e ecofenotípicos (Klingenberg *et al.*, 2003). No lago Tanganyika, o qual abriga mais de 200 espécies endêmicas de Cichlidae do Leste Africano, Clabaut *et al.* (2007) verificaram que os principais pontos de variação na forma do corpo entre as linhagens estão relacionados ao formato total do corpo, porção frontal da cabeça e do pedúnculo caudal. Ainda, os dados de PCA obtidos por esses autores sugerem que todas as tribos apresentam potencial para evoluir diferentes morfologias e que essas podem ser preditas por preferências alimentares e características ambientais, tais como profundidade do lago.

Em outros grupos de peixes, os dados de morfometria geométrica também tem se mostrado igualmente resolutivos. Esse foi o caso do estudo realizado por Bichuette *et al.* (2015) com *Rhamdiopsis krugi*, uma espécie troglófila de Siluriformes encontrado em cavernas na região da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. As grades de deformação geradas pela análise morfométrica mostraram variações significativas na forma do corpo entre as cinco populações comparadas. De acordo com esses autores, as barreiras geológicas e hidrológicas teriam isolado essas populações, permitindo o processo de especiação parapátrica.

Portanto, verifica-se que a morfometria geométrica tem contribuído significativamente para a separação de espécies intimamente relacionadas (Bichuette *et al.*, 2015). Contudo, deve-se ressaltar que características ambientais desempenham forte influência sobre a forma do corpo, principalmente em espécies que exibem alta plasticidade fenotípica, como por exemplo, os ciclídeos e os Loricarídeos, como o gênero *Hypostomus*. Desse modo, a análise da forma também infere a norma de reação da espécie sob as pressões de determinado ambiente, podendo assumir fenótipos distintos a despeito da similaridade genotípica.

2.5 DNA barcode

Como os caracteres morfológicos são diretamente afetados pela seleção e requerem um longo período de tempo para a fixação de mudanças significativas, acredita-se que a taxonomia do futuro esteja associada a dados de sequências de DNA (Dayrat, 2005; Gehara *et al.*, 2014).

Apesar do uso de sequências de DNA como ferramenta taxonômica não ser uma novidade, as primeiras publicações de taxonomia molecular em eucariotos surgiram somente a partir dos anos 2000 (Cook *et al.*, 2010). Em 2003, o pesquisador Paul Hebert e colaboradores da Universidade de Guelph, em Ontário, Canadá, propuseram a utilização de um gene

mitocondrial como sendo o fragmento gênico capaz de diferenciar e, portanto, delimitar a nível específico a maioria dos animais (Hebert *et al.*, 2003). Obviamente, essa proposta foi acompanhada por uma discussão ferrenha entre os defensores da taxonomia sistemática tradicional e os defensores da nova ferramenta (Prendini, 2005; Gregory, 2005; Silva-Brandão *et al.*, 2009; Cook *et al.*, 2010). O saldo positivo dessa discussão foi o refinamento das metodologias de DNA *barcode* e a criação de uma rede internacional dedicada a esse tópico, conforme exposto adiante.

Embora vários marcadores genéticos já tenham sido empregados para identificação taxonômica, a sequência mitocondrial mais comumente utilizada é a subunidade I do gene citocromo *c* oxidase (COI) (Teletchea *et al.*, 2009; Ward, 2009; Bucklin *et al.*, 2011). Assim, Hebert *et al.* (2003) elegeram um fragmento de cerca de 650 pares de bases do COI para o DNA *barcode* por: (1) possuir uma alta taxa de mutação; (2) ter sido previamente testado em inúmeros estudos para a maioria dos grupos animais, disponibilizando assim conjuntos de *primers* universais para amplificar essa região; (3) apresentar melhores resultados filogenéticos em relação aos genes ribossomais 12S e 16S e (4) ser mais eficaz em categorizar taxonomicamente os indivíduos. Além desses fatores, destacam-se a herança materna e número haploide por se tratar de DNA mitocondrial, o que diminui as chances de recombinação (Hebert *et al.*, 2004b).

Etimologicamente, esse método foi denominado DNA *barcode* por ser análogo à identificação de produtos por códigos de barras. A combinação de nucleotídeos nesse fragmento gênico permite a identificação única da espécie como resultado de acúmulo de mutações, gerando sequências exclusivas ao longo da especiação (Hebert *et al.*, 2004b; Ward *et al.*, 2009). Para discriminar espécies aparentemente similares, a metodologia parte do fundamento de que a variação genética intraespecífica é significativamente menor que a interespecífica (Hebert *et al.*, 2004b). Essa ausência de sobreposição entre a variação intra e interespecífica cria o “*barcode gap*”, levando à distinção dos táxons (Hebert *et al.*, 2004b; Ward *et al.*, 2009).

Motivados pelo sucesso em diferentes organismos, os pesquisadores criaram, em 2004, uma organização internacional dedicada ao desenvolvimento de DNA *barcode* como padrão global para a identificação de espécies, denominada *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL). Esse consórcio atua através de grupos de trabalho, redes, workshops e conferências para divulgação e treinamento em estudos de DNA *barcode*, contando hoje com mais de 200 organizações de 50 países, com escritório localizado na Secretaria do Museu Nacional do

Instituto Smithsonian de História Natural, em Washington, DC (<http://www.barcodeoflife.org>).

Para atender o objetivo de disponibilizar os resultados de identificação a nível específico (particularmente de grupos animais) em todo o mundo, foi ainda necessário desenvolver um banco de dados global. Desse modo, em 2007, foi lançada a plataforma pública e gratuita *The Barcode of Life Data System* (BOLD) para auxiliar na aquisição, armazenamento, análise e publicação de sequências de DNA de todos os organismos eucariotos, com equipe de suporte para todas as fases de análise das sequências (Ratnasingham & Hebert, 2007). Uma vez depositadas no banco de dados *online*, as sequências poderiam ser comparadas com novas sequências, gerando um *feedback* positivo que facilitaria a identificação de espécies novas e mesmo espécies crípticas (Hebert *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2009).

Em 2010, na tentativa de acelerar de forma organizada a descoberta da biodiversidade por meio da metodologia de DNA *barcode*, foi lançado o projeto iBOL (*International Barcode of Life*) que conta com a participação de 25 países.

Em sua primeira fase (2010-2015), o objetivo desse projeto era elaborar uma biblioteca de referência de DNA *barcode*, com cerca de cinco milhões de espécimes entre 500.000 espécies. Outras perspectivas do iBOL incluem a construção de modelos que permitam simulações de situações reais como a conservação, monitoramento de ecossistemas, controle de pragas agrícolas e de espécies invasoras (<http://www.barcodeoflife.org>). A partir daí, outras parcerias foram estabelecidas com vários projetos mais específicos em andamento, como por exemplo: *Mosquito Barcoding Initiative* (MBI) e *Fish Barcode of Life* (FISH-BOL) em 2005; *Mammal Barcode of Life* em 2008; *DNA Barcoding of Marine Biodiversity* (MarBOL) e *Lepidoptera Barcode of Life* em 2009; *Bee Barcode of Life Initiative* (Bee-BOL) e *Coral Reef Barcode of Life* em 2010; *Fungal Barcoding Database* em 2011, entre outros.

No caso dos peixes, merece destaque o *Fish Barcode of Life Initiative* (FISH-BOL) lançado em 2005 com a tarefa hercúlea de padronizar e analisar os dados de DNA *barcode* para peixes de todo o mundo (Ward *et al.*, 2009). Em julho de 2010, esse banco de dados englobava sequências de COI de 7.800 espécies, o que representa cerca 25% do total de peixes descritos, com pelo menos uma espécie de 89% das famílias conhecidas (Becker *et al.*, 2011). Já em 2012, 98% e 93% das espécies marinhas e dulcícolas tinham registro no banco de dados (Ward, 2012). Entre as muitas vantagens previstas desse sistema padronizado, destacam-se a possibilidade de identificação de espécies de peixes em estágios iniciais de

desenvolvimento como ovos e larvas (Burghart *et al.*, 2014) e detecção de fraudes em produtos de pescado (*e.g.*, Brito *et al.*, 2015).

O êxito do FISH-BOL foi favorecido pela disponibilidade de *primers* universais para amplificar o COI em peixes e a distância genética encontrada entre sequências de diferentes espécies em relação àquela verificada dentro de um mesmo táxon, garantindo o *barcode gap* (Ivanova *et al.*, 2007). Como premissa do *barcode gap*, considera-se que a divergência entre duas espécies seja pelo menos 10 vezes maior do que a variação intraespecífica (Hebert *et al.*, 2004a; b). Partindo desse pressuposto e com o banco de dados disponíveis para ictiofauna, foi verificado que diferenças genéticas iguais ou superiores a 2% usualmente correspondem a diferenças interespecíficas em peixes marinhos e de água doce (Ward *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2015).

Porém, os percentuais de divergência podem variar entre espécies a depender do gênero ou família em estudo e a utilização de valores fixos pode representar uma simplificação errônea da diversidade nas sequências de COI em peixes. Por exemplo, alguns estudos demonstram altos valores de divergência tanto intra como interespecífica (5 a 10%) em ictiofauna de bacias brasileiras (April *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2011). Por outro lado, o *barcode gap* pode ser menor que o estabelecido ou mesmo ausente em espécies com separação genética recente (Karanovic *et al.*, 2015).

Outros fatores que dificultam a análise do DNA *barcode* incluem: identificação inadequada das espécies *a priori* (Becker *et al.*, 2011), a inadequação do *Neighbor-Joining* (NJ) como método de distância padrão em COI, podendo gerar topologias pouco resolutivas ou incorretas, além de problemas na interpretação do *barcode gap* (Goldstein & De Salle, 2011; Collins & Cruickshank, 2013). Em contrapartida, argumenta-se que o uso do método de NJ não se destina a recuperar relações filogenéticas, mas para auxiliar a descoberta de novas espécies (Pires & Marinoni, 2010). Adicionalmente, outros métodos disponíveis em plataformas *online* têm sido incorporados às análises de DNA *barcode*, garantindo a melhor confiabilidade dos dados tais como o sistema de BINs, ABGD, GMYC e bPTP (Barreto *et al.*, 2015).

Os BINs ou *Barcode Index Numbers* representam uma ferramenta disponível gratuitamente na plataforma BOLD, que permite indicar unidades taxonômicas operacionais distintas (OTUs) que correspondem a espécies usando o algoritmo RESL (*Refined Individual Linkage*) (Ratnasingham & Hebert, 2013). Assim, sequências de diferentes bibliotecas de COI geradas por diversos pesquisadores compartilham o mesmo BIN se forem geneticamente muito

similares ou idênticas, indicando que pertencem à mesma espécie. Por sua vez, o ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) utiliza o *barcode gap* para sugerir o número de táxons presentes em um banco de dados (Puillandre *et al.*, 2012) a partir da inclusão das sequências de COI em plataforma também gratuita (<http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>, web version 'October 28 2014').

O GMYC (*General Mixed Yule-Coalescent analysis*) utiliza o método coalescente de Yule, o qual requer uma árvore filogenética ultramétrica com taxa evolutiva definida a partir da qual são identificados possíveis agrupamentos (OTUs) por meio de mudanças na taxa de ramificação na árvore de entrada (Esselstyn *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2013; Fujisawa & Barraclough, 2013). Como desvantagem, esse método demanda um elevado tempo de análise computacional a depender do tamanho do conjunto de dados.

A análise bPTP (*Bayesian Poisson Tree Process*) tem o objetivo de delimitar espécies a partir de uma árvore filogenética de máxima verossimilhança enraizada, na qual o tamanho dos ramos significa o número de substituições de nucleotídeos. Após o processo, os ramos da árvore de entrada recebem valores de suporte de inferência Bayesiana, tornando o resultado ainda mais confiável devido ao método exaustivo de busca das árvores prováveis (Zhang *et al.*, 2013). Como a máxima verossimilhança utiliza método cladístico para inferir características ancestrais reconstruindo a árvore de acordo com alguma premissa evolutiva e a inferência Bayesiana explora a distribuição *a posteriori* dos parâmetros (Schneider, 2007), a união desses métodos potencializa a busca dos agrupamentos (OTUs) mais prováveis.

Essas novas ferramentas metodológicas nas análises de DNA *barcode* geralmente fornecem resultados congruentes e tem sido eficazes na descoberta de muitas espécies de peixes (Gomes *et al.*, 2015). Exemplificando, a aplicação do GMYC em associação com estudo dos BINs permitiu delimitar espécies do gênero *Rineloricaria* (Costa-Silva *et al.*, 2015) a despeito da baixa diferenciação genética entre linhagens crípticas ao lado de espécies altamente divergentes (8,5%).

Corroborando a importância desses métodos no DNA *barcode*, o número de espécies corretamente identificadas de peixes entre 2007 e 2008 aumentou de 388 para 5.334, representando uma média de 5,46 indivíduos por espécie de diferentes ordens (Ward *et al.*, 2009). Atualmente, a plataforma BOLD inclui sequências de DNA *barcode* de mais de 4 milhões de espécimes, totalizando 251.000 espécies. Desse total, cerca de 235 mil espécimes são representantes de peixes, correspondentes a mais de 16 mil espécies.

Embora recentes, os esforços de pesquisadores brasileiros na iniciativa de DNA *barcode* (BR-BOL, lançado em 2010) revelaram especiação críptica em vários grupos de peixes de água doce da região Neotropical, gerando maior precisão na avaliação da biodiversidade (Melo *et al.*, 2011). Somente na ictiofauna da bacia do Alto Paraná, essa abordagem identificou seguramente 99,2% de 254 espécies e revelou divergências genéticas intraespecíficas compatíveis com novos táxons a serem descritos (Pereira *et al.*, 2013). Resultados similares foram obtidos para a ictiofauna das bacias do São Francisco (Carvalho *et al.*, 2011), Paraíba do Sul (Pereira *et al.*, 2011) e Mucuri (Gomes *et al.*, 2015) com variação intra e interespecífica de 0,5% a 10,6%. De fato, a literatura aponta valores de divergência genéticas variando de $\leq 0,73\%$ intraespecífica para $\geq 6,8\%$ interespecífica para ictiofauna da América do Norte e da região Neotropical (April *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2011) sugerido assim que muitas das espécies dessas regiões fogem à regra do valor de corte estabelecido para o DNA *barcode* (Day *et al.*, 2013).

Adicionalmente, Pereira *et al.* (2013) analisaram 254 espécies de peixes de ocorrência em toda região Neotropical e encontraram valores de divergência média intraespecífica de 0,3% e interespecífica de 6,8%, chegando ao valor máximo de 24,9% de divergência em congêneres. Com peixes amazônicos do gênero *Nannostomus*, verificou-se altos valores de divergência congênica (~19%) e coespecífica (3%). No entanto, entre duas espécies nominais desse gênero observou-se baixo valor interespecífico (2,2%) indicando assim um possível caso de especiação recente ou mesmo a necessidade de sinonimização, visto que os caracteres morfológicos que diagnosticam a validação das espécies sofrem sobreposição (Benzaquem *et al.*, 2015).

Especificamente em relação aos Siluriformes, há mais de 14 mil espécimes com dados de *barcode* disponíveis, representando 1.492 espécies, sendo que mais de 3.400 das sequências de COI pertencem à família Loricariidae. Por sua vez, o gênero *Hypostomus* é representado por 517 espécimes pertencentes a 41 espécies (<http://www.boldsystems.org/>). No entanto, não há depósito de sequências para espécies desse gênero da região Atlântico Leste, com clara predominância de espécies da bacia do Alto Paraná e algumas do rio São Francisco.

Em geral, a divergência genética entre espécies de Siluriformes parece ser mais baixa que aquela verificada em outros grupos de peixes, sugerindo que o critério de 2% para distinção interespecífica possa ser errôneo. Por exemplo, a distância genética entre as espécies de *Hypostomus* do Brasil já estudadas com base no gene COI varia entre 0% e 5%, com média de 3% (Anexo 1), enquanto que a distância intraespecífica varia de 0% a 1%, com os valores de

1% sendo encontrados em espécies mais amplamente distribuídas como *H. hermanni*, *H. regani* e *Hypostomus* sp. do Alto Paraná. Do mesmo modo, a divergência nas sequências do citocromo b (cyt b) e COI entre espécies do gênero *Synodontis* na África do Sul variou de 1% a 2% e de 0,7% a 2,1% respectivamente (Day *et al.*, 2013).

Recentemente, o DNA *barcode* foi aplicado para analisar populações do gênero *Pterygoplichthys*, introduzidas na Índia por meio do comércio de peixes ornamentais Neotropicais, as quais tem causado inúmeras consequências ecológicas e econômicas. As divergências genéticas entre as sequências das amostras indianas e as prováveis espécies com dados no GenBank variaram de 0,07% a 3%, não permitindo a identificação taxonômica das espécies invasoras (Bijukumar *et al.*, 2015). No entanto, os autores ressaltam que a ausência de diferenças genéticas das populações invasoras pode indicar hibridação na criação em aquários.

Portanto, a utilização de ferramentas moleculares, principalmente para espécies que apresentam um grande complexo na identificação taxonômica, deve ser preferencialmente acompanhada de outras técnicas para corroborar a descrição ou identificação precisa da espécie (Bichuette *et al.*, 2015).

2.6 Citogenética e Citotaxonomia

Tradicionalmente, a biodiversidade vem sendo descrita com base em caracteres morfológicos e, mais recentemente, a partir de dados moleculares (Hebert *et al.*, 2003; 2004a; b entre outros). Contudo, a dificuldade crescente em reconhecer espécies, particularmente entre grupos de divergência recente (Bittner *et al.*, 2010), exige a inclusão de abordagens cada vez mais diversificadas e integradas. Nesse sentido, o estudo citogenético pode ser uma fonte de dados importantes para auxiliar questões taxonômicas (Peres *et al.*, 2012; Pires & Marinoni, 2010).

A citogenética é a ciência que estuda os cromossomos e, portanto, todo o material genético nuclear (Affonso *et al.*, 2007). A análise citogenética envolve o conhecimento do número, forma, organização molecular e comportamento dos cromossomos durante a divisão celular, permitindo inferir sobre a evolução de animais e plantas (Kasahara, 2009; Cioffi, 2010).

O grande impasse para essa técnica era a obtenção de quantidade suficiente de células em metáfase (quando os cromossomos estão mais condensados e individualizados) para a contagem e visualização dos cromossomos. Porém, a introdução da colchicina (alcalóide que impede a segregação anafásica, mantendo as células em divisão no estágio de metáfase), da solução hipotônica e de fixadores mais eficientes na década de 50, assegurou que os estudos

cromossômicos fossem aprimorados (Kasahara, 2009). A partir de então, os pesquisadores podiam identificar de forma confiável diferenças cromossômicas entre indivíduos, populações e espécies, determinando características do cariótipo tais como número e morfologia dos pares de cromossomos em espécies diplóides.

Ademais, diferenças no cariótipo são capazes de determinar isolamento reprodutivo, seja pela incompatibilidade de gametas ou pelos efeitos sobre a fertilidade, constituindo um evento relevante para o processo de diferenciação entre espécies (Coghlan *et al.*, 2005; Allendorf & Luikart, 2007). Nesse contexto, as análises cariotípicas comparadas permitem detectar rearranjos cromossômicos relacionados à presença de unidades evolutivas únicas, gerando marcadores para citotaxonomia (Maurutto *et al.*, 2012). Adicionalmente, as análises moleculares baseadas em DNA não podem substituir a análise cromossômica (Allendorf & Luikart, 2007) visto que a citogenética permite analisar a macro-organização do material nuclear ao passo que a análise do DNA é realizada, em geral, a partir de um ou poucos loci. Apesar dessas potencialidades e do baixo custo das análises citogenéticas (Guerra, 2004 e 2012), é notável o aparente descaso dos estudos com cromossomos em projetos de conservação e estudos da biodiversidade, conforme apontado por Allendorf & Luikart (2007).

Ainda assim, as análises citogenéticas tem contribuído significativamente para o conhecimento da biodiversidade de peixes (Artoni *et al.*, 2000), reconhecidos como o grupo de vertebrados com maior número de dados cariotípicos (Arai, 2011). Sob o ponto de vista taxonômico, inúmeros casos de complexos de espécies e espécies crípticas em peixes já foram identificados por diferenças cromossômicas (Bitencourt *et al.*, 2011a; Bueno *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2016).

Na ictiofauna da região Neotropical, os estudos citogenéticos são igualmente promissores (Maurutto *et al.*, 2012; Bueno *et al.*, 2013). Mesmo a aplicação de técnicas tradicionais de bandamento cromossômico tem sido úteis para diferenciar os táxons (Almeida-Toledo *et al.*, 2000). Esses métodos incluem o bandamento C para detectar regiões heterocromáticas, impregnação com nitrato de prata para revelar sítios ativos de regiões organizadores de nucléolos (Ag-RONs), ou a aplicação de endonucleases de restrição e fluorocromos base-específicos para analisar a composição de regiões repetitivas (Bitencourt *et al.*, 2011a, b).

Entre os grupos taxonomicamente controversos nos quais as informações citogenéticas foram importantes para sinalizar novas espécies podemos destacar o gênero *Axyanax*, amplamente distribuído e com vários casos de morfologia críptica, mas cromossomicamente diversos (Medrado *et al.*, 2012; Giongo *et al.*, 2014; Medrado *et al.*, 2015). Outro exemplo

notável são as traíras do grupo *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). Pelo menos sete cariomorfos (formas cariotípicas distintas entre indivíduos ou populações), com sistemas sexuais variados, foram identificados em bacias da América do Sul, sem evidências de hibridação, mesmo quando em simpatria (Bertollo *et al.*, 2000).

No caso de *Hypostomus*, a acentuada diversidade morfológica e a ampla distribuição geográfica das espécies também são acompanhadas por marcante variação citogenética, incluindo registros em bacias de rios costeiros da Bahia (Bitencourt *et al.*, 2011a, b, 2012). O menor número cromossômico diplóide registrado para esse gênero é de $2n=52$ em *H. emarginatus* (Artoni & Bertollo, 2001). Porém, o registro de um único indivíduo e a falta de informação de localização de coleta e características morfológicas do exemplar geram dúvidas sobre a identificação taxonômica dessa espécie. Assim, sugere-se que o número cromossômico em *Hypostomus* varie de $2n=64$ (*H. cochliodon*) (Bueno *et al.*, 2012), a $2n=84$ em *Hypostomus* sp. 2 da bacia hidrográfica do rio Paraguai (Cereali *et al.*, 2008). No entanto, o número diplóide considerado basal ainda é questionável, sendo $2n=64$ o menor valor (Bueno *et al.*, 2012), enquanto que para algumas espécies do sistema amazônico o número base varia de $2n=66$ a $2n=68$ (Oliveira *et al.*, 2015).

Aparentemente, o número diplóide mais frequente para o gênero é de $2n=72$ (Becker *et al.*, 2014). Porém, as populações e espécies de *Hypostomus* das bacias do rio de Contas e Recôncavo Sul compartilham $2n=76$ com diferenças macro e microestruturais entre populações mesmo dentro de uma mesma bacia (Bitencourt *et al.*, 2011a, b, 2012).

Esses dados mostram que a combinação de diferentes métodos é potencialmente útil para estimar a riqueza de espécies de um grupo taxonomicamente controverso tal como o gênero *Hypostomus* das bacias do Atlântico Leste.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Estimar e identificar a riqueza de espécies do gênero *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) nas bacias hidrográficas costeiras da Bahia a partir da integração de dados morfológicos e genéticos.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar se as diferenças morfológicas e morfométricas interindividuais e interpopulacionais de *Hypostomus* em rios costeiros do estado da Bahia são compatíveis com a presença de espécies ou unidades evolutivas distintas dentro e entre as bacias amostradas;
- Testar a eficácia do DNA *barcode* e análises cromossômicas para a resolução de incertezas taxonômicas e definição de unidades evolutivas únicas ou espécies crípticas;
- Estimar a diversidade e auxiliar na taxonomia do gênero *Hypostomus* na região do Atlântico Leste por meio de análises comparativas;
- Auxiliar na elaboração de projetos de manejo de bacias hidrográficas costeiras da Bahia, identificando áreas prioritárias para a conservação com riscos de perda da biodiversidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de material biológico

As localidades de coleta apresentaram características ambientais muito similares, exceto pela condição de preservação da mata ciliar (Tabela 1). Foram amostradas seis das bacias hidrográficas da região Atlântico Leste, nas quais foram coletados 217 espécimes (Tabela 2) do gênero *Hypostomus* dos rios de Contas, Preto do Criciúma, Preto do Costa, Vieira, Pedras, Mutum, Gongogi e Oricó (bacia do Rio de Contas), Itapicuru (bacia do rio Itapicuru), Una, Jequiriçá e Serra (bacia do Recôncavo Sul), Paraguaçu, Una (bacia do rio Paraguaçu), Pardo (bacia do rio Pardo), Una, Braço, Almada e Cachoeira (bacia do Leste) (Figura 5), utilizando tarrafas e puçás.

As licenças para coleta de material ictiológico foram concedidas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO; número da licença: 46680-1). Para evitar viés na identificação e análise de dados, todos os exemplares foram registrados como *Hypostomus* sp. antes das análises propostas.

As análises morfométricas incluíram praticamente todos os espécimes coletados, exceto aqueles menores que 8,0 cm por dificultar o estabelecimento preciso dos marcos e semimarcos anatômicos. Assim, um espécime da localidade rio Una/Leste utilizado na análise molecular foi retirado da análise morfométrica, por apresentar tamanho corporal de 4,3 cm.

Para as análises moleculares, foram escolhidos, ao acaso, até seis exemplares por morfotipo. Os espécimes das localidades rio Una/Valença, rio Mutum e rio Oricó, foram incluídos apenas na análise molecular por se tratar de banco de tecido prévio. Para os espécimes do rio Itapicuru havia banco de tecido e material para análise citogenética fixado e a classificação taxonômica dos mesmos foi sugerida conforme Sardeiro (2012) e Pitanga (2015).

No caso daquelas localidades sem dados citogenéticos prévios (Bitencourt *et al.*, 2011a, b, 2012), foram escolhidos alguns exemplares (Tabela 2) para a obtenção de cromossomos mitóticos e aplicação de técnicas tradicionais de bandamento.



Figura 5. Mapa da Bahia com localização e vista parcial dos pontos de coleta (A-T): A- rio Itapicuru; B- rio Paraguaçu (Iaçu-BA); C- rio Paraguaçu (Itaetê-BA); D- rio Una/bacia do Paraguaçu; E- rio Jequiriçá; F- rio Una/bacia do Recôncavo Sul; G- rio da Serra; H- rio Mutum; I- rio Preto do Costa; J- rio das Pedras; K- rio Preto do Criciúma; L- rio de Contas (leito principal) – Jequié-BA; M- rio Oricó; N- rio Vieira; O- rio Gongogi; P- rio Almada; Q- Rio Cachoeira; R- rio Una/bacia do Leste e S - rio Pardo.

Tabela 1. Caracterização dos pontos de coleta de *Hypostomus* spp. em bacias costeiras da Bahia.

Bacia	Rio*	Coordenadas	Tipo de fundo	Profundidade	Mesohabitats	Mata ciliar	Entorno
Contas	Rio Preto do Criciúma	S -13.959557° W -39.965172°	Areia e rocha	~40–120 cm	Corredeira e poção	Degradada	Cabruca
	Rio das Pedras	S -13.734716° W -39.854622°	Areia e rocha	~20–60 cm	Corredeira	Degradada	Cabruca
	Rio de Contas	S -13.882912° W -40.055809°	Areia e rocha	~40–120 cm	Rio corrente	Ausente	Gramínea
	Rio Vieira	S -14.143733° W -40.103531°	Areia, argila e rocha	~40–150 cm	Corredeira	Degradada	Mata e gramínea
	Rio Preto do Costa	S -13.95989° W -39.886293°	Areia, argila e rocha	~30–140 cm	Corredeira e poção	Ausente	Gramínea
	Rio Gongogi	S -14.459781° W -39.917622°	Areia e rocha	~60–160 cm	Corredeira	Degradada	Mata e gramínea
	Rio Mutum	S -13.570574° W -40.407372°	Areia e rocha	~40–80 cm	Rio corrente	Ausente	Gramínea
Recôncavo Sul	Rio Oricó	S -14.163541° W -39.353371°	Areia, argila e rocha	~40–120 cm	Rio corrente e poção	Degradada	Cabruca
	Rio da Serra	S -14.200942° W -39.151789°	Areia, seixo e rocha	~60–150 cm	Corredeira e poção	Preservada	Mata Atlântica
	Rio Jequiriçá	S -13.234765° W -39.522972°	Areia, argila e rocha	~40–160 cm	Corredeira	Ausente	Gramínea
	Rio Una - Valença	S -13.34152° W -39.125061°	Areia, argila e rocha	~40–100 cm	Corredeira	Ausente	Gramínea
Pardo	Rio Pardo	S -15.362836° W -40.124077°	Areia e rocha	~30–250 cm	Rio corrente e poção	Ausente	Gramínea
Leste	Rio Una – Leste (p1)	S -15.087704° W -39.346247°	Areia e rocha	~40–100 cm	Rio corrente e poção	Ausente	Gramínea
	Rio Una – Leste (p2)	S -15.292309 W -39.101009	Areia e rocha	~30–150 cm	Corredeira e poção	Preservada	Mata Atlântica
	Rio Almada	S -14.70549° W -39.180508°	Areia e rocha	~80–120 cm	Corredeira	Degradada	Cabruca
	Rio Cachoeira	S -14.857196° W -39.689505°	Areia, argila e rocha	~30–110 cm	Corredeira e poção	Degradada	Gramínea
	Rio Una - Iguaçú	S -12.936976° W -41.06492°	Areia e rocha	~30–150 cm	Rio corrente e poção	Degradada	Mata e gramínea
Paraguaçu	Rio Paraguaçu – Itaeté	S -12.978527° W -40.959735°	Areia e rocha	~30–100 cm	Corredeira	Ausente	Gramínea
	Rio Paraguaçu – Iaçú	S -12.770024° W -40.335563°	Areia e rocha	~80–300 cm	Poção e corredeira	Degradada	Mata e gramínea
Itapicuru	Rio Itapicuru	S -11.06478° W -38.840816°	Areia e rocha	~40–120 cm	Corredeiras	Ausente	Gramínea

*Em negrito, está indicado o rio principal da bacia.

Tabela 2. Número de espécimes de *Hypostomus* spp. coletados em bacias hidrográficas da Bahia de acordo com o método de análise.

Bacia	Rio	Morfotipo	DNA barcode	Morfometria	Citogenética
Contas	Rio Preto do Criciúma, rio das Pedras, rio Preto do Costa e rio Mutum	<i>Hypostomus</i> sp. n. 1	10	56	-
	Rio Gongogi, rio Vieira, rio de Contas e rio Oricó	<i>H. aff. wuchereri</i>	13	49	-
Recôncavo Sul	Rio da Serra e rio Una	<i>H. unae</i>	9	19	5
Pardo	Rio Jequiriçá	<i>H. jaguar</i>	3	22	6
	Rio Pardo	<i>H. unae</i>	4	26	5
Leste	Rio Una	<i>H. unae</i>	1	-	-
	Rio Almada	<i>H. brevicauda</i>	3	1	3
Paraguaçu	Rio Cachoeira	<i>H. wuchereri</i>	3	7	3
	Rio Paraguaçu e rio Una	<i>H. jaguar</i>	7	24	6
	Rio Paraguaçu	<i>H. chrysostiktos</i>	4	12	5
Itapicuru	Rio Itapicuru	<i>Hypostomus</i> sp. n. 2	3	-	3
TOTAL			60	217	39

A eutanásia dos indivíduos amostrados foi realizada por imersão em água gelada até a interrupção dos movimentos operculares, segundo Blessing *et al.* (2010). Todos os experimentos descritos a seguir bem como o procedimento de eutanásia foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UESB (processo CEUA/UESB n° 32/2013).

Todos os exemplares foram fotografados (nas vistas dorsal, lateral esquerda e ventral) logo após a coleta. Um fragmento de tecido muscular foi retirado para análise molecular e armazenado em álcool absoluto e condicionado a -20°C. Para as análises citogenéticas, foram utilizados fragmentos do rim anterior após estimulação mitótica, conforme descrito no item 4.4.

Os espécimes foram fixados em formalina a 10% e depositados na coleção ictiológica do Instituto Nacional da Mata Atlântica (INMA) em Santa Teresa – ES sob a responsabilidade da Dra. Luisa Maria Sarmiento-Soares.

4.2 Análises morfométricas

As faces dorsal e lateral esquerda de cada espécime foram fotografadas com câmera digital Canon, enquanto a vista ventral foi escaneada em Impressora multifuncional HP (600 dpi). Todas as imagens foram acompanhadas de escala métrica. Posteriormente, as imagens foram convertidas da extensão JPEG para o formato TPS através do *software* TPSUtil (Rohlf, 2013).

Em seguida, foram inseridos marcos anatômicos utilizando o *software* TPSDig2 (Rohlf, 2013) para a mensuração dos indivíduos (Figura 6). Para a vista dorsal, foram definidos 12 marcos anatômicos do tipo I e oito semimarcos. Para a vista ventral foram usados 10 marcos anatômicos tipo I e sete semimarcos. No caso da vista lateral esquerda, 12 marcos anatômicos do tipo I e seis semimarcos foram selecionados (Tabela 3).

Os pontos inseridos foram ajustados por meio da sobreposição de Procrustes (Rohlf & Slice, 1990). As análises de Componentes Principais (PCA) e Função Discriminante foram realizadas para avaliar a variação da forma dentro e entre as localidades no programa MorphoJ v. 2.0 (Klingenberg, 2011).

A similaridade entre os morfotipos foi verificada por meio da análise de agrupamento por UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*) com 10.000 permutações, no programa PAST v. 2.17c (Hammer *et al.*, 2001). A confiabilidade do agrupamento foi testada por meio da análise de correlação cofenética.

A análise de regressão foi utilizada para verificar se a forma varia em função do tamanho dos indivíduos.

A classificação dos morfotipos quanto à forma do corpo foi verificada através da análise discriminante e validação cruzada no *software* Statistics R.

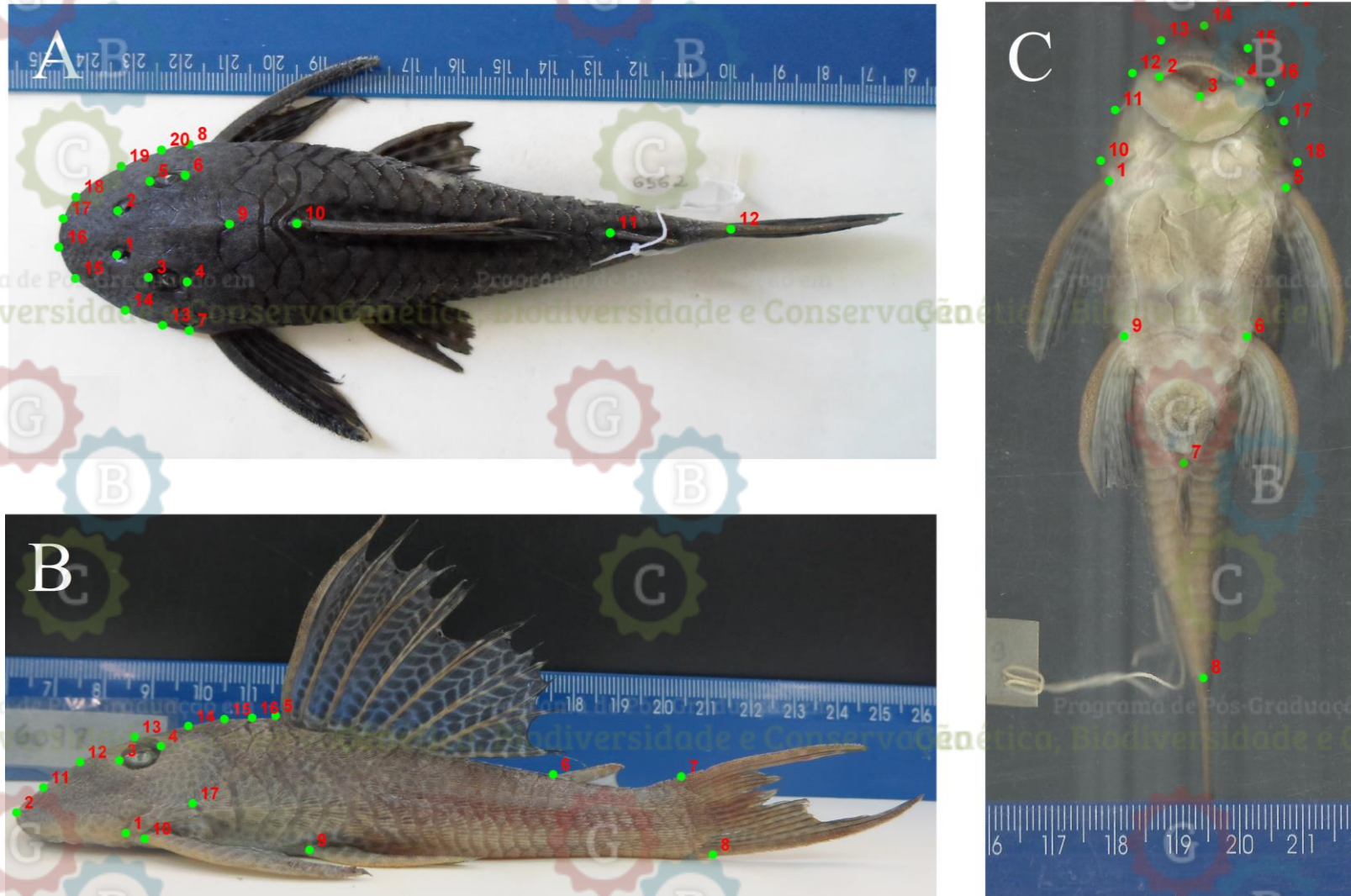


Figura 6. Imagens dos espécimes de *Hypostomus* sp. de bacias costeiras da Bahia com identificação dos marcos e semimarcos utilizados para as análises morfométricas. A- vista dorsal, B- vista lateral esquerda e C- vista ventral.

Tabela 3. Marcos anatômicos inseridos em cada vista analisada de espécimes de *Hypostomus* spp. de bacias costeiras da Bahia.

Vista Dorsal	Vista Lateral esquerda	Vista ventral
1-narina esquerda	1-borda esquerda do opérculo	1-inserção da nadadeira peitoral esquerda
2-narina direita	2-focinho	2-extremidade bucal esquerda
3-borda externa do olho esquerdo	3-borda externa do olho esquerdo	3-fenda inferior entre as placas de odontóides
4-borda interna do olho esquerdo	4-borda interna do olho esquerdo	4-extremidade bucal direita
5-borda externa do olho direito	5-inserção da nadadeira dorsal	5-inserção do espinho da nadadeira peitoral direita
6-borda interna do olho direito	6-inserção da nadadeira adiposa	6-inserção do espinho da nadadeira peitoral direita
7-borda esquerda do opérculo	7-extremidade da última placa superior anterior à nadadeira caudal	7-inserção da nadadeira anal
8-borda direita do opérculo	8-extremidade da última placa inferior anterior à nadadeira caudal	8-início da última placa anterior à nadadeira caudal
9-extremidade da placa supraoccipital	9-inserção da nadadeira pélvica esquerda;	9-inserção da nadadeira peitoral esquerda
10-inserção da nadadeira dorsal	10-inserção da nadadeira peitoral;	10-borda esquerda da placa opercular
11-inserção da nadadeira adiposa	Semimarcos 11, 12, 13, 14, 15, 16 (contorno da cabeça)	14-extremidade do focinho
12-extremidade da última placa anterior à nadadeira caudal	Semimarco 17-reentrância da placa maior superior ao opérculo	18-borda direita da placa opercular
Semimarcos 13, 14, 15, 18, 19 e 20 (contorno da cabeça); 16 e 17(focinho).		Semimarcos 11; 12; 13, 15, 16 e 17 (contorno da cabeça).

4.3 Análises moleculares

4.3.1 Extração de DNA total

Amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de porções de tecido fixadas em etanol absoluto, utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega) de acordo com instruções do fabricante. Em seguida, as amostras de DNA foram coradas com azul de bromofenol e GelRed (Biotium) na proporção de 3:1 e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, a 110V por 25 minutos. As bandas de DNA foram visualizadas e fotodocumentadas com o sistema de captura L-PIX (Loccus Biotecnologia) sob luz UV para avaliação qualitativa e quantitativa do DNA extraído (Figura 7).

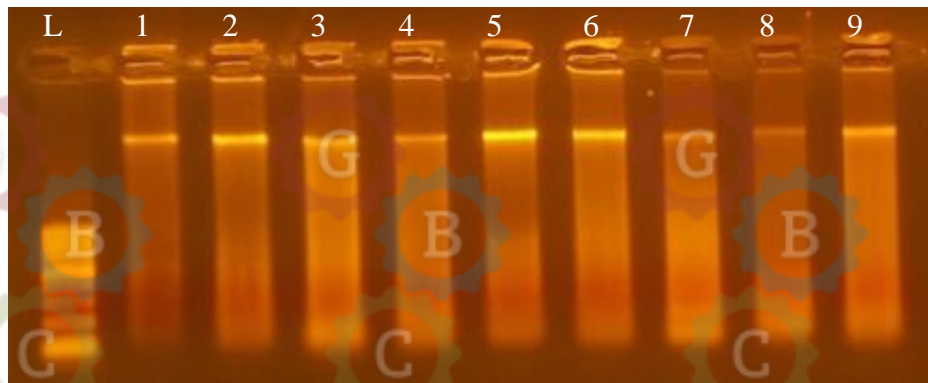


Figura 7. Visualização do DNA total extraído de amostras de *Hypostomus* sp. (1 a 9) em gel de agarose 1%, revelando a integridade e alta concentração de DNA pela presença de bandas nítidas. A letra L indica o marcador de peso molecular de 100pb.

4.3.2 Amplificação da região de interesse

Os fragmentos do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase subunidade I (COI) foram amplificados por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando os *primers* VF1_t1 5'-TGTAACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCACAAAGACATTGG-3' (Ivanova *et al.*, 2006) e VR1_t1 5'-CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3' (Ward *et al.*, 2005).

Cada reação de PCR foi realizada com um volume final de 12 μ L contendo 1,5 μ L de tampão da PCR 1x; 0,7 μ L de $MgCl_2$ (50mM); 0,3 μ L de dNTP (10mM); 0,25 μ L de cada *primer* (10 μ M); 0,2 μ L de *platinum®* Taq DNA polimerase (5 U/ μ L); 7,8 μ L de água ultrapura e 1,0 μ L de DNA molde (com concentração de 50 a 100 ng/ μ L).

A amplificação foi realizada em termociclador Veriti (Applied Biosystems, USA) com a seguinte programação: 94°C por 4 minutos prosseguindo com 10 ciclos de 95°C por 20 segundos, 50°C por 40 segundos e 72°C por 2 minutos, seguidos de 30 ciclos de 95°C por 20 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e meio, mais uma extensão final por 10 minutos a 72°C.

Uma parte dos produtos de PCR foi corada com 3 µl de azul de bromofenol: Gel Red (Biotium) (3:1), inserida em gel de agarose 1% e submetida à eletroforese a 90 V por 15 minutos. As bandas referentes ao fragmento de COI (em torno de 600 pb) foram visualizadas e fotodocumentadas com o sistema de captura L-PIX (Loccus Biotecnologia) sob luz UV (Figura 8).

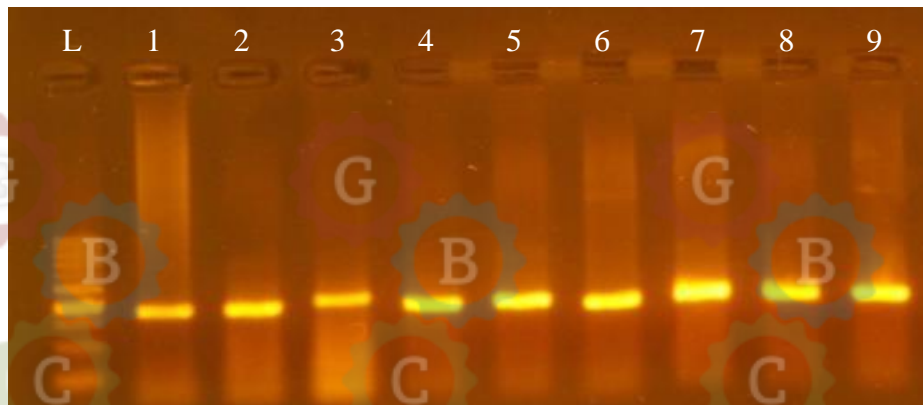


Figura 8. Gel de agarose a 1% revelando o perfil de amplificação do COI em amostras de *Hypostomus* sp. (1-9) com os primers VF1-t1 1/VR1-t1 1. A letra L indica o marcador de peso molecular de 100pb.

4.3.3 Sequenciamento de DNA

Após a confirmação da amplificação do fragmento de COI, foi realizada a reação de sequenciamento de acordo com o método de dideoxynucleotídeos terminais (Sanger *et al.*, 1977) com o kit *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, USA), seguindo as instruções do fabricante. A reação teve volume final de 10 µL, contendo 2 µL de tampão 5x, 0,5 µL de *Big Dye*, 1 µL de *primer* (10 µM), 5,5 µL de água ultrapura e 1 µL do produto de DNA amplificado. As amostras foram então sequenciadas bidireccionalmente em sequenciador automático ABI 3500 XL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, USA), disponível na PUC Minas - Coração Eucarístico em Belo Horizonte, sob a supervisão do professor Dr. Daniel Cardoso de Carvalho.

4.3.4 Análise das sequências

As sequências *forward* e *reverse* obtidas foram visualizadas e editadas utilizando o programa *DNA Baser Sequence Assembler* v. 4.16 (Heracle BioSoft, 2013) no qual também foram obtidas as sequências consenso. Em seguida, as sequências foram traduzidas no programa MEGA v.6 (Tamura *et al.*, 2011) a fim de verificar possíveis códons de parada. Em seguida, elas foram alinhadas com a ferramenta de alinhamento múltiplo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* v. 7.1.9 (Hall, 1999).

As sequências foram submetidas ao BLAST (*Basic Alignment Tool Search*) no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmação do fragmento amplificado do gene COI e comparadas com acessos do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para análise de homologias. As mesmas sequências foram também confrontadas com o banco de dados do *Barcode of Life Database* (BOLD), utilizando a opção *Species Level Barcode Records*, onde sequências *barcode* ao nível de espécie de tamanho igual ou superior a 500 pb estão disponíveis para possível identificação. Todas as sequências de cada espécime, juntamente com os cromatogramas, imagens dos exemplares, coordenadas do local, data de coleta, nome do coletor e do identificador e localidade do *voucher*, foram depositadas na plataforma do BOLD, vinculadas ao projeto “*Hypostomus* northeastern Brazil – HYPBA” (números de acesso HYPBA001-16 a HYPBA060-16).

Sequências do GenBank e da plataforma BOLD com distância genética $\leq 2\%$ de espécies relacionadas e do grupo externo foram também alinhadas com as sequências do presente trabalho no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.1.9. (Hall, 1999), utilizando-se a ferramenta Clustal W. O alinhamento foi então inserido no programa MEGA v. 6 (Tamura *et al.*, 2011) para obtenção das matrizes de distância genética par a par e da matriz de distância dentro e entre morfotipos com base no modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-Parâmetros (K2P) (Kimura, 1980). Para a construção da árvore de NJ, foram incluídas sequências de espécies da bacia do Alto Paraná (*Hypostomus* sp. - JN988949 e GU701697; *H. iheringii* - GU701699; *H. paulinus* - GU701661; *H. nigromaculatus* - GU701686; *H. strigaticeps* - GU701951; *H. auroguttatus* - GU702259; *H. hermanni* - GU701703; *H. topovane* - GU701659) e do São Francisco (*H. alatus* - DCC00436, *Pterygoplichthys etentaculatus* DCC38341, *P. pardalis* - HQ682719). Como grupos externos, foram também incluídas sequências de COI depositados no BOLD de *Pareiorhaphis bahianus* (GQ225418) e

Parotocinclus britskii (GQ225426). A partir desses dados foi obtida uma árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987) com base no modelo K2P e 1000 réplicas de *bootstrap* com o mesmo programa supracitado.

Além da árvore de NJ, foram realizadas inferências por análise Bayesiana (BI) e de Máxima Verossimilhança (ML) para verificar os agrupamentos entre sequências e seu grau de confiabilidade utilizando os programas MrBayes v. 3.2.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) (licença gratuita) e o PhyML v. 3.0 (<http://www.opensource.org>), respectivamente. Os modelos para os critérios de análise de BI e ML foram o TPM2uf+G e TVM+G, respectivamente, conforme determinado pelo programa jModelTest (Posada, 2008).

Uma vez inseridas no BOLD, as sequências foram submetidas à análise de *Barcode Index Numbers* (BIN), procedimento previsto pelo sistema BOLD depois de carregar e validar as sequências depositadas como *barcode tags*. Por sua vez, a análise do algoritmo ABGD foi realizada na plataforma (<http://www.abi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>, web version) a partir da submissão do arquivo em extensão *.fasta, contendo as sequências consenso alinhadas.

Para a análise com o algoritmo GMYC (Fujisawa & Barraclough, 2013) foi gerada uma árvore ultramétrica no BEAST 1.8.2 (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*; Drummond *et al.*, 2012), utilizando um indivíduo por haplótipo para linhagens com dois ou mais haplótipos e dois indivíduos por haplótipos para as linhagens com haplótipos exclusivos. O modelo de substituição foi estimado utilizando o programa jModelTest (Posada, 2008). Foram adotados os seguintes parâmetros de análise: 10 milhões de gerações, com amostragem a cada 1.000 gerações; modelo HKY+I+G; relógio molecular estrito com taxa de mutação arbitrária (1,0 substituição/sítio/Ma) e método de coalescência de Yule *a priori*.

O programa *Tracer* v. 1.6 (Rambaut *et al.*, 2013) foi utilizado para verificar o desempenho da análise, verificando se os valores dos parâmetros Tamanho da Amostra Efetivo (ESS) ficaram acima de 200. Após a verificação, uma única árvore foi gerada com o programa *Tree Anotator* 1.8.2 (Rambaut & Drummond, 2015b), utilizando 10% de *burn-in*. Essa árvore serviu como *input* para a análise realizada no servidor GMYC (<http://species.hits.org/gmyc/>) com o método de limiar único (Zhang, 2016).

Por outro lado, a análise por bPTP adiciona valores de suporte Bayesiano para as espécies delimitadas em uma árvore filogenética prévia (Zhang *et al.*, 2013). A árvore de Máxima Verossimilhança obtida no MEGA v.6 foi usada como entrada no servidor da web bPTP (<http://species.hits.org/ptp/>; Zhang, 2013), com as seguintes configurações: árvore com raiz, 100.000 gerações de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) (*thin* = 100); e 10% de

burn-in. No mesmo servidor, o diagnóstico de convergência da MCMC foi verificado com a opção “*Likelihood Trace Plot*”.

As diversidades haplotípicas (h) e nucleotídicas (π) foram calculadas utilizando o *DNA Sequence Polymorphism - DnaSP v. 5.10* (Rozas *et al.*, 2010). A rede de haplótipos foi obtida com o programa *Haplotype Viewer* (Barrett *et al.*, 2005).

A análise da variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) foi realizada para estimar a variação entre as populações no software ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 2000). Essa análise fornece os valores de Φ_{ST} , o qual representa uma medida do grau de diferenciação genética ou de subdivisão interpopulacional (Slatkin, 1993). De acordo com os critérios propostos por Wright (1978), os valores de divergência podem ser classificados da seguinte forma: entre 0,00 e 0,05, baixa; entre 0,05 e 0,15, moderada; entre 0,15 e 0,25, alta; maior que 0,25, muito alta. A significância do teste foi verificada pelo método de permutação aleatória com 1.000 permutações.

4.4 Análises citogenéticas

Foram analisadas citogeneticamente 39 espécimes de *Hypostomus* referentes às populações sem dados citogenéticos prévios (Tabela 2). Os peixes foram acondicionados em aquários aerados e estimulados com a aplicação intraperitoneal de uma solução de agentes mitogênicos por 48h a 72h (Molina *et al.*, 2010) e então submetidos à eutanásia (Blessing *et al.*, 2010). Os cromossomos metafásicos foram obtidos seguindo o protocolo de Foresti *et al.* (1993) e Netto *et al.* (2007), a partir de células do rim anterior.

As suspensões celulares obtidas foram gotejadas sobre lâminas de vidro limpas e submetidas à coloração convencional com solução de Giemsa a 10% em tampão fosfato (pH 6,8) por 10 minutos. As melhores metáfases foram selecionadas e fotografadas utilizando o microscópio Olympus BX51 e digitalizadas utilizando o programa Image-Pro® Plus v. 6.2 (Media Cybernetics).

A morfologia cromossômica foi estabelecida de acordo com a razão de braços (Levan *et al.*, 1964) nas categorias: metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico (st) e acrocêntrico (a) com organização dos pares em ordem decrescente de tamanho por categoria.

A localização das regiões organizadoras de nucléolo ativas (Ag-RONs) foi determinada após a impregnação com nitrato de prata (Howell & Black, 1980) e o padrão de distribuição da heterocromatina foi visualizado por bandamento C (Sumner, 1972).

5. RESULTADOS

5.1 Análise dos morfotipos

Oito morfotipos foram identificados nas localidades amostradas com base em caracteres da morfologia externa (Figura 9). A identificação realizada pela taxonomista Prof. Dr. Luisa Maria Sarmiento-Soares separou os morfotipos de acordo com o padrão de coloração (fator taxonômico para o gênero) e caracteres merísticos comparados com chaves de identificação com espécies de outras bacias conforme descritos a seguir.

5.1.1 *Hypostomus jaguar* (Zanata et al., 2013)

Diagnose: manchas grandes escuras sobre corpo claro. Manchas sobre o corpo de tamanho igual ao diâmetro do olho ou chegando à metade ou mais deste tamanho. Abdômen aproximadamente nu, com pequenas placas na parte anterior. Lobos da nadadeira caudal aproximadamente igual em comprimento. Nadadeira dorsal com sete raios ramificados (vs. 10 a 11 raios em *H. chrysostiktos*) (cf. Zanata et al., 2013) (Figura 9a).

Comentários: *H. jaguar*, foi descrita como endêmica da bacia do Paraguaçu e aqui, expandimos sua distribuição para a bacia do Recôncavo Sul, em aflrente do rio Jequiçá.

Distribuição: Rio Paraguaçu (bacia rio Paraguaçu) e rio Jequiçá (bacia do Recôncavo Sul).

Material analisado: Bahia: Bacia do rio Jequiçá: MBML 10331, rio Jequiçá no município de Mutuípe. Bacia do rio Paraguaçu: MBML 11017, rio Paraguaçu, no centro de Itaetê-BA. MBML 11020, rio Paraguaçu, na estrada para Balneário, BA-245 em Iaçú-BA.

5.1.2 *Hypostomus chrysostiktos* (Birindelli et al., 2007)

Diagnose: O grande número de raios ramificados da nadadeira dorsal (10-11) prontamente separa a espécie, tratando-se de característica incomum em *Hypostomus*. Por outro lado, é uma característica compartilhada com espécies de *Pterygoplichthys* da mesma tribo Hypostomini. A seguinte combinação de caracteres permite reconhecer a espécie: placas laterais da cabeça levemente eversíveis, quatro raios ramificados na nadadeira anal, abdômen nu e focinho quase completamente coberto por placas (Birindelli et al., 2007) (Figura 9b).

Comentários: Corresponde ao morfotipo com maior divergência em relação ao demais. A análise do padrão de coloração já o separa claramente das demais espécies de *Hypostomus* avaliadas.

Distribuição: Endêmica da bacia do rio Paraguaçu.

Material analisado: Bahia: Bacia do rio Paraguaçu: MBML 11016, rio Paraguaçu, no centro de Itaeté; MBML 11019, rio Paraguaçu, na estrada para Balneário, na BA-245 em Iaçú.

5.1.3 *Hypostomus unae* (Steindachner, 1878)

Diagnose: Distingue-se das congêneres por ter tronco coberto por manchas pretas inconspícuas e bem maiores que as da cabeça, ventre nu ou com pequenas áreas cobertas por placa, ausência de cristas nas laterais do corpo, ponta da nadadeira dorsal não atingindo espinho da adiposa e manchas na nadadeira caudal formando faixas transversais (cf. Sardeiro, 2012). Apresenta uma fileira de manchas nas membranas inter-radiais. As manchas são esféricas e levemente borradas. As manchas da cabeça são aproximadamente do tamanho da pupila, sendo um pouco maiores que as distribuídas pelo corpo e mais espaçadas que na cabeça. A altura da cabeça é relativamente baixa e levemente quilhada à altura dos olhos (Figura 9c, 9d).

Comentário: As bacias do Recôncavo Sul e Pardo compartilham esse morfotipo.

Distribuição: Distribuição restrita à bacia do Recôncavo Sul, porém com o primeiro registro para a bacia do rio Pardo.

Material analisado: Bahia: Bacia do Recôncavo Sul: MBML 11015, rio Serra, distrito de Tremembé, em Marau - BA. Bacia do rio Pardo: MBML 11021, rio Pardo, acesso pela BR-415, Fazenda Santa' Mira, em Itapetinga.

5.1.4 *Hypostomus breviceuda* (Günther, 1864)

Diagnose: Apresenta alta similaridade morfológica com *H. wuchereri*, pois ambas apresentam padrão de coloração muito semelhante e áreas de distribuição sobrepostas. A principal diferença descrita envolve uma terceira fileira de manchas na membrana inter-radial da nadadeira dorsal em *H. breviceuda* (cf. Pitanga, 2015) (Figura 9e).

Comentário: As características que distinguem *H. breviceuda* e *H. wuchereri* nem sempre são identificáveis, havendo a possibilidade de sinonimização, com base na morfologia.

Distribuição: Bacia do rio Almada

Material analisado: Bahia: Bacia do rio Almada: MBML 5388, rio Tiriri sob a BA-656, Ilhéus. MBML 9266, rio Sete Voltas, tributário do rio Tiriri próximo a BA-656.

5.1.5 *Hypostomus wuchereri* (Günther, 1864)

Diagnose: Mancha na membrana inter-radial da nadadeira dorsal, às vezes de aparência coalescida na extremidade da membrana. As manchas da cabeça e do corpo são aproximadamente do tamanho da pupila. As manchas das nadadeiras peitorais, pélvicas e caudal são relativamente maiores, formando faixas transversais (cf. Pitanga, 2015). O corpo é relativamente baixo. Abdômen aparentemente nu (Figura 9f).

Distribuição: Rio Salgado (Bacia do rio Cachoeira)

Material analisado: Bahia: MBML 11012, rio Salgado, Floresta Azul-BA.

5.1.6 *Hypostomus* aff. *wuchereri* - “nova espécie”

Diagnose: Assemelha-se à *H. wuchereri* pelo padrão de duas manchas entre as membranas inter-radiais da nadadeira dorsal. Contudo, a cabeça é relativamente baixa, e a parte da placa anterior médio-ventral levemente quilhada (vs. arredondado em *H. wuchereri*). O padrão de pintas nas membranas inter-radiais da dorsal forma um padrão de manchas grandes em mosaico (vs. manchas pequenas salteadas em *H. wuchereri*). Mancha escura na borda distal da adiposa. Manchas na membrana inter-radial da peitoral também em mosaico, porém menores que aquelas da membrana da dorsal. Cintura peitoral revestida por pequenos odontóides (Figura 9g).

Comentários: Bitencourt *et al.* (2011a) tentativamente sugeriram a ocorrência de *H.* cf. *wuchereri* para a bacia do rio de Contas, no entanto Sardeiro (2012) em estudo de redescrição da espécie *H. unae* e Pitanga (2015) em estudo de redescrição de *H. wuchereri* sugerem que tais populações representem possíveis espécies novas. No presente estudo, reconhecemos fortes semelhanças entre os espécimes do rio Gongogi, rio de Contas e rio Vieira com a espécie *H. wuchereri*, mas com diferenças morfológicas evidentes entre ambas como descrito na seção de diagnose.

Distribuição: Rio Gongogi, rio de Contas (leito principal) e rio Vieira (bacia rio de Contas).

Material analisado: Bahia: Bacia do rio de Contas: MBML 10.329, rio Gongogi em Dário Meira, MBML 10.332 e 10.333, rio de Contas, MBML 10.336 rio Vieira.

5.1.7 *Hypostomus* sp. n. 1

Diagnose: Mancha na membrana inter-radial da nadadeira dorsal, às vezes de aparência coalescida. O tamanho das manchas sobre a cabeça é próximo ao diâmetro da pupila, porém menor que as manchas sobre o corpo, as quais apresentam tamanho similar ao diâmetro do olho e são espaçadas, formando até cinco fileiras em relação à altura do corpo nos exemplares analisados. As manchas da caudal formam linhas verticais, às vezes claras outras mais escuras, sendo compostas por manchas esféricas ou pouco coalescidas (Figura 9h).

Comentários: *Hypostomus* sp. n. 1 tem ampla distribuição pela bacia do rio de Contas, exceção feita à população do rio Gongogi, Contas e Vieira que se assemelham mais a *H. wuchereri*.

Distribuição: Bahia: rio Preto do Criciúma, rio das Pedras e rio Preto do Costa (bacia do rio de Contas).

Material analisado: Bacia do rio de Contas: MBML 10.328 e MBML 10.338, rio Preto do Criciúma, BR 330, Jitaúna – BA; MBML 10.334, rio das Pedras, distrito de Itiúba, Jequié-BA e MBML 10.332 e MBML 10337, rio Preto do Costa, Povoado Baixa Alegre, Apuarema - BA.

5.1.8 *Hypostomus* sp. n. 2

Diagnose: Difere da maioria das congêneres principalmente pelo colorido do corpo relativamente homogêneo e por ter o lobo inferior da nadadeira caudal distintamente mais longo que o superior (cf. Pitanga, 2015) (Figura 9i).

Comentário: Os indivíduos desse morfotipo foram coletados no rio Itapicuru e depositados na no Instituto Nacional da Mata Atlântica por Jamille Bitencourt. Encontra-se em processo de descrição por Pitanga e Zanata (2015).

Distribuição: Rio Itapicuru, bacia rio Itapicuru- BA.

Material analisado: Bahia: Bacia do rio Itapicuru: MBML 4048, MBML 4073 e MBML 4074, rio Itapicuru próximo a Caldas do Jorro.

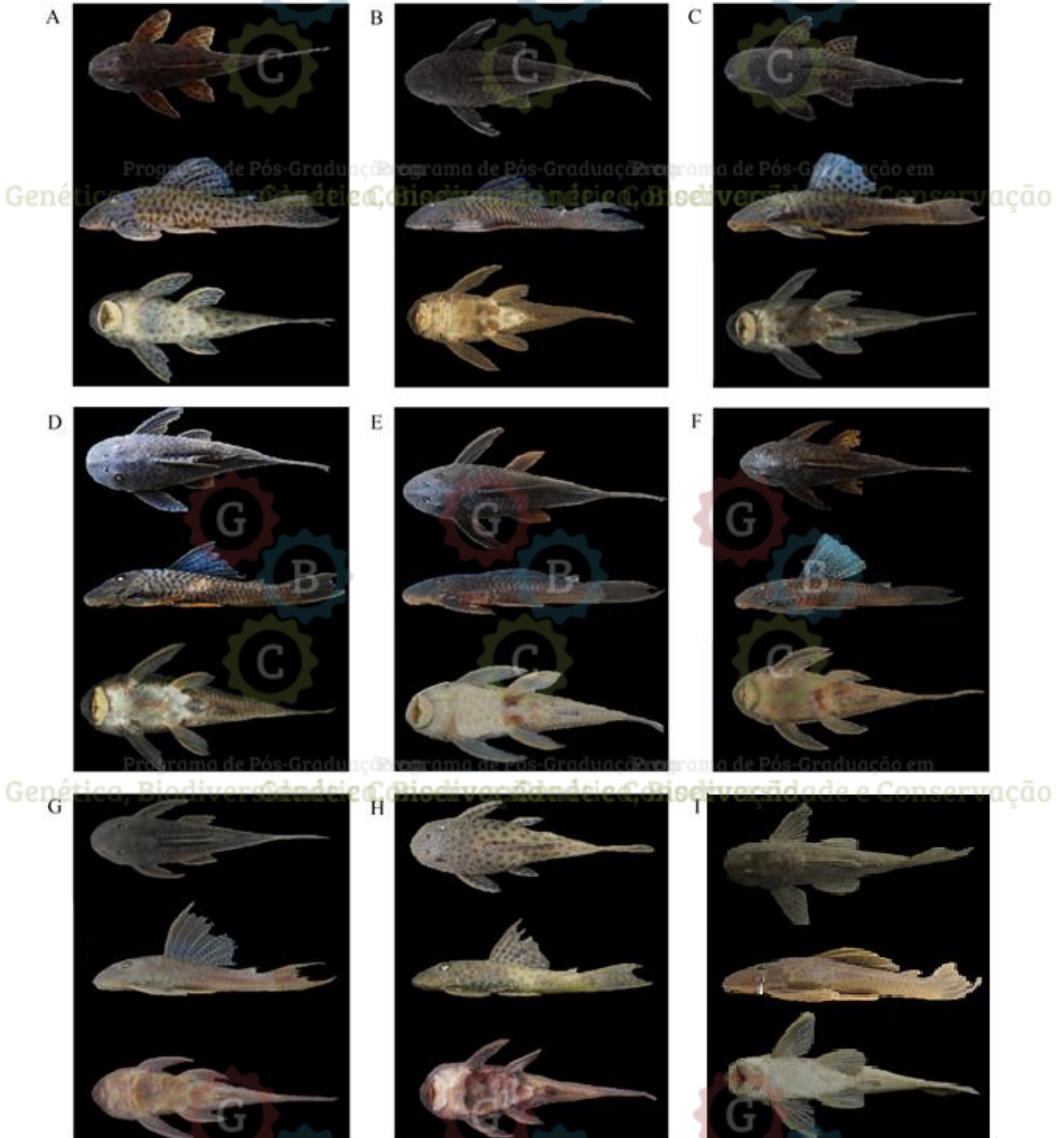


Figura 9. Morfotipos de *Hypostomus* de bacias da Bahia: *H. jaguar* (a); *H. chrysostiktos* (b); *H. unae* (rio da Serra) (c); *H. unae* (rio Pardo) (d); *H. brevicauda* (e); *H. wuchereri* (f); *H. aff. wuchereri* (g); *Hypostomus* sp. n. 1 (h); *Hypostomus* sp. n. 2 (rio Itapicuru) (i).

5.2 Morfometria Geométrica

A PCA indicou variação na forma do corpo em todas as vistas. Para a vista dorsal, os dois primeiros componentes explicaram 81,8% da variação total (Figura 10a). As grades de deformação e o contorno ilustram que as mudanças mais acentuadas da forma foram na porção da cabeça nos PC1 (Figura 10b, c) e PC2 (Figura 10d, e). No escore positivo do PC1 encontram-se os morfotipos *H. aff. wuchereri* (rio Vieira e rio de Contas), *Hypostomus* sp. n. 1 (rio Preto do Criciúma), caracterizados pela forma mais larga e alongada da cabeça (Figura 10c) e no escore negativo do PC1 temos *H. jaguar* (rio Jequiriçá e Paraguaçu), *H. chrysostiktos*, *H. aff. wuchereri* (rio Gongogi) e *H. unae* (rio Pardo), caracterizados pela forma mais estreita e curta da cabeça (Figura 10b). No escore positivo do PC2 encontram-se os morfotipos *H. wuchereri* (rio Cachoeira), *Hypostomus* sp. n. 1 (rio Preto do Criciúma e rio das Pedras) e *H. jaguar* (rio Jequiriçá), ambos caracterizados pela forma mais curta e larga da cabeça (Figura 10d) e no escore negativo do PC2 tem-se *H. chrysostiktos* (rio Paraguaçu), *H. aff. wuchereri* (rio Vieira e de Contas) e *Hypostomus* sp. n. 1 (rio Preto do Costa), caracterizados pela forma mais estreita e alongada da cabeça (Figura 10e). Em ambos os componentes, a maior variação da forma ocorre entre as narinas (LM 1 e 2), olhos (LM 3, 4, 5 e 6) e osso supraoccipital (LM 9) em relação às extremidades do focinho (LM 16 e 17), seguida de variação na região da inserção das nadadeiras peitorais (Figura 10).

Para a vista ventral, os dois primeiros PCA revelam 61,5% da variação (Figura 11a) entre os indivíduos. As grades de deformação e o contorno demonstram que a maior variação envolve a largura da cintura peitoral, a região das nadadeiras pélvicas e a cabeça nos PC1 (Figura 11b, c) e PC2 (Figura 11d, e). No escore positivo da PC1 estão os morfotipos *H. chrysostiktos* (rio Paraguaçu), *H. jaguar* (rio Jequiriçá), *H. aff. wuchereri* (rio Gongogi) e *H. unae* (rio Pardo), os quais apresentam a cintura peitoral e a região das nadadeiras pélvicas mais largas e a cabeça mais estreita (Figura 11c), enquanto no escore negativo do PC1 encontra-se *Hypostomus* sp. n. 1 (rio Preto do Criciúma), *H. aff. wuchereri* (rio Vieira) e *H. jaguar* (rio Paraguaçu) com cintura peitoral, região das nadadeiras pélvicas e cabeça mais largas (Figura 11b). No escore positivo do PC2, estão os morfotipos *H. chrysostiktos* (rio Paraguaçu), *H. aff. wuchereri* (rio Vieira) e *Hypostomus* sp. n. 1 (rio das Pedras, Preto do Criciúma e Preto do Costa), *H. wuchereri* (rio Cachoeira), como forma mais estreita e alongada da cabeça e da cintura peitoral, além de disco oral mais estreito e curto em relação à extremidade do focinho (Figura 11d).

O escore negativo do PC2 da vista ventral inclui *H. unae* (rio Pardo), *H. jaguar* (rio Jequiriçá), *H. aff. wuchereri* (rio de Contas e Gongogi) caracterizados pela forma mais

alargada e alongada da cabeça e da cintura peitoral, com disco oral mais largo e alongado em relação à extremidade do focinho (Figura 11e). Em ambos os componentes, a maior variação da forma ocorre com relação às narinas, olhos e osso supraoccipital (LM 1, 2, 3 e 4, 5 e 6, 9) em relação às extremidades do focinho (semimarcos 16 e 17) (Figura 11).

Para a vista lateral esquerda, os dois primeiros PCA acumularam 55,7% da variação total na forma do corpo (Figura 12a). As grades de deformação e o contorno indicam maior variação quanto à altura da cabeça no PC1 (Figura 12b, c) e no PC2 (Figura 12d, e). Os morfotipos mostram-se mais semelhantes com base nessa vista. Ainda assim, o escore positivo do PC1 agrupa *H. unae* (rio Pardo) *H. aff. wuchereri* (rio Gongogi), *H. chrysostiktos* (rio Paraguaçu) e *H. jaguar* (rio Jequiriçá) em função da cabeça deprimida dorsoventralmente e mais curta do focinho à inserção da nadadeira dorsal (Figura 12c). No escore negativo do PC1, estão *H. unae* (rio Serra), *H. aff. wuchereri* (rio Vieira), *H. wuchereri* (rio Cachoeira) e *H. jaguar* (rio Paraguaçu), caracterizados por cabeça mais alta e focinho mais proeminente (Figura 12b). No escore positivo do PC2 não há separação evidente entre os morfotipos. No escore negativo do PC2, apenas *H. unae* (rio Pardo) apresenta-se distinta devido à maior curvatura na região frontal da cabeça e cabeça relativamente mais alta em relação à inserção das nadadeiras peitorais (LM 10) e dorsal (LM 5).

A vista lateral apresenta maior diferença intraespecífica, visto que *H. unae* (rio Pardo) encontra-se no escore positivo do PC1 enquanto que *H. unae* (rio da Serra) encontra-se no escore negativo. *H. jaguar* (rio Jequiriçá) encontra-se no escore positivo do PC1, enquanto *H. jaguar* (rio Paraguaçu) encontra-se distribuído em ambos os escores. *H. aff. wuchereri* (rio Gongogi) encontra-se no escore positivo do PC1, enquanto *H. aff. wuchereri* (rio Vieira) encontra-se no escore negativo do PC1 (Figura 12).

Os morfotipos *H. chrysostiktos*, *H. jaguar* (rio Jequiriçá e Paraguaçu) e *H. aff. wuchereri* (rio Gongogi e Vieira) apresentam variação do formato do corpo em todas as vistas analisadas. Vale destacar que esses morfotipos foram coletados em rios de maior ordem, com exceção da amostra do rio Vieira. Por outro lado, a maioria dos locais dos demais morfotipos representa afluentes menores.

O dendrograma por UPGMA (10.000 permutações) para ilustrar a relação morfométrica entre os morfotipos (Figura 13) foi baseado na vista dorsal, pois esta foi a que melhor explicou as diferenças uma vez que os dois primeiros componentes acumularam 81,8% da variação na forma. O coeficiente de correlação cofenética (CCC) com base na distância euclidiana foi de 0,867, o que evidencia a consistência nos agrupamentos. O grupo mais bem definido (altos valores de suporte) foi *H. chrysostiktos*, condizente com a forma mais distinguível desses morfotipos. Outros grupos formados são compostos por *Hypostomus* sp. n. 1 + *H. aff. wuchereri* (Bacia do rio de Contas) + *H. wuchereri* (rio Cachoeira) e *H. brevicauda* (rio Almada) revelando a semelhança da forma do corpo para os morfotipos dessas bacias e *H. unae* (Bacia do rio Pardo e Recôncavo Sul) + *H. jaguar* (rio Paraguaçu e Recôncavo Sul) que diferem dos demais, contudo sem alto valor de suporte.

É notável a presença de diferentes morfotipos dentro da bacia do rio de Contas e a similaridade entre bacias adjacentes, como Recôncavo Sul e Paraguaçu, Pardo e Recôncavo Sul, Bacia do Leste e Contas.

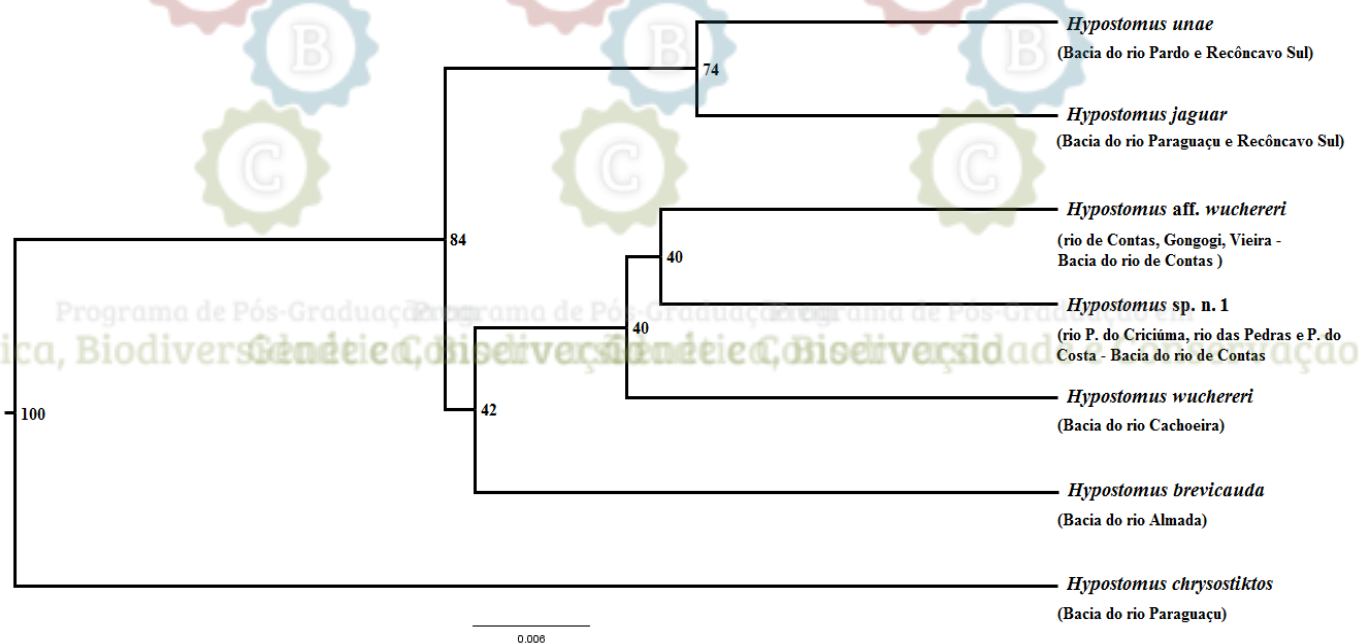


Figura 13. Dendrograma gerado por UPGMA ilustrando as distâncias morfométricas médias entre a forma do corpo com base na vista dorsal dos indivíduos do gênero *Hypostomus* das bacias da região Atlântico Leste do Brasil, com 10.000 permutações.

A análise de regressão foi significativa, indicando que há variação da forma em relação ao tamanho ($p < 0,001$). Contudo, a separação entre os grupos na análise morfométrica foi baseada em características independentes do tamanho, pois se verificou que dentro dos morfotipos indivíduos com tamanhos distintos apresentavam a mesma forma.

A função discriminante também foi utilizada para discriminar os morfotipos em cada vista e minimizar a probabilidade de má classificação a partir da validação cruzada. A partir dessa abordagem, verificou-se que os espécimes foram classificados corretamente em 68,7%, 72% e 79,3% dos casos para a vista dorsal, ventral e lateral respectivamente (Anexo 2).

5.3 DNA *barcode*

Foram analisadas 60 sequências de COI com 667 pares de bases. O número de espécimes por localidade variou de um a seis, com uma média de 3,15 amostras por local de coleta.

Assim, o alinhamento final compreendeu 74 sequências, com 189 sítios variáveis e conteúdo das bases nitrogenadas adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T) de 25,5%, 25,9%, 18,1% e 30,5%, respectivamente.

A divergência genética intraespecífica entre os morfotipos variou de 0 a 2% (Tabela 4). O maior valor de diversidade intraespecífica foi encontrado para *H. unae* (2%). Por outro lado, a divergência interespecífica variou de 0 a 7% (Tabela 5). A maior divergência foi observada entre *H. chrysostiktos* e os demais morfotipos (7%).

Tabela 4. Distâncias genéticas intraespecíficas (D) e erro-padrão (S.E.) a partir do modelo K2P de cada morfotipo de *Hypostomus* spp. de bacias costeiras da Bahia.

Morfotipos	D	S.E.
<i>Hypostomus</i> aff. <i>wuchereri</i>	0.00	0.001
<i>Hypostomus</i> sp. n. 1	0.01	0.002
<i>Hypostomus unae</i>	0.02	0.003
<i>Hypostomus brevicauda</i>	0.00	0.002
<i>Hypostomus</i> sp. n. 2	0.00	0.000
<i>Hypostomus jaguar</i>	0.00	0.002
<i>Hypostomus chrysostiktos</i>	0.00	0.001
<i>Hypostomus wuchereri</i>	0.00	0.000

Tabela 5. Distâncias genéticas interespecíficas baseadas no modelo K2P entre morfotipos de *Hypostomus* spp. de bacias costeiras da Bahia.

Morfotipos	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Hypostomus</i> aff. <i>wuchereri</i>	-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
<i>Hypostomus</i> sp. n. 1	0.01	-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
<i>Hypostomus unae</i>	0.02	0.02	-	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
<i>Hypostomus brevicauda</i>	0.01	0.01	0.02	-	0.00	0.00	0.01	0.00
<i>Hypostomus</i> sp. n. 2	0.01	0.02	0.02	0.01	-	0.00	0.01	0.00
<i>Hypostomus jaguar</i>	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	-	0.01	0.00
<i>Hypostomus chrysostiktos</i>	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	-	0.01
<i>Hypostomus wuchereri</i>	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.07	-

A árvore de NJ com 10.000 réplicas de *bootstrap* (Figura 14) apresentou a mesma topologia das obtidas por ML e BI, recuperando dois grupos fortemente apoiados (100%): 1- *H. chrysostiktos*; 2- *Hypostomus* sp. n. 2. Os demais morfotipos se agrupam com valores inferiores a 94%. Vale ressaltar o agrupamento formado por *H. jaguar*, *H. unae* (rio Una/Recôncavo Sul), *H. aff. wuchereri* e *Hypostomus* sp. n. 1, incluindo amostras das bacias do Paraguaçu, Recôncavo Sul e Contas. Outro destaque é o agrupamento formado com 99% de suporte entre *H. chrysostiktos* com o gênero *Pterygoplichthys* (bacia do São Francisco).

De acordo com a de Máxima Verossimilhança (ML), apenas um grupo fortemente apoiado com 99% de confiabilidade foi recuperado, composto pelo morfotipo *H. chrysostiktos*, enquanto os demais ramos apresentaram valores abaixo de 91% (Figura 14). A análise por inferência Bayesiana (BI) apresentou cinco agrupamentos apoiados com valores de probabilidade a *posteriori* acima de 0,98: 1 – *H. unae* (rio Serra - bacia do Recôncavo Sul) + *H. unae* (bacia do rio Pardo); 2 – *H. brevicauda* (sub-bacia do rio Almada); 3 – *H. jaguar* (bacia do rio Paraguaçu) + *Hypostomus jaguar* (bacia do Recôncavo Sul); 4 – *H. chrysostiktos* (bacia do rio Paraguaçu); 5 - *H. unae* (bacia do rio Una/Leste e bacia do rio Pardo) + *H. paulinus* (bacia do alto Paraná/BOLD) (Figura 14 - valores em vermelho). Os indivíduos de *Hypostomus* sp. n. 2 (bacia do Itapicuru) foram agrupados com probabilidade de 88% (Figura 14).

A análise do BIN (*barcode index number*) separou os *Hypostomus* da Bahia em três grupos. O BIN ACZ7798 agrupou *Hypostomus* sp. n. 1, *H. aff. wuchereri*, *H. brevicauda*, *H. jaguar*, *H. wuchereri*, *H. unae* (rio Una/Recôncavo Sul) e *Hypostomus* sp. n. 2, com distância média de *nearest neighbor* (NN) igual a 1,06% (mínima de 0,9% e máxima de 2,84%)

exclusivo para o presente estudo. O BIN ACZ9667 incluiu os exemplares de *H. chrysoptiktos*, (NN = 0%), tendo *Pterygoplichthys etentaculatus* da bacia do rio São Francisco como vizinho mais próximo (NN=2,25%). Por fim, o BIN ACE2903 é composto pelos morfotipos *H. unae* (rio Pardo e Una/Leste), estando agrupados com *Hypostomus* sp. da bacia do São Francisco e *H. paulinus* do Alto Paraná com 99,7% de semelhança (Figura 14).

A plataforma de análise ABGD separou o conjunto de dados em apenas dois grupos, separando *H. chrysoptiktos* de todos os demais morfotipos de *Hypostomus* (Figura 14). Por outro lado, a análise por GMYC sugere a presença de cinco espécies: 1 - *H. chrysoptiktos*; 2 - *H. unae* (rio Pardo e rio Una/Leste); 3 - *Hypostomus* sp. n. 2; 4 - *H. unae* (rio Serra/Recôncavo Sul) + *H. aff. wuchereri* (Rio Gongogi e rio Oricó/Contas) e 5 - *H. brevicauda* + *H. wuchereri* + *H. jaguar* (rio Paraguaçu e rio Jequiriçá/Recôncavo sul) + *H. unae* (rio Una/Recôncavo Sul) + *Hypostomus* sp. n. 1 + *H. aff. wuchereri* (rio Vieira e Contas), com $p < 0,05$ (Figura 14, Anexo 3).

O algoritmo bPTP delimitou quatro espécies possíveis de *Hypostomus* na Bahia, sendo (1) *H. chrysoptiktos*, (2) *H. unae* (rio Pardo e Una/Leste), (3) *Hypostomus* sp. n. 2, e (4) demais morfotipos (Figura 14, Anexo 4).

As análises morfológicas e morfométricas indicam que *H. brevicauda* e *H. wuchereri* sejam um possível caso de sinonímia. Adicionalmente, análise genética apresenta baixa divergência entre os morfotipos (1%) mais compatível com estruturação genética dentro de uma mesma espécie do que com espécies distintas (Figura 14). Do mesmo modo *H. wuchereri* do rio Cachoeira também formou agrupamento individual, porém sem suporte estatístico além de não apresentar divergência genética em relação à *H. aff. wuchereri* da bacia do rio de Contas, assim esses morfotipos também parecem ser um caso de sinonímia.

Na rede de haplótipos (Figura 15) foram obtidos 36 haplótipos, com diversidade haplotípica (h) média de 0,974 (desvio padrão de 0,007) e diversidade nucleotídica (π) igual a 0,01207.

Com base no número de mutações que separam os haplótipos, é possível observar três agrupamentos geneticamente mais estruturados. Um grupo engloba o maior número de haplótipos, reunindo os morfotipos de *Hypostomus* sp. n. 1, *H. aff. wuchereri*, *H. brevicauda*, *H. jaguar*, *H. wuchereri*, *H. unae* (rio Una/Recôncavo Sul) e *Hypostomus* sp. n. 2, porém *H. unae* e *Hypostomus* sp. n. 2 se apresentam em processo de diferenciação mais avançado em relação aos demais do mesmo grupo, indicando divergência mais antiga. O segundo grupo é composto por amostras de *H. unae* (bacias do Una/Leste e do rio Pardo), enquanto o terceiro e mais divergente grupo é composto exclusivamente por *H. chrysostiktos* (Figura 15).

O teste de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989) apresentou valor de -1,91448 com $p < 0,05$, o qual foi corroborado pelo teste F_s de Fu (Fu, 1997) com valor de -13,373 ($p=0,000$). Esses valores indicam processo de expansão recente, o que também é apoiado pelo alto número de haplótipos relacionados no grupo que compreende a maior parte dos morfotipos. Esses mesmos testes de neutralidade foram realizados para os três grupos separadamente, mas não foram significativos.

A alta divergência genética entre as morfotipos (75,61%) em contraste com a baixa variação dentro dos mesmos (12,71%) revela a acentuada estruturação entre as amostras *Hypostomus* spp. das bacias costeiras da Bahia. De fato, o índice de fixação Φ_{ST} entre os morfotipos de cada localidade foi muito elevado (87,3%), corroborando a estruturação genética. Esses valores indicam a diversificação dos morfotipos de *Hypostomus* com a fixação de combinações alélicas distintas, associadas à redução ou ausência de fluxo gênico e compatíveis com processos de especiação independentes.

- *Hypostomus* sp. n. 1
- *Hypostomus* aff. *wuchereri*
- *Hypostomus* *unae*
- *Hypostomus* *brevicauda*
- *Hypostomus* sp. n. 2
- *Hypostomus* *jaguar*
- *Hypostomus* *chrysostrictos*
- *Hypostomus* *wuchereri*

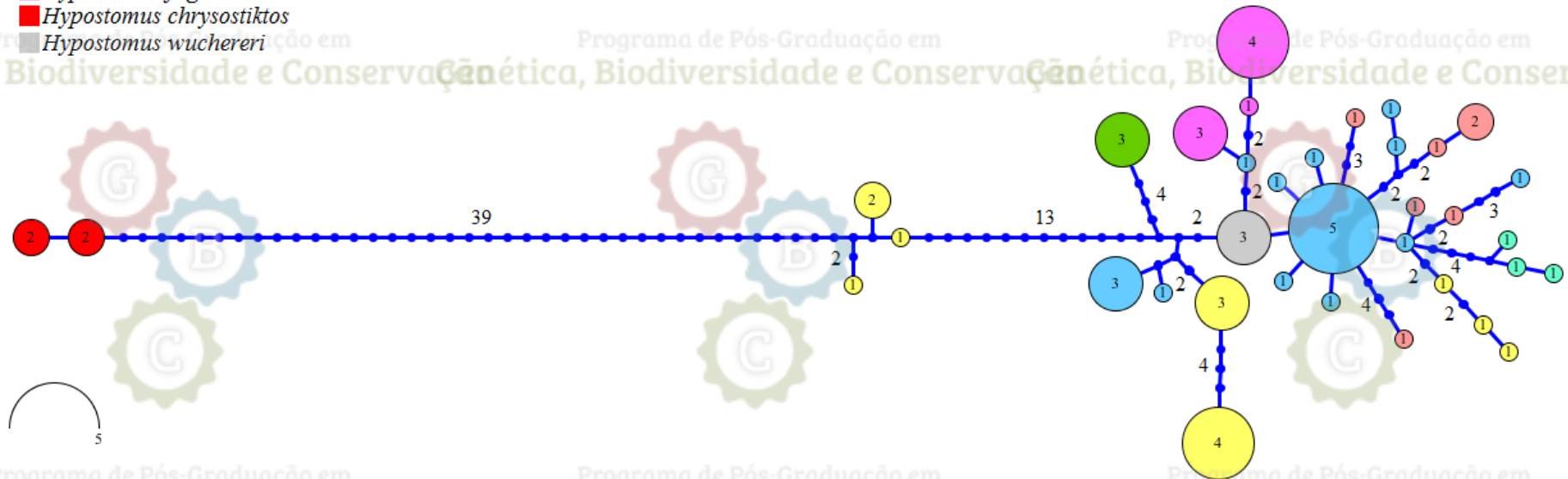


Figura 15. Rede de haplótipos construída com sequências do gene COI, demonstrando as relações entre os haplótipos dos morfotipos de *Hypostomus* de bacias costeiras da Bahia. Cada cor representa um morfotipo e a dimensão dos círculos é proporcional ao número de indivíduos (indicado dentro de cada círculo) que compartilham cada haplótipo. Os números acima das linhas indicam a quantidade de mutações.

5.4 Análise Citogenética

Análises citogenéticas para representantes de *Hypostomus* de bacias costeiras da Bahia foram realizadas previamente por Bitencourt *et al.* (2011a, b, 2012), os quais determinaram o cariótipo de *H. aff. unae* e *H. cf. wuchereri* de bacias do rio de Contas (identificados no presente trabalho como *Hypostomus* sp. n. 1 e *H. aff. wuchereri*) e Recôncavo Sul (identificados como *H.unae*, segundo a classificação prévia por Sardeiro (2012)) (Tabela 6). Porém, os indivíduos da bacia do Recôncavo sul analisados por Bitencourt *et al.* (2011b) e identificados por Sardeiro (2012) agruparam com *H. jaguar* na análise de DNA *barcode* embora com baixo valor de suporte.

A fim de gerar novos dados cromossômicos em *Hypostomus* da Bahia, estudos citogenéticos básicos (cariotipagem, identificação de regiões organizadoras de nucléolos por impregnação com nitrato de prata – Ag-RONs e distribuição da heterocromatina) foram realizados em parte dos morfotipos amostrados. Essas amostras compreenderam os morfotipos de *H. jaguar* (rio Jequiçá e rio Paraguaçu), *H. chrysostiktos*, *H. unae* do rio Pardo, *H. wuchereri* do rio Cachoeira, *H. brevicauda* do rio Almada e *Hypostomus* sp. n. 2 do rio Itapicuru.

Todos os morfotipos compartilham o número diplóide de $2n=76$, similar ao descrito para outras populações/espécies de *Hypostomus* da Bahia (Bitencourt *et al.*, 2011a, b, 2012), com exceção de *H. chrysostiktos* que apresenta $2n=52$. No entanto, a fórmula cariotípica apresentou variações nos números de pares metacêntricos (m), submetacêntricos (sm) e subtelo-cêntricos/acrocêntricos (st/a) entre os morfotipos (Figura 16, Tabela 6).

A heterocromatina constitutiva revelada pelo bandamento C (dados não mostrados) nos cromossomos dos morfotipos analisados nesse trabalho está distribuída preferencialmente na região pericentromérica na maioria dos exemplares analisados. Porém, marcações de banda C terminais e intersticiais também foram frequentes (Tabela 6).

Sistemas simples de Ag-RONs (i.e., localizadas em único par cromossômico) foram identificados em *H. jaguar* (Figura 14a), *H. chrysostiktos* (Figura 14c), *H. unae* (Figura 14d), *H. wuchereri* (Figura 14e) e *H. brevicauda* (Figura 14f), porém envolvendo a região terminal de pares cromossômicos distintos. Por outro lado, *H. jaguar* (Figura 14b) e *Hypostomus* sp. n. 2 (Figura 14g) apresentam RONS múltiplas, situadas na porção terminal de dois pares.

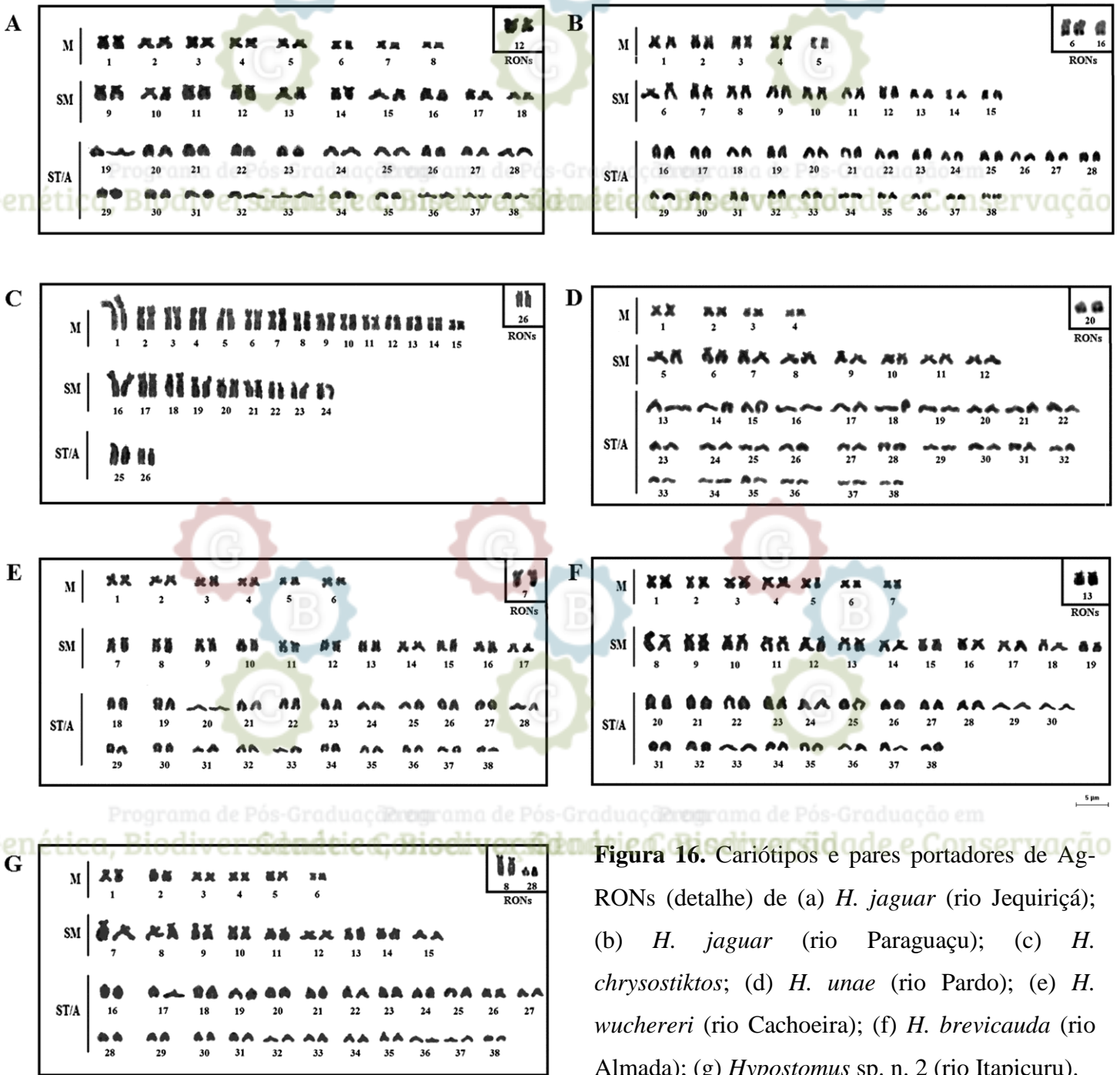


Figura 16. Cariótipos e pares portadores de Ag-RONs (detalhe) de (a) *H. jaguar* (rio Jequiriçá); (b) *H. jaguar* (rio Paraguaçu); (c) *H. chrysostiktos*; (d) *H. unae* (rio Pardo); (e) *H. wuchereri* (rio Cachoeira); (f) *H. brevicauda* (rio Almada); (g) *Hypostomus* sp. n. 2 (rio Itapicuru).

Tabela 6. Informações citogenéticas de morfotipos e espécies de *Hypostomus* de bacias costeiras da Bahia e táxons relacionados a partir de análises de DNA *barcode* (*).

Espécies/Morfotipos	2n	Fórmula	Heterocromatina	RONs	Rios	Bacia	Autores
<i>H. cf. wuchereri</i> (<i>Hypostomus</i> sp. n. 1)	76	10m+18sm+48st/a	T; I	Simple	Rio Mutum	Rio de Contas	Bitencourt <i>et al.</i> , 2011a
<i>H. cf. wuchereri</i> (<i>H. unae</i>)	76	10m+18sm+48st/a	T; I	Simple	Rio Una	Recôncavo Sul	Bitencourt <i>et al.</i> , 2011a
<i>H. aff. unae</i> (<i>H. aff. wuchereri</i>)	76	12m+16sm+48st/a	T; C	Simple	Rio de Contas	Rio de Contas	Bitencourt <i>et al.</i> , 2012
<i>H. aff. unae</i> (<i>Hypostomus</i> sp. n. 1)	76	12m+20sm+44st/a	T; I; C	Simple	Rio Preto do Costa	Rio de Contas	Bitencourt <i>et al.</i> , 2012
<i>H. aff. unae</i> (<i>H. aff. wuchereri</i>)	76	10m+14sm+52st/a	T; I	Simple	Rio Oricó	Rio de Contas	Bitencourt <i>et al.</i> , 2012
<i>H. aff. unae</i> (<i>Hypostomus</i> sp. n. 1)	76	10m+20sm+46st/a	I; C	Simple	Rio Preto do Criciúma	Rio de Contas	Bitencourt <i>et al.</i> , 2012
<i>Hypostomus</i> sp. n. 2	76	12m+18sm+46st/a	T; C	Múltiplas	Rio Itapicuru	Rio Itapicuru	Presente estudo
<i>H. jaguar</i>	76	10m+20sm+46st/a	T; I	Múltiplas	Rio Paraguaçu	Rio Paraguaçu	Presente estudo
<i>H. jaguar</i>	76	16m+20sm+40st/a	T; I	Simple	Rio Jequiriçá	Recôncavo Sul	Presente estudo
<i>H. brevicauda</i>	76	14m+24sm+38st/a	T; C	Simple	Rio do Braço	Leste/Almada	Presente estudo
<i>H. chrysostiktos</i>	52	30m+18sm+4st/a	T; I	Simple	Rio Paraguaçu	Rio Paraguaçu	Presente estudo
<i>H. wuchereri</i>	76	12m+22sm+42st/a	T; C	Simple	Rio Cachoeira	Leste/Cachoeira	Presente estudo
<i>H. unae</i>	76	8m+16sm+52st/a	T; I; C	Simple	Rio Pardo	Pardo	Presente estudo
<i>Hypostomus</i> sp. F*	76	10m+16sm+50st/a	T; I; P	?	Rio São Francisco (MG)	Rio São Francisco	Artoni (1996),
<i>Hypostomus</i> sp. F*	75	10m+17sm+48st/a	?	?	Rio São Francisco (MG)	Rio São Francisco	Artoni & Bertollo (1999)
<i>H. paulinus</i> *	76	6m+16sm+54st/a	T	Simple	Indeterminado	Alto Paraná	Rubert (2007)

T = terminal, I = intersticial, C = centromérica, P = pericentromérica

6. DISCUSSÃO

As incertezas taxonômicas em *Hypostomus* são notórias e usualmente justificadas em função de caracteres imprecisos na diagnose e da ampla distribuição combinada à plasticidade fenotípica do grupo (Lujan *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016). Consequentemente, espécies crípticas e complexos de espécies são comuns para o gênero, tais como *H. ancistroides* (Carvalho *et al.*, 2015) e *H. gr. cochliodon* (Armbruster, 2004) entre outros.

Diante desse cenário, a utilização de diferentes técnicas em abordagem integrativa representa uma estratégia potencialmente informativa para definir unidades taxonômicas em *Hypostomus* de bacias costeiras da Bahia que, assim como os exemplos supracitados, apresentam controvérsias sobre a real riqueza na região (Bitencourt *et al.*, 2012, Cetra *et al.*, 2010; Pitanga, 2015 entre outros). Seguindo essa estratégia, diferenças morfométricas (Figuras 10 a 12), moleculares (Figura 14) e citogenéticas (Figura 16) foram verificadas entre e dentro dos morfotipos de *Hypostomus* das bacias costeiras da Bahia.

Porém, os dados moleculares mostraram que muitas das possíveis espécies de *Hypostomus* descritas para a Bahia carecem de suporte genético para a sua validação (Figura 14). Nesses casos, parece que muitas das diferenças morfológicas previamente atribuídas como espécie-específicas devem representar um espectro da variação morfológica total de um mesmo táxon mais amplamente distribuído. A plasticidade fenotípica é amplamente reconhecida entre peixes de ampla radiação como ciclídeos (Kavembe *et al.*, 2016) e os próprios loricarídeos (Silva *et al.*, 2016).

Igualmente, algumas das diferenças citogenéticas dentro de uma mesma unidade evolutiva (baseada em análises moleculares) podem representar polimorfismos populacionais associados ao isolamento alopátrico. Situações desse tipo não são raras em peixes neotropicais, especialmente dentro de táxons com características populacionais favoráveis à fixação de rearranjos cromossômicos, tais como baixa vagilidade e isolamento em riachos de cabeceiras (Medrado *et al.*, 2012; Bueno *et al.*, 2013; Giongo *et al.*, 2014; Medrado *et al.*, 2015).

A fim de facilitar a discussão, a Tabela 7 sumariza os resultados encontrados pelas metodologias adotadas para cada morfotipo, revelando a congruência ou discordância entre os métodos. Em seguida, os grupos foram então divididos e discutidos separadamente de acordo com o grau de convergência entre os dados morfológicos, moleculares e citogenéticos.

Tabela 7. Sumário dos resultados das análises morfométricas e genéticas em morfotipos de *Hypostomus* spp. de bacias costeiras da Bahia. O símbolo (+) indica que o grupo foi bem apoiado pela análise, enquanto (*) indica sobreposição parcial entre morfotipos e (-) indica ausência de discriminação do morfotipo ou caráter não avaliado. Valores de suporte estatístico são apresentados para as análises NJ.

Morfotipos	MG	NJ	ML	BI	BIN	ABGD	GMYC	bPTP	Citogenética
<i>H. chrysostiktos</i>	+	100%	99%	1.00	+	+	+	+	+
<i>H. unae</i>	+	94%	-	0.99	+	*	+	+	+
<i>H. jaguar</i>	+	80%	-	0.98	*	*	*	*	+
<i>H. brevicauda</i>	*	88%	-	0.99	*	*	*	*	+
<i>H. wuchereri</i>	*	-	-	-	*	*	*	*	+
<i>H. aff. Wuchereri</i>	*	88%	-	0.95	*	*	*	*	+
<i>Hypostomus</i> sp. n. 1	*	-	-	-	*	*	*	*	+
<i>Hypostomus</i> sp. n. 2	-	100%	91%	0.88	*	*	+	+	+

MG = morfometria geométrica; NJ = Neighbor-Joining, ML = Máxima Verossimilhança; BI = Inferência Bayesiana; BIN = Barcode Index Number; ABGD = Automatic Barcode Gap Discovery; GMYC = General Mixed Yule-Coalescent analysis; bPTP = Bayesian Poisson Tree Process).

6.1 *Hypostomus chrysostiktos*

No presente estudo, foram avaliadas duas espécies simpátricas descritas para a bacia do rio Paraguaçu, *H. jaguar* e *H. chrysostiktos*. Contudo, Birindelli *et al.* (2007) ressaltam que *H. chrysostiktos* apresenta características anatômicas compatíveis com o gênero *Pterygoplichthys* (Hypostomini). De fato, as amostras de *H. chrysostiktos* diferiram das congêneres em todas as análises realizadas. Do ponto de vista morfométrico, a principal diferenciação dessa espécie envolve a cabeça mais deprimida dorso-ventralmente e a abertura do disco-oral e cintura peitoral mais alargada (Figuras 10 a 12). Tais peculiaridades permitiram separar *H. chrysostiktos* em relação aos demais morfotipos com 100% de confiabilidade no dendrograma de UPGMA baseado na variação da forma (Figura 13).

Todavia, análises morfológicas e morfométricas nem sempre são suficientes para estudos de complexos de espécies como é o caso dos *Hypostomus*, particularmente devido à influência de condições ambientais sobre o fenótipo (Clabaut *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2016). Dessa forma, a análise molecular por DNA *barcode* mostrou-se um complemento importante para respaldar a distinção de *H. chrysostiktos* como uma unidade taxonômica. A distância genética com base no COI entre essa espécie e as demais analisadas foi de 7% (Tabela 5), valor bem superior aos usualmente considerados (>2%) para diferenciação de espécies de

peixes por DNA *barcode* (e.g. Pereira *et al.*, 2011, 2013), recuperando-o como um agrupamento à parte (Figura 14). Esse resultado também foi corroborado pela rede de haplótipos, a qual revelou dois haplótipos exclusivos para *H. chrysostiktos* separados por 39 mutações dos demais representantes de bacias costeiras da Bahia (Figura 15). Com base na taxa de mutação proposta por Day *et al.* (2013) para Siluriformes africanos, sugere-se que o tempo de diversificação entre *H. chrysostiktos* e os demais morfotipos seja superior a 5 milhões de anos.

Do mesmo modo, o padrão cariotípico de *H. chrysostiktos* diverge notavelmente dos representantes de *Hypostomus* da Bahia. Enquanto todas as populações e espécies de *Hypostomus* de bacias hidrográficas costeiras na Bahia compartilham $2n=76$ (Bitencourt, 2011a, b, 2012) (Figura 16, Tabela 6), *H. chrysostiktos* apresenta $2n=52$.

Um cariótipo com 38 pares, acrocêntricos na sua maioria, conforme descrito em *H. cf. wuchereri* (Bitencourt, 2011a) e *H. aff. unae* (Bitencourt, 2011b, 2012) representa um caráter derivado para o gênero a partir da condição plesiomórfica proposta para Loricariidae ($2n=54$ com pares m/sm) (Artoni & Bertollo, 2001). De acordo com os autores, as espécies da região devem ter passado por extensos processos de fissão cêntrica, dando origem a cromossomos acrocêntricos e números diploides elevados (Bitencourt, 2011a, b, 2012).

Por outro lado, *H. chrysostiktos* parece ter seguido um caminho carioevolutivo particularmente distinto dos demais congêneres de bacias costeiras da Bahia ao apresentar um cariótipo mais conservado com a ocorrência de pelo menos uma fusão cêntrica. Esse rearranjo explicaria o número diplóide menor que 54, proposto para o ancestral da família, e resultaria no aumento de cromossomos de dois braços. De fato, ao comparar a fórmula cariotípica dos *Hypostomus* da Bahia, observa-se que *H. chrysostiktos* diferencia-se, entre outros aspectos (par portador das RONS), pelo maior número de pares metacêntricos e a presença de somente dois pares acrocêntricos (Tabela 6).

Adicionalmente, os dados moleculares evidenciaram maior similaridade genética entre *H. chrysostiktos* e representantes do gênero *Pterygoplichthys* tendo em vista a distância interespecífica entre *H. chrysostiktos* e espécies de *Pterygoplichthys* de 3%. Como resultado, *H. chrysostiktos* agrupa com valor de suporte de 99 a 100% com *P. etentaculatus* (rio São Francisco) e *P. pardalis* (bacias amazônicas), ao passo que se mostra em ramos separados das espécies de *Hypostomus* com *bootstrap* de 100%. Igualmente, todos os algoritmos testados (Figura 14, Tabela 7) recuperaram *H. chrysostiktos* como entidades independentes

de acordo com os critérios estabelecidos por Zhang *et al.* (2013) e Fujisawa e Barraclough (2013).

Corroborando a aparente relação genética, o padrão cariotípico de *H. chrysostiktos* é bastante similar ao descrito para o gênero *Pterygoplichthys*. Embora diferenças cromossômicas numéricas e estruturais sejam frequentes em *Hypostomus* (Bueno *et al.*, 2013), deve-se ressaltar que *H. chrysostiktos* compartilha mais semelhanças cromossômicas com *Pterygoplichthys* de bacias distintas do que com espécies congênicas de bacias próximas. Por exemplo, *P. anisitsi* (Alves *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2015), *P. joselimaianus* (Oliveira *et al.*, 2006), *P. multiradiatus* (Alves *et al.*, 2006) e *P. gibbiceps* (Alves *et al.*, 2006) de diferentes bacias hidrográficas do Brasil também apresentam $2n=52$ e poucos pares de acrocêntricos.

Os dados aqui gerados para *H. chrysostiktos*, apoiados pelas similaridades morfológicas com *Pterygoplichthys* reconhecidas pelos autores que a descreveram (Birindelli *et al.*, 2007), fornecem indícios para a realocação dessa espécie de *Hypostomus* para *Pterygoplichthys*. Assim, uma revisão taxonômica detalhada é recomendada para a espécie atualmente validada como *H. chrysostiktos*.

6.2 *Hypostomus unae*

H. unae é uma espécie reconhecida para a bacia do Recôncavo Sul (Sardeiro, 2012), porém a análise morfológica das amostras coletadas nesse trabalho identificou morfotipos compatíveis com essa espécie para as bacias do rio Pardo e do Leste (Rio Una), ampliando sua área de distribuição. No entanto, as populações desse morfotipo apresentaram sobreposição na análise morfométrica com a maioria dos demais morfotipos (Figuras 10 a 12), com destaque para *H. jaguar* (Figura 13).

Porém, diferenças genéticas por DNA *barcode* permitem considerar as amostras de *H. unae* como unidades evolutivas distintas. De fato, as amostras nomeadas como *H. unae* (Figura 14) são as que apresentam a maior divergência interespecífica depois de *H. chrysostiktos*, sendo de 2% em relação a todas as demais (Tabela 5). Deve-se observar que os exemplares de *H. unae* do Rio Una em Valença (Bacia do Recôncavo Sul) que agruparam com amostras de *H. jaguar* (Figura 14) parecem constituir um erro de identificação morfológica, já que as características da forma do corpo entre ambos os morfotipos são similares (Figura 13).

A abordagem com DNA *barcode* ainda revelou divergência críptica dentro do grupo *H. unae*. Tanto a árvore (Figura 14) quanto à rede de haplótipos (Figura 15) com base no COI revelam duas linhagens distintas: (1) espécimes da bacia do Recôncavo Sul e (2) amostras das bacias do rio Pardo e do Leste, com distância genética média de 2,5% e separação por, pelo menos, 16 mutações nos haplótipos entre ambas.

Os algoritmos também apoiam a separação de *H. unae* dos demais morfotipos como uma espécie independente, sendo que o GMYC ainda fornece suporte adicional à presença de formas crípticas dentro da denominação *H. unae* (Figura 14).

Em termos citogenéticos, há descrições cariotípicas prévias para o morfotipo *H. unae* do Recôncavo Sul por Bitencourt *et al.* (2011a) (citado como *H. cf. wuchereri*, porém renomeado como *H. unae* por Sardeiro, 2012) e nós adicionamos informações sobre *H. unae* do rio Pardo. No entanto, o padrão citogenético descrito por Bitencourt *et al.* (2011) ($2n=76$, $28m/sm+48st/a$) é mais similar ao encontrado para os morfotipos de *H. jaguar* ($2n=76$, $36m/sm+40st/a$) do que com os exemplares analisados citogeneticamente *H. unae* da bacia do Rio Pardo ($2n=76$, $24m/sm+52st/a$) no que tange ao número de cromossomos *st/a* e distribuição de heterocromatina (Tabela 6). Não foram obtidas metáfases satisfatórias para o exemplar de *H. unae* da bacia do Rio Serra da bacia do Recôncavo Sul. Ainda assim, os resultados citogenéticos corroboram a diferenciação das linhagens de *H. unae* das duas bacias. Portanto, recomenda-se uma profunda reavaliação dentro do grupo *H. unae* das bacias do Rio Pardo e Recôncavo Sul devido às evidências de formas crípticas ainda não formalmente descritas.

6.3 *Hypostomus* sp. n. 2

O morfotipo *Hypostomus* sp. n. 2 apresentou distância genética de baixa (1%) em relação aos *H. aff. wuchereri* + *H. wuchereri* + *H. brevicauda* a moderada (2%) em relação à *H. jaguar* e *H. unae* + *Hypostomus* sp. n. 1 (Tabela 5). Ainda assim, *Hypostomus* sp. n. 2 foi recuperada como um grupo independente estatisticamente confiável na árvore por NJ (Figura 14). A análise com dois dos algoritmos testados (GMYC e bPTP) também foi capaz de discriminar esse morfotipo como uma unidade taxonômica distinta. Todos os exemplares nomeados como *Hypostomus* sp. n. 2 compartilham um único haplótipo, separado por um número mínimo de seis mutações em relação aos demais morfotipos.

Citogeneticamente, esse morfotipo também se apresenta claramente distinguível pela fórmula cariotípica e, particularmente, pela presença de RONS múltiplas (Figura 16 e Tabela

6). Essas diferenças podem ser explicadas por inversões pericêntricas que alteram a morfologia cromossômica sem alteração do valor diploide ($2n=76$) e por mecanismos de transposição de cístrons ribossomais. De fato, a localização e o número de RONS são comumente utilizados como marcadores espécie-específicos em *Hypostomus* (Rubert *et al.*, 2016). Nesse sentido, a localização do DNAr 45S em dois pares conforme descrito para *Hypostomus* sp. n. 2 representa o primeiro caso de sistemas múltiplos de Ag-RONS descritos para a *Hypostomus* da Bahia, juntamente com *H. jaguar*, como descrito a seguir, apesar de frequente no gênero. Esse padrão é considerado um caráter apomórfico em teleósteos (Gornung, 2013), incluindo Loricariidae (Artoni & Bertollo, 1996), posicionando *Hypostomus* sp. n. 2 como um grupo derivado de Hypostomini.

Consequentemente, sugerimos que esse morfotipo deva ser tratado como uma espécie a ser validada, possivelmente endêmica da bacia do rio Itapicuru. Essa inferência é corroborada pela análise morfológica realizada por Pitanga (2015), o qual está descrevendo esse morfotipo como uma espécie nova. Esse dado ressalta a importância da Bacia do rio Itapicuru como zona de endemismo da ictiofauna costeira da Bahia (Costa, 2011; Sarmiento-Soares *et al.*, 2011) ao mesmo tempo que pode contribuir para o aumento da riqueza de espécies de Siluriformes para a região norte do estado, considerada reduzida até o momento (Camelier & Zanata, 2014).

6.4 *Hypostomus jaguar* + *Hypostomus* sp. n. 1 + *Hypostomus* aff. *wuchereri* + *Hypostomus wuchereri* + *Hypostomus brevicauda*

Diferenças morfológicas foram encontradas entre as demais amostras de bacias costeiras da Bahia que justificaram a separação dos morfotipos identificados como *H. jaguar*, *Hypostomus* sp. n. 1, *H. aff. wuchereri*, *H. wuchereri* e *H. brevicauda*. Contudo, a diagnose desses prováveis táxons é baseada em caracteres pouco robustos como padrão de coloração, sem diferenciação conspícua (ver itens 5.1.1, 5.1.4 a 5.1.7) de forma que foram reunidos em um mesmo grupo. Do mesmo modo, a morfometria geométrica revelou sobreposição na variação da forma entre esses morfotipos, permitindo distinguir apenas *H. jaguar* (rio Jequiriçá), *Hypostomus* sp. n. 1 (rio Preto do Criciúma/Contas) e *H. aff. wuchereri* (rio Gongogi/Contas) em escores opostos na análise de componentes principais (PCA) das vistas dorsal e ventral (Figuras 10 e 11). Ainda assim, outras populações desses morfotipos apresentaram-se indiferenciadas na forma do corpo (*H. jaguar* do rio Paraguaçu, *Hypostomus* sp. n. 1 do rio das Pedras e Preto do Costa e *H. aff. wuchereri* dos rios de Contas e Vieira).

A semelhança da forma nesses morfotipos também foi reforçada pelo dendrograma de UPGMA (Figura 13), com separação consistente apenas para *H. jaguar* (rio Jequiriçá e Paraguaçu). Por conseguinte, a variação da forma do corpo dentro e entre os morfotipos parece estar mais relacionada às diferenças ambientais do que genéticas, de modo que amostras de pequenos riachos tendem a ser mais parecidas entre si do que com rios de maior porte. Essa indicação está de acordo com a capacidade plástica dos loricarídeos (Covain *et al.*, 2015) e tem sido observada em outros grupos de peixes com notável radiação adaptativa como ciclídeos africanos (Clabaut *et al.*, 2007; Kavembe *et al.*, 2016). Assim, parece que a análise de morfometria geométrica para *Hypostomus* da Bahia seria mais informativa para avaliar adaptação ecológica que incertezas taxonômicas *per se*.

É interessante destacar que a espécie *H. jaguar* é considerada endêmica da bacia do rio Paraguaçu (Zanata *et al.*, 2013). No entanto, o morfotipo do rio Jequiriçá (bacia do Recôncavo Sul) também identificado como *H. jaguar* mostrou alta similaridade morfométrica, molecular e com as amostras da bacia do Paraguaçu (Figuras 10 a 12, 14, 15; Tabelas 5 e 6). O possível compartilhamento de unidades evolutivas entre as bacias do rio Paraguaçu e do Recôncavo Sul reforça a semelhança da ictiofauna para o grupo norte sugerido por Camelier e Zanata (2014). No entanto, é necessário avaliar as espécies descritas para a bacia do Recôncavo Sul, visto que estudos morfológicos indicam a distribuição de *H. unae* para localidade do rio Una (Sardeiro, 2012), embora os espécimes dessa população mostraram maior similaridade genética com o morfotipo *H. jaguar*. Contudo, o morfotipo endêmico da bacia do rio Paraguaçu apresentou RONS múltiplas evidenciando processo evolutivo independente do morfotipo encontrado no rio Jequiriçá (Recôncavo Sul). Ainda assim, não houve recuperação dos mesmos pelos algoritmos de delimitação de espécies reforçando a hipótese de processo de especiação incipiente.

Além disso, o agrupamento entre os morfotipos aqui reunidos é justificado pela análise com DNA *barcode*, a qual revelou divergência genética máxima de 1% entre eles (Tabela 5). Ressaltando a ausência de diferenciação evolutiva significativa, esses táxons não foram recuperados pelos algoritmos usualmente utilizados para delimitação de espécies a partir de sequências de COI. A única exceção foi o agrupamento recuperado pelo GMYC reunindo *H. aff. wuchereri* (rio Gongogi e Oricó/Contas) com *H. unae* do rio Serra (Recôncavo Sul). Esse resultado, corroborado pela presença de haplótipos mais diferenciados (Figura 15) (ver item 6.2).

As demais amostras desse grande grupo de morfotipos também incluem haplótipos distintos, porém discriminados por uma ou duas mutações. A rede de haplótipos resultante para esse agrupamento (Figura 15) assume um padrão de distribuição em estrela, típico de ocorrência de processos evolutivos independentes, porém recentes (Hurst, 2009). Todavia, o índice de fixação Φ_{ST} revelou acentuada estruturação genética (acima de 85%), considerando que valores acima de 25% já indicam divergência genética muito alta (Wright, 1978).

Novamente, esses dados apontam para a ocorrência de processos de especiação ainda que não tenha havido tempo suficiente para o acúmulo de mutações ou de diferenças morfológicas conspícuas que subsidiem a diferenciação dessas unidades evolutivas em unidades taxonômicas operacionais (Schmidt *et al.*, 2015). Assim, esse grupo de morfotipos de *Hypostomus* parece constituir mais um exemplo de “zona cinzenta” para a taxonomia (DeQueiroz, 2007), o que dificulta os estudos sobre biodiversidade, sendo recomendada a utilização de mais marcadores moleculares para interpretar a sua história evolutiva (Bittner *et al.*, 2010).

Ademais, a complexidade desse grupo de morfotipos se estende à variação cromossômica. A análise citogenética realizada no presente trabalho e em estudos prévios (Bitencourt *et al.*, 2011a, b, 2012) revelou diferenças nas fórmulas cariotípicas, principalmente devido a variação no número de cromossomos acrocêntricos (19 a 23 pares) e padrões de distribuição da heterocromatina (Tabela 6), com indícios de diversificação independente.

Os espécimes da bacia do Rio de Contas avaliados citogeneticamente por Bitencourt *et al.* (2011a, b, 2012), citados como *H. cf. wuchereri* (rio Mutum) e *H. aff. unae* (rio de Contas, Preto do Costa, Oricó e rio Preto do Criciúma), foram redescritos por Sardeiro (2012) como possíveis novas espécies. Em termos citogenéticos, os dois morfotipos são diferenciados principalmente quanto ao padrão de marcação da heterocromatina (Tabela 6). Esse resultado contradiz a baixa divergência genética nas sequências do COI desses morfotipos. Por sua vez, Pitanga (2015) sugere que *H. wuchereri* (bacia do rio Cachoeira) e *H. brevicauda* (bacia do rio Almada) sejam espécies válidas considerando caracteres morfológicos. No entanto, sugerimos que *H. wuchereri* seja reavaliada, quanto à distribuição geográfica, pois as análises moleculares fornecem indícios de sinonímia com os morfotipos da bacia do rio de Contas (Figura 14, Tabela 5). Contudo, há diferenças na fórmula cariotípica entre elas, sugerindo a ocorrência de distintas inversões pericêntricas.

Em geral, observa-se que as muitas das diferenças entre os morfotipos de *H. jaguar*, *Hypostomus* sp. n. 1, *H. aff. wuchereri*, *H. wuchereri* e *H. brevicauda* está relacionada à

variação cromossômica, muitas vezes sendo mais evidentes que diferenças no DNA mitocondrial. Situações similares já foram observadas em outros peixes caracterizados por complexos de espécies como *Astyanax* aff. *fasciatus* (Kavalco *et al.*, 2016) e *Chromaphyseion* (Völker *et al.*, 2007). Diante desse cenário, esses autores inferem características intrínsecas do genoma que levam a taxas de evolução cromossômica mais rápidas que a mitocondrial, embora os mecanismos subjacentes a esse fenômeno permaneçam obscuros (Kavalco *et al.*, 2016). No caso dos morfotipos de *Hypostomus* aqui agrupados, deve-se ressaltar que as diferenças cromossômicas são relacionadas a rearranjos estruturais e padrões de localização de regiões heterocromáticas, cujo papel efetivo no isolamento reprodutivo e na especiação é questionável (Allendorf & Luikart, 2007, Bitencourt *et al.*, 2011a). Assim, não é possível precisar se os cariomorfos descritos sejam um reflexo do isolamento populacional e efeitos de deriva ou se constituem marcadores espécie-específicos, especialmente porque eles foram encontrados em alopatria.

6.5 Inferências biogeográficas e evolutivas em *Hypostomus*

A similaridade da ictiofauna entre as bacias costeiras da região Atlântico leste foi recentemente documentada por Camelier e Zanata (2014). Segundo as autoras, a ictiofauna atual resulta de eventos de vicariância entre o sistema do rio São Francisco e as drenagens costeiras do Atlântico Leste. Aparentemente, a bacia do rio de Contas na região Central atua como barreira entre os grupos biogeográficos ao Norte e ao Sul dessa região, podendo representar uma zona de mistura faunística, especialmente com bacias como Recôncavo Sul (Pamponet *et al.*, 2008) e Paraguaçu (Camelier & Zanata, 2014).

Ao analisarmos os espécimes de *Hypostomus* pertencentes às seis bacias costeiras do estado da Bahia, verificamos que há marcante sobreposição na forma do corpo entre a maioria dos morfotipos com alto nível de similaridade por DNA *barcode*. Especificamente, o compartilhamento de caracteres morfológicos e genéticos para *Hypostomus* da bacia do Rio de Contas com as bacias do Recôncavo Sul, Paraguaçu e Itapicuru segue o padrão proposto por Camelier e Zanata (2014), evidenciando a íntima relação do grupo biogeográfico central com o grupo norte.

No caso da relação da ictiofauna entre as bacias do Rio de Contas e Itapicuru, alguns estudos assumem uma história evolutiva comum mais antiga (Jacobina *et al.*, 2009). O fato dessas bacias terem divergido há mais tempo que bacias adjacentes pode ter influenciado na maior diferenciação genética do morfotipo da bacia do rio Itapicuru em relação às demais,

justificando a separação desse morfotipo em uma provável nova espécie para o gênero, aqui nomeada como *Hypostomus* sp. n. 2 (item 6.3). De fato, sugere-se que muitas das bacias atuais dos estados da Bahia, Goiás e Minas Gerais tenham surgido por uma fratura do escudo cristalino brasileiro iniciada ainda na era Proterozóica (Costa & Inda, 1982) e sofrido com sucessivas movimentações tectônicas posteriores levando a períodos intercalados de conectividade entre bacias (Ribeiro, 2006).

Os eventos históricos de conexão podem explicar a semelhança entre a fauna da Região Atlântico Leste com as bacias do São Francisco e Alto Paraná, tal como verificado no agrupamento de *H. chrysostiktos* com *P. etentaculatus* e de *H. unae* com *Hypostomus* sp. (BIN de amostras do rio São Francisco) e *H. paulinus* (Alto Paraná) (Figura 14). Outros exemplos de relação ictiofaunística são citados entre as regiões hidrográficas do São Francisco, Alto Paraná e Atlântico Leste (Ribeiro *et al.*, 2011; Camelier & Zanata, 2014; Sarmento-Soares *et al.*, 2016), atualmente separadas por interflúvios como a Serra do Espinhaço (Alves *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2011). O relacionamento pretérito entre a ictiofauna do Atlântico Leste e Sudeste do Brasil é igualmente ilustrado pelo compartilhamento de grupos ancestrais evolutivamente próximos, tais como *Trichogenes* em bacias do Rio de Janeiro e Espírito Santo e os peixes da subfamília Copionodontinae da bacia do rio Paraguaçu (Bichuette *et al.*, 2008; Pinna *et al.*, 2010).

Adicionalmente, os resultados reforçam o papel da bacia do rio de Contas como intermediária para a distribuição ictiofaunística do grupo Central, uma vez que também foram verificadas conexões entre a bacia do rio de Contas e drenagens ao Sul, como rios Almada e Cachoeira. Juntamente com outros trabalhos genéticos (Almeida *et al.*, 2013; 2015) e de levantamentos da ictiofauna (Vari *et al.*, 2010; Cetra *et al.*, 2010), fica evidente a importância do rio de Contas e seus afluentes como *hotspot* de biodiversidade aquática e como áreas prioritárias para conservação. Portanto, é premente que sejam concentrados esforços para a gestão ambiental dos recursos hídricos dessa bacia, atualmente inserida em paisagens com acentuada degradação ambiental (Nogueira *et al.*, 2010).

Contudo, a diversificação e expansão do gênero *Hypostomus* parece estar profundamente relacionada à adaptação para a ampla diversidade de habitats da região Neotropical. Os cascudos ou acarís são organismos altamente especializados e com notável plasticidade fenotípica, o que teria facilitado a radiação explosiva do gênero na América do Sul (Lujan *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2016). A capacidade adaptativa tem sido um dos fatores responsáveis pela diversificação de grupos de peixes amplamente diversos como os ciclídeos africanos.

Nesse grupo, a preferência por nicho trófico e ocupação da coluna da água parece ser a principal causa para a variação na forma do corpo a despeito da baixa diferenciação genética do DNA mitocondrial (Clabaut *et al.*, 2007, Kerschbaumer *et al.*, 2014).

De modo análogo, a riqueza de espécies do gênero *Hypostomus* em bacias costeiras da Bahia teria como principal determinante a diversificação ecológica ao invés de diferenças genéticas propriamente ditas. Essa sugestão é corroborada por análises de ecologia alimentar de táxons simpátricos de *Hypostomus*, as quais verificaram que, apesar da similaridade na dieta, há diferenças entre locais e comportamentos em como algumas espécies explora o alimento (Villares-Junior *et al.*, 2016). Adicionalmente, estudos com grupo de peixes que apresentam complexos de espécies, muito comuns entre Characiformes e Siluriformes (Pereira *et al.*, 2013; Medrado *et al.*, 2015; Bijukumar *et al.*, 2015) têm descrito valores de distância genética abaixo do limite pré-estabelecido para a metodologia do DNA *barcode* (2%), incluindo casos em que a taxa evolutiva de genes mitocondriais é surpreendentemente menor que o esperado (Kavalco *et al.*, 2016).

Ao ampliarmos a análise comparativa da divergência intra e interespecífica para *Hypostomus* de outras bacias da região Neotropical (Anexo 1), é possível verificar que as seqüências de COI são usualmente reduzidas. Uma possível justificativa para a baixa divergência genética entre a maioria dos morfotipos de *Hypostomus* na Bahia seria o recente processo de expansão a partir do centro de origem no Sistema Hidrográfico Amazônico, norte da América do Sul (Day *et al.*, 2013, Silva *et al.*, 2016). Assim, as possíveis OTUs não teriam acumulado mutações suficientes para o estabelecimento do *barcode gap* ou de valores de distância acima de 2%, pois estariam no limite de divergência interespecífica, sugerindo especiação incipiente ou críptica.

Em concordância com essa hipótese, a baixa diversidade nucleotídica (<0,5), a alta diversidade haplotípica (>0,5) e o padrão estrelado da rede de haplótipos (Figura 15), evidente no grupo *H. jaguar*, *H. aff. wuchereri*, *Hypostomus* sp. n. 1, *Hypostomus* sp. n. 2, *H. brevicauda* e *H. wuchereri*, são condizentes com expansão territorial recente após gargalos populacionais ou efeito fundador (Grand & Bowen, 1998; Zhang *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2015). De modo semelhante, o valor do teste de neutralidade D de Tajima (-1,0082) apoia essa inferência, uma vez que valores abaixo de 0 indicam seleção positiva ou expansão populacional em curto período de tempo (Tajima, 1989), particularmente quando acompanhados de poucas mutações dos haplótipos em relação ao haplótipo central (Hurst, 2009), como observado para esses morfotipos.

Com base exclusivamente na análise do DNA *barcode* e os algoritmos de delimitação de espécies são propostas até cinco entidades taxonômicas independentes: *H. chrysostiktos* (rio Paraguaçu), *H. unae* (Rio Pardo e rio Una/Leste), *Hypostomus* sp. n. 2 (rio Itapicuru), *H. unae* (rio da Serra/Recôncavo Sul) e um grupo ainda confuso (*H. jaguar*, *Hypostomus* sp. n. 1, *H. aff. wuchereri*, *H. wuchereri* e *H. brevicauda*) que carece de maiores evidências para sua validação.

Diante desse cenário, a integração entre metodologias de análises moleculares se faz necessária, principalmente quando os valores de distância genética não são compatíveis para diferenciar grupos controversos como *Hypostomus* (Yang & Rannala, 2016). Ainda, esses dados devem ser acompanhados por avaliação de características biológicas e ecológicas do grupo para entender os processos biogeográficos que moldaram a radiação de espécies e linhagens dentro desse gênero. De fato, os hábitos sedentários dos *Hypostomus* (Britski, 1981) facilitam o endemismo (Castro, 1999) e a fixação das variações cromossômicas (Bitencourt *et al.*, 2011a, b, 2012), justificando a diversidade cariotípica encontrada. Por outro lado, a preferência por áreas de corredeiras e próximas a regiões de cachoeiras (Reis, 2003) pode ser uma justificativa para a expansão da distribuição dos *Hypostomus* visto que essas áreas são propícias para evento de captura de cabeceiras (Ribeiro *et al.*, 2011), além de influenciarem na dispersão de ovos e larvas.

Por fim, a redistribuição dos morfotipos de *Hypostomus* previamente descritas para as bacias costeiras da Bahia com base na taxonomia integrativa indica que elas compõem entidades evolutivas independentes em diferentes estágios de especiação. Assim, o entendimento da história evolutiva das populações e espécies desse gênero é essencial para uma classificação taxonômica mais precisa e para a elaboração de plano de gestão dessas bacias com vistas à conservação da riqueza ictiofaunística da região Atlântico Leste.

7. CONCLUSÕES

O uso da taxonomia integrativa foi útil para inferir sobre a diversidade de espécies, distribuição geográfica e padrões de endemismo de morfotipos de *Hypostomus* em bacias hidrográficas costeiras da Bahia, permitindo traçar as seguintes conclusões:

1. A alta diversidade morfológica de *Hypostomus* ao longo das bacias do Atlântico Leste parece ter maior relação com diferenças ambientais do que com a presença de táxons distintos;
2. Ainda assim, os dados morfométricos e genéticos oferecem fortes evidências para validar *H. chrysostiktos*, *H. unae* e *Hypostomus* sp. n. 2 como unidades taxonômicas para bacias costeiras da Bahia;
3. A maior similaridade citogenética e molecular entre *H. chrysostiktos* e representantes de *Pterygoplichthys* quando comparada com espécies congêneres sugerem que essa espécie seja taxonomicamente avaliada quanto à realocação no gênero *Pterygoplichthys*;
4. As indicações de espécies ainda não formalmente descritas, como *Hypostomus* sp. n. 2 da bacia do rio Itapicuru e formas crípticas (*H. unae*), alertam para a necessidade de esforços para conservação de riachos das bacias estudadas, caracterizadas por acentuado endemismo a despeito do estado avançado de degradação ambiental.
5. Por outro lado, os casos de incongruência ou não resolução espécie-específica para os diferentes marcadores em morfotipos de *Hypostomus* da Bahia (*e.g.*, *H. jaguar*, *H. brevicauda* e *H. wuchereri*) indicam que o gênero é composto por unidades evolutivas com divergência recente em processo de especiação incipiente. Essa hipótese é reforçada pelos baixos níveis de divergência genética no COI e compartilhamento de haplótipos entre populações e morfotipos dentro e entre as bacias estudadas;
6. Diante dos baixos valores de distância genética no DNA *barcode* em muitos dos morfotipos de *Hypostomus* estudados, a complementação das análises com o uso de diferentes algoritmos de delimitação de espécie, mostrou-se particularmente útil. Igualmente, a inclusão de outras sequências gênicas é recomendada para avaliar o grau de diferenciação genética dos morfotipos;
7. O gênero *Hypostomus* parece representar um exemplo de radiação adaptativa explosiva da ictiofauna Neotropical, combinando plasticidade fenotípica com rápida expansão, constituindo um modelo para o entendimento de processos de especiação similar ao descrito para os ciclídeos dos grandes lagos africanos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, DC.; ROHLF, FJ. & SLICE, DE. 2004. Geometric morphometric: ten years of progress following the 'revolution'. Italian Journal of Zoology, vol. 71, p. 5-16.

AFFONSO, PRAM. MIRANDA, VS; MEDRADO, AS.; JACOBINA, UP; BITENCOURT, JS; ALMEIDA, JS. & CARNEIRO, PLS. 2007. Chromosomes in focus: basic cytogenetics, light microscopy and the case of Neotropical fish. In: MÉNDEZ-VILAS, A. & DÍAZ, J. (Eds.). Badajoz: Modern Research and Educational Topics in Microscopy. Vol. 1, p. 370-377.

ALMEIDA, JS.; MIGUES, VH.; DINIZ, D.; AFFONSO, PRAM. 2015. A unique sex chromosome system in the knifefish *Gymnotus bahianus* with inferences about chromosomal evolution of Gymnotidae. Journal of Heredity, vol. 106, p. 177-183.

ALMEIDA, JS ; AFFONSO, PRAM.; DINIZ, D. ; CARNEIRO, PLS. & DIAS, AL. 2013. Chromosomal variation in the tropical armoured catfish *Callichthys callichthys* (Siluriformes, Callichthyidae): Implications for Conservation and Taxonomy in a Species Complex from a Brazilian Hotspot. Zebrafish (Larchmont, NY), vol. 10, p. 451-458.

AGAPOW, PM.; BININDA-EMONDS, OR.; CRANDALL, KA.; GITTLEMAN, JL.; MACE, GM.; MARSHALL, JC. & PURVIS, A. 2004. The impact of species concept on biodiversity studies. The Quarterly Review of Biology, vol. 79, p. 161-179.

AGENCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). 2012. Panorama da qualidade das águas superficiais do Brasil. Superintendência de Planejamento de Recursos Hídricos. Brasília:

AGOSTINHO, AA.; THOMAZ, SM. & GOMES, LC. 2005. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. Megadiversidade, vol. 1, p. 70-78.

AGUILAR, C.; WOOD, PL JR.; CUSI, JC.; GUZMAN, A.; HUARI, F.; LUNDBERG, M.; MORTENSEN, E.; RAMIREZ, C.; ROBLES, D.; SUAREZ, J.; TICONA, A.; VARGAS, VJ.; VENEGAS, PJ. & SITES, JWJr. 2013. Integrative taxonomy and preliminary assessment of species limits in the *Liolaemus walkeri* complex (Squamata, Liolaemidae) with descriptions of three new species from Peru. ZooKeys, vol. 364, p. 47–91.

ALBERT, MH.; LE, HL. & SMALL, CG. 2003. Assessing landmark influence on shape variation. Biometrika, vol. 90, n° 3, p. 669–78

ALLENDORF, FR. & LUIKART, G. 2007. Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing: Oxford. 642 p.

ALMEIDA-TOLEDO, LF.; DANIEL-SILVA, MFZ.; LOPES, CE. & TOLEDO-FILHO, SA. 2000b. Sex chromosome evolution in fish: second occurrence of a X_1X_2Y sex chromosome system in Gymnotiformes. Chromosome Research, vol. 8, p. 335-340.

ALVERSON, AJ. 2008. Molecular systematics and the diatom species. *Protist*, vol. 159. p. 339-353.

ALVES, AL.; BORBA, RS.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A. & FORESTI, F. 2012. Karyotypic diversity and evolutionary trends in the Neotropical catfish genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Comparative Cytogenetics*, vol. 6, n° 4, p. 443–452.

ALVES, AL.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A. & FORESTI, F. 2006. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica*, vol. 128, p. 1–9.

APRIL, J.; MAYDEN, RL.; HANNER, RH. & BERNATCHEZ, L. 2011. Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, vol. 108, n° 26, p. 10602-10607.

ARAI, K. 2011. *Fish Karyotypes - A Check List*. New York: Springer,

ACERO, PA. & BETANCUR-R, R. 2007. Monophyly, affinities, and subfamilial clades of sea catfishes (Siluriformes: Ariidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* vol. ,18, n°. 2, p. 133

ARMBRUSTER, JW. 2004. Phylogenetic relationships of the suckermouth armored catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society*, vol. 141, p. 1-80.

ARMBRUSTER, JW. 2011. Global Catfish Biodiversity. *American Fisheries Society Symposium.*, vol 77, p. 15–37.

Atlas das águas – Minas Gerais. (http://www.atlasdasaguas.ufv.br/jequitinhonha/resumo_jequitinhonha.html) consultado em 27/02/2015.

ARTONI RF. & BERTOLLO LAC. 1996. Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae): Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia*. vol. 49, p. 81-90.

ARTONI RF. & BERTOLLO LAC. 1999. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Genetica*. Vol. 106, p. 209-214.

ARTONI, RF. & BERTOLLO, LAC. 2001. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas*, vol. 134, n°. 3, p. 201-210.

ARTONI, RF.; VICARI, MR. & BERTOLLO, LAC. 2000. Citogenética de peixes neotropicais: métodos, resultados e perspectivas. Ciências Biológicas e da Saúde, vol. 6, p. 43-60.

BARRETT, JC.; FRY, B.; MALLER, J. & DALY, MJ. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics, vol. 21, n.º. 2, p. 263-265.

BARRETO, SB.; NUNES, LA.; SILVA, AT.; JUCA-CHAGAS, R.; DINIZ, D.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H. & AFFONSO, PRAM. 2015. Is *Nematocharax* (Actinopterygii, Characiformes) a monotypic fish genus? Genome, vol. 58, n.º5, p. 191-192.

BECKER, QMC.; DE CASTRO, RJ.; DA SILVA, AM. & VIZZOTTO, PC. 2014. Caracterização citogenética de duas espécies de *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) de tributários do rio vermelho, bacia do alto rio Paraguai. Biodiversidade, vol. 13, p. 1-12.

BECKER, S.; HANNER, R. & STEINKE, D. 2011. Five years of FISH-BOL: brief status report. Mitochondrial DNA, vol. 22, p. 3–9.

BENZAQUEM, DC.; OLIVEIRA, C.; DA SILVA BATISTA, J.; ZUANON, J. & PORTO, JIR. 2015. DNA Barcoding in Pencilfishes (Lebiasinidae: Nannostomus) reveals cryptic diversity across the Brazilian Amazon. PLoS ONE, vol. 10, n.º 2, p. e0112217.

BERTOLLO, LAC.; BORN, GG.; DERGAM, JA.; FENOCCHIO, AS. & MOREIRAFILHO, O. 2000. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. Chromosome Research, vol. 8, p. 603-613.

BICHUETTE, ME.; RANTIN, B.; HINGST-ZAHER, E. & TRAJANO, E. 2015. Geometric morphometrics throws light on evolution of the subterranean catfish *Rhamdiopsis krugi* (Teleostei: Siluriformes: Heptapteridae) in eastern Brazil. Biological Journal of the Linnean Society, vol. 114, p. 136–151.

BIJUKUMAR. A.; SMRITHY, R.; SURESHKUMAR, U. & GEORGE, S. 2015. Invasion of South American suckermouth armoured catfishes *Pterygoplichthys* spp. (Loricariidae) in Kerala, India - a case study. Journal of Threatened Taxa, vol. 7, n. 3, p. 6987–6995.

BIRINDELLI, JLO.; ZANATA, AM. & LIMA, FCT. 2007. *Hypostomus chrysostiktos*, a new species of armored catfish (Siluriformes: Loricariidae) from rio Paraguaçu, Bahia State, Brazil. Neotropical Ichthyology, vol. 5, n. 3, p. 271-278.

BITENCOURT, JA. 2010. Análise Citogenética de espécies do gênero *Hypostomus* (Loricariidae; Hypostominae) das bacias do rio de Contas e Recôncavo Sul/Bahia. Londrina:

Universidade Estadual de Londrina. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular. 107p.

BITENCOURT, JA.; AFFONSO, PRAM.; GIULIANO-CAETANO, L. & DIAS, AL. 2011a. Identification of distinct evolutionary units in allopatric populations of *Hypostomus* cf. *wuchereri* Günther, 1864 (Siluriformes: Loricariidae): karyotypic evidence. Neotropical Ichthyology, vol. 9, nº. 2, p. 317-324.

BITENCOURT, JA.; AFFONSO, PRAM.; GIULIANO-CAETANO, L. & DIAS, AL. 2011b. Heterochromatin heterogeneity in *Hypostomus* prope *unae* (Steindachner, 1878) (Siluriformes, Loricariidae) from Northeastern Brazil. Comparative Cytogenetics, vol. 5, nº. 4, p. 329-344.

BITENCOURT, JA.; AFFONSO, PRAM.; GIULIANO-CAETANO, L.; CARNEIRO, PLS. & DIAS, AL. 2012. Population divergence and peculiar karyoevolutionary trends in the loricariid fish *Hypostomus* aff. *unae* from northeastern Brazil. Genetics and Molecular Research, vol. 11, nº. 2, p. 933-943.

BITTNER L.; HALARY, S.; PAYRI, C.; CRUAUD, C.; REVIERS, B; LOPEZ, P. & BAPTESTE, E. 2010. Some considerations for analyzing biodiversity using integrative metagenomics and gene networks. Biology Direct, vol. 5, p. 47.

BLESSING, JJ.; MARSHALL, JC. & BALCOMBE, SR .2010. Humane killing of fishes for scientific research: a comparison of two methods. Journal Fish Biology, vol. 76, p. 2571-2577.

BOOKSTEIN, FL. 1991. Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 435p.

BRITO, MA.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. & SANTOS, S. 2015. DNA barcoding reveals high substitution rate and mislabeling in croaker fillets (Sciaenidae) marketed in Brazil: The case of “pescada branca” (*Cynoscion leiarchus* and *Plagioscion squamosissimus*). Food Research International, vol. 70, p. 40-46.

BRITO, MCM. 2007. Qualidade da água para irrigação na bacia do rio Itapicurú e risco de salinização no projeto de irrigação Ponto Novo-Ba. Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. 53 p.

BRITO, PM.; MEUNIER, FJ. & LEAL, MEC. 2007. Origine et diversification de l'ichthyofaune Neotropical: Une revue. Cybium, vol.31, nº.2, p. 139-153.

BRITSKI, H. A. 1981. Sobre um Novo Gênero e Espécie de Sorubiminae da Amazônia (Pisces, Siluriformes). Papéis Avulsos de Zoologia, vol. 34, nº 7, p.109-114.

BUCKLIN, A.; STEINKE, D. & BLANCO-BERCIAL, L. 2011. DNA Barcoding of marine Metazoa. Annu Rev Mar Sci, vol. 3, p. 471-508.

BUENO, VS.; VENERE, PC.; ZAWADZKI, CH. & MARGARIDO, VP. 2013. Karyotype diversification in *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): biogeographical and phylogenetic perspectives. Reviews in Fish Biology and Fisheries, vol. 23, p. 103-112.

BUENO, VS.; ZAWADZKI, CH. & MARGARIDO, VP. 2012. Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. Reviews in Fish Biology and Fisheries, vol. 22, p. 241-250.

BURGER, R.; ZANATA, AM. & CAMELIER, P. 2011. Estudo taxonômico da ictiofauna de água doce da bacia do Recôncavo Sul, Bahia, Brasil. Biota Neotropica, vol. 11, nº. 4, p. 273-290.

BURGHART, SE.; VAN WOUDEMBERG, L.; DANIELS, CA.; MEYERS, SD.; PEEBLES, EB. & BREIBART, M. 2014. Disparity between planktonic fish egg and larval communities as indicated by DNA barcoding. Marine Ecology Progress Series vol. 503, p. 195–204.

CAMELIER, P. & ZANATA, AM. 2014. Biogeography of freshwater fishes from the Northeastern Mata Atlântica freshwater ecoregion: distribution, endemism, and area relationships. Neotropical ichthyology, vol.12, nº 4, p. 683-698.

CAMELIER, P. 2010. Estudo taxonômico e aspectos biogeográficos da ictiofauna de água doce de drenagens costeiras do Estado da Bahia, Brasil, com a descrição de seis espécies novas. Universidade Federal da Bahia, Salvador. Dissertação de Mestrado em Diversidade animal. 223 p.

CARDOSO, YP.; ALMIRÓN, A.; CASCIOTTA, J.; AICHINO, D.; LIZARRALDE, MS. & MONTOYA-BURGOS, JI. 2012. Origin of species diversity in the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) inhabiting the Paraná river basin, with the description of a new species. Zootaxa, vol. 3453, p. 69–83.

CARREGOSA, RA. & ANDRADE, HO. 2012. Análise Preliminar da Pluviometria na Bacia Hidrográfica do Rio de Una, Chapada Diamantina - BA. Manaus. Revista GeoNorte, 2012. vol. 1. p. 370-381.

CARVALHO, DC.; OLIVEIRA, DAA.; POMPEU, PS.; LEAL CG.; OLIVEIRA, C. & HANNER, R. 2011. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River Basin. *Mitochondrial DNA*, vol. 22, p. 80-86.

CARVALHO, PH. 2011. Análises filogenéticas e filogeográficas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae). Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 129 p.

CARVALHO, PH.; LIMA, SMQ.; ZAWADZKI, CH.; OLIVEIRA, C. & DE PINNA, M. 2015. Phylogeographic patterns in suckermouth catfish *Hypostomus ancistroides* (Loricariidae): dispersion, vicariance and species complexity across a Neotropical biogeographic region, *Mitochondrial DNA Part A*, vol 27, nº5, p. 3590-3596

CASTRO, RMC. 1999. Evolução da ictiofauna de riachos sulamericanos: Padrões gerais e possíveis processos causais, p. 139-155. In: Caramaschi, E.P.; Mazzoni, R.; Peres-Neto, P.R. (Orgs.) *Ecologia de Peixes de Riachos*. Rio de Janeiro: Série Oecologia Brasiliensis. 260 p.

CASTRO, RMC.; Jucá-Chagas, R. 2008. *Lygnobrycon myersi* (Miranda-Ribero, 1956). In: Ministério do Meio Ambiente (Ed.) *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*, vol. II. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, p. 75-77.

CATALANO, SA.; GOLOBOFF, PA. & GIANNINI, NP. 2010. Phylogenetic morphometrics (I): the use of landmark data in a phylogenetic framework. *Cladistics*, vol. 26, p. 539–549.

Centro de Recursos Ambientais - CRA. 2001. Caracterização da Bacia Hidrográfica do Rio de Contas. Bahia.

CEREALI, SS.; POMINI, E.; ROSA, R.; ZAWADZKI, CH.; FROEHLICH, O. & GIULIANO-CAETANO, L. 2008. Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, vol. 7, nº. 3, p. 583–591.

CETRA, M.; SARMENTO-SOARES, LM. & MARTINS-PINHEIRO, RF. 2010. Peixes de riachos e novas Unidades de Conservação no sul da Bahia. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, vol. 5, p. 11-21

CHIACHIO, MC. 2009. Estudos filogenéticos na subfamília Hypoptopomatinae (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae) com base em sequências de DNA. Botucatu: Universidade Estadual Paulista. Tese de doutorado em Ciências Biológicas, área de concentração: Genética. 81 p.

CIOFFI, MB.; MARTINS, C. & BERTOLLO, LAC. 2010. Chromosomal spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evolutionary Biology*, vol. 10, n°271, p. 1-23.

CLABAUT, C.; BUNJE, PME.; SALZBURGER, W. & MEYER, A. 2007. Geometric morphometric analyses provide evidence for the adaptive character of the tanganyikan cichlid fish radiations. *Evolution*, vol. 61, p. 560–578.

COGHLAN, A.; EICHLER, EE.; OLIVER, S.G.; PATERSON, AH. & STEIN, L. 2005. Chromosome evolution in eukaryotes: a multi-kingdom perspective. *Trends in Genetics*, vol. 21, p. 673–682.

COLLINS, RA. & CRUICKSHANK, RH. 2013. The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*. vol. 13, n° 6, p. 969-975

COOK, LG.; EDWARDS, RD.; CRISP, MD. & HARDY, NB. Need morphology always be required for new species descriptions? *Invertebrate Systematics*, vol. 24, n°3, p. 322 – 326.

COSTA, LM. & INDA, HA. 1982. O aulacógeno do Espinhaço. *Ciências da Terra*, vol. 2, p. 13-18.

COSTA, WJEM. 2001. The Neotropical annual fish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, taxonomic revision and biogeography. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, vol. 12, n° 4, p. 333-383.

COSTA, WJEM. 2011. "*Hypsolebias nudiorbitatus*, a new seasonal killifish from the Caatinga of northeastern Brazil, Itapicuru River basin (Cyprinodontiformes: Rivulidae)." *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, vol. 22, n° 3, p. 221.

COSTA-SILVA, GJ.; RODRIGUEZ, MS.; ROXO, FF.; FORESTI, F. & OLIVEIRA, C. 2015. Using different methods to access the difficult task of delimiting species in a complex neotropical hyperdiverse group. *PLoS ONE*, vol. 10, n° 9, p. e0135075

COVAIN, R.; FISCH-MULLER, S.; OLIVEIRA, C.; MOL, JH.; MONTOYA-BURGOS, JI. & DRAY, S. 2016. Molecular phylogeny of the highly diversified catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae) reveals incongruences with morphological classification. *Mol. Phylogenet. Evolution*, vol. 94, p. 492-517.

CRACRAFT, J. 1983. Species concepts and speciation analysis. *Curr. Ornithol.* vol. 1, p. 159-187.

DAY, JJ.; PEART, CR.; BROWN, KJ.; FRIEL, JP.; BILLS, R. & MORITZ, T. 2013. Continental diversification of an African catfish radiation (Mochokidae: *Synodontis*). Syst. Biol. vol. 62, p. 351–365.

DAYRAT, B. 2005. Towards integrative taxonomy. Biol J Linn Soc, vol. 85, p. 407-415

DeQUEIROZ, K. 2005b. Different species problems and their resolution. BioEssays, vol. 27, n° 12, p. 1263-1269.

DeQUEIROZ, K. 2007. Species concepts and species delimitation. Syst. Biol. vol. 56, p. 879–886.

DeSalle, R.; Egan, M G. & Siddall, M. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. Phil Trans Royal Soc B, vol. 360, p. 1905-1916.

DURET, L. 2008. Neutral theory: The null hypothesis of molecular evolution. Nature Education, vol.1, p.218

ESCHMEYER, WN. 2016. Catalog of Fishes. California Academy of Sciences Available from: <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> (06> maio 2016).

ESSELSTYN, JA.; EVANS, BJ.; SEDLOCK, JL.; ALI, F.; KHAN, A.; LAWRENCE, R. & HEANEY, LR. 2012. Single-locus species delimitation : a test of the mixed Yule coalescent model, with an empirical application to Philippine round-leaf bats. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, vol.279, p. 3678–3686.

FERNANDES, CA.; ALVES, DS.; GUTERRES, AR. & MARTINS-SANTOS, IC. 2015. Cytogenetic analysis of two locariid species (Teleostei, Siluriformes) from Iguatemi River (Parana River drainage) in Brazil. Comparative Cytogenetics, vol. 9, p. 67–78.

FERRARIS, CJ Jr. 2007. Checklist of catfishes, recent and fóssil (Osteichthys: Siluriformes), and catalogue of siluriform primarytypes. Zootaxa vol. 1418, 628p.

FISCHER, F.(Org.). 2007. Baixo Sul da Bahia: uma proposta de desenvolvimento territorial. Coleção Gestão Social. Série Editorial CIAGS, Salvador. CIAGS/UFBA. 224 p.

FROESE, R. & PAULY, D. 2016. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org (12>jun 2016).

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, LF. 1993. A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using ‘*in vitro*’ short treatment with colchicine. Experientia, vol. 49, p. 810-813.

FORNEL, R. & CORDEIRO-ESTRELA, P. 2012. Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. In: MARINHO, J.R.; HEPP, L.U., FORNEL, R. Temas em Biologia. Erechim: Edifapes, 2012. 240 p.

FRANKHAM, R; BALLOU, JD; DUDASH, MR; ELDRIDGE, MDB; FENSTER, CB. & LACY, RC. 2012. Implicações de diferentes conceitos de espécie para conservação da biodiversidade. *Biological Conservation*, vol. 153, p. 25-31.

FU, Y.-X. & LI, W.-H. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, vol. 133, p. 693- 709.

FUJISAWA, T. & BARRACLOUGH, TG. 2013. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulated datasets. *Systematic Biology*, vol. 62, p. 707–724.

EHARA, M.; CRAWFORD, AJ.; ORRICO, VGD.; RODRÍGUEZ, A.; LÖTTERS, S.; FOUQUET, A.; BARRIENTOS, FA.; BRUSQUETTI, F.; DE LA RIVA, I.; ERNST, R.; URRUTIA, GG.; GLAW, F.; GUAYASAMIN, JM.; HÖLTING, M.; JANSEN, M.; KOK, PJR.; KWET, A.; LINGNAU, R.; LYRA, M.; MORAVEC, J.; POMBAL JR., JP.; ROJASRUNJAIC, FJM.; SCHULZE, A.; SENÁRIS, JC.; SOLÉ, M.; RODRIGUES, MT.; TWOMEY, E.; HADDAD, CFB.; VENCES, M. & JOHANN KÖHLER, J. 2014. High levels of diversity uncovered in a widespread nominal taxon: continental phylogeography of the Neotropical tree frog *Dendropsophus minutus*. *PLoS ONE*, vol. 9, n° 9: e103958.

GARRIDO, JM. 2003. Aplicação de modelo matemático de simulação com utilização de SIG à bacia do Rio Jiquiriçá – Bahia. Dissertação de Mestrado submetida ao Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Faculdade de Tecnologia da Universidade de Brasília. Brasília (DF). 227 p.

GIONGO, P.; SAMPAIO, VMS.; FERNANDES, A.; DERGAM, JA.; KAVALCO, KF.; PAZZA, R. 2014. Karyotypic diversity of *Astyanax asuncionensis* (teleostei characiformes) from sepotuba river microbasin (upper Paraguai basin). *Evolução e Conservação da Biodiversidade*, vol. 3, n° 2, p. 53-58.

GOLDSTEIN, PZ. & De SALLE, R. 2011. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery and description. *BioEssays*, vol. 33, p. 135–147.

GOLOBOFF, PA. & CATALANO, SA. 2011. Phylogenetic morphometrics (II): algorithms for landmark optimization. *Cladistics*, vol. 27, p. 42–51.

GOMES, LC.; PESSALI, TC.; SALES, NG.; POMPEU, OS. & CARVALHO, DC. 2015. Integrative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a Neotropical river basin. *Genetica*, vol.143, p. 581-588.

GORNUNG, E. 2013. Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the teleosts: A review of research. *Cytogenetic and Genome Research*, vol. 141, p. 90-102.

GREGORY, TR. 2005. DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature*, vol. 434, p. 1067.

GUERRA, M. 2004. FISH. Conceitos e aplicações na Citogenética. SBG, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 184 p.

GUERRA, M. 2012. Cytotaxonomy: the end of childhood. *Plant Biosystems*, vol. 146, n° 3, p.703-710.

HALL, TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, vol. 41, p. 95-98.

HAMMER, O.; HARPER, DAT. & RYAN, PD. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontologia Eletrônica*, vol. 4, p. 9.

HAUSDORF, B., 2011. Progress toward a general species concept. *Evolution*, vol. 65, p. 923– 931.

HEBERT, PDN.; CYWINSKA, A.; BALL, SL. & WAARD, JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B*, vol. 270, n°. 1512, p. 313-321.

HEBERT, PDN.; PENTON, EH.; BURNS, JM.; JANZEN, DH. & HALLWACHS, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astrapes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, n°. 41, p.14812–14817.

HEBERT, PDN.; STOECKLE, MY.; ZEMLAK, TS & FRANCIS, CM. 2004a. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, vol. 2, p. e312.

HEBERT, PDN.; STOECKLE, MY.; ZEMLAK, TS. & FRANCIS, CH. 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. *PLOS Biology*, vol. 2, n° .10, p. 1657-1663.

HIGUCHI, H.; Britski, HA. & Garavello, JC. 1990. *Kalyptodoras bahiensis*, a new genus and species of thorny catfish from northeastern Brazil (Siluriformes: Doradidae). *Ichthyological Explorations of Freshwaters*, vol. 1, n° 3, p. 219-226.

HOWELL, WM. & BLACK, DA. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, vol. 36, p. 1014-1015.

HUBERT, N. & RENNO, J. 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, vol. 33, p. 1414–1436.

HURST, LD. 2009. Genetics and the understanding of selection. *Nat Rev Genetic*. vol. 10, n°. 2. p. 83-93.

IVANOVA, NV.; ZEMLAK, TS.; HANNER, RH. & HEBERT, PDN. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, vol. 7, n°. 4, p. 544-548.

JACOBINA, U.; AFFONSO, PRAM.; CARNEIRO, PLS. & DERGAM, JA. 2009. Biogeography and comparative cytogenetics between two populations of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Ostariophysi, Erythrinidae) from coastal basins in the State of Bahia, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, vol. 7, p. 617-622.

JESUS, IS.; MEDEIROS, RLS.; CESTARI, MM.; BEZERRA, MA. & AFFONSO, PRAM. 2014. Analysis of metal contamination and bioindicator potential of predatory fish species along Contas River basin in northeastern Brazil. *Bulletin of Environmental and Contamination Toxicology*, vol. 52, p. 551-556.

JIN, Q.; HE, L. & ZHANG, A. 2012. A simple 2D nonparametric resampling statistical approach to assess confidence in species identification in DNA barcoding – an alternative to likelihood and Bayesian approaches. *PLoS ONE*, vol. 7, p. e50831.

KARANOVIC, T.; DJURAKIC, M. & EBERHARD, SM. 2015. Cryptic Species or Inadequate Taxonomy? Implementation of 2D Geometric Morphometrics Based on Integumental Organs as Landmarks for Delimitation and Description of Copepod Taxa. *Systematic Biology*. vol. 65, n° 2, p. 304-327.

KASAHARA, S. 2009. *Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, Brazil. 160 p.

KAVALCO, KF.; PAZZA, R.; BRANDÃO, KDO.; GARCIA, C.; BERTOLLO, LAC. & DE ALMEIDA-TOLEDO, LF. 2016. Chromosomal diversification higher than molecular variation in *Astyanax* aff. *fasciatus* (Teleostei, Characidae). *Zebrafish*. DOI: 10.1089/zeb.2016.1272

KAVEMBE, GD.; KAUTT, AF.; MACHADO-SCHIAFFINO, G. & MEYER, A. 2016. Eco-morphological differentiation in Lake Magadi tilapia, an extremophile cichlid fish living in hot, alkaline and hypersaline lakes in East Africa. *Mol. Ecol.*, vol. 25, n° 7, p. 1610–1625.

KENDALL, DG.; BARDEN, D.; CARNE, TK. & LE, H. 2009. Shape and shape theory. John Wiley e Sons, vol. 5. 318 p.

KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, vol. 16, n° 2, p.111–120.

KLEIN, AL. & MARTINS-FERREIRA, C. 2012. Espécies: o que são e como surgem? *Genética na Escola*, vol. 7, n° 2, p. 34-41.

KLINGENBERG, CP. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, vol. 11, n° 2, p.353-357.

KLINGENBERG, CP.; BARLUENGA, M. & MEYER, A. 2003. Body shape variation in cichlid fishes of the *Amphilophus citrinellus* species complex. *Biological Journal of the Linnean Society*, vol. 80, p. 397–408.

LECOINTRE, G.; AMÉZIANE, N.; BOISSELIER, M-C.; BONILLO, C. & BUSSON F. 2013. Is the species flock concept operational? The Antarctic shelf case. *PLoS ONE*, vol. 8, n° 8, p. e68787.

LEVAN, A.; FREDGA, K. & SANDERBERG, AA. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, vol. 52, p. 201-220.

LIMA, CRA. 2007. Utilização de técnicas multivariadas e de morfometria geométrica na discriminação de espécies do gênero *Rhinobastos* (Família Rhinobatidae) do nordeste do Brasil. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. Dissertação de Mestrado em Biometria. 80p.

LIMA, SMQ.; VASCONCELLOS, AV.; BERBEL-FILHO, WM.; LAZOSKI, C.; RUSSO, CAM, SAZIMA, I. & SOLÉ-CAVA, AM. 2016. Effects of Pleistocene climatic and geomorphological changes on the population structure of the restricted-range catfish *Trichogenes longipinnis* (Siluriformes: Trichomycteridae), *Systematics and Biodiversity*, vol. 14, n° 2, p. 155-170.

LIPSCOMB, D.; PLATNICK, N. & WHEELER, Q. 2003. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends Ecol Evol*, vol. 18, p.65-66.

LOWE-McCONNELL, RH. 1999. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. São Paulo: EDUSP. 534 p.

LUJAN, NK.; ARMBRUSTER, JW.; LOVEJOY, NR. & LOPEZ-FERNANDEZ, H. 2015b. Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes:

Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 82, p. 269–288.

LUNDBERG, JG. 1998. The temporal context for diversification of Neotropical fishes. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena CAS, Lucena ZMS, editors. *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre, Brazil: Edipucrs; p. 67–91.

LUO, A.; LAN, H.; LING, C.; ZHANG, A.; SHI, L.; HO, SYW. & ZHU, C. 2015. A simulation study of sample size for DNA barcoding. *Ecol Evol*, vol. 5, p. 5869-5879.

MACE, GM. 2004. The role of taxonomy in species conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, vol. 359, n°. 1444, p. 711-719.

MALLET, J. & WILLMOTT, K. 2003. Taxonomy: renaissance or Tower of Babel?. *Trends in Ecology & Evolution*, vol. 18, n°. 2, p. 57-59.

MALLET, J. 2008. Hybridization, ecological races, and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, vol. 363, p. 2971–2986.

MAURUTTO, FAM.; MANVAILER, LFS.; SCZEPANSKI, TS.; CESTARI, MM. & ARTONI, RF. 2012. Cytogenetic characterization of three allopatric species of *Hypostomus* Lacepede (1803) (Teleostei, Loricariidae). *Caryologia*, vol. 65, n° 4, p. 340-346.

MAYR, E., 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

MEDRADO, AS.; AFFONSO, PRAM.; CARNEIRO, PLS.; VICARI, MR.; ARTONI, RF. & COSTA, MA. 2015. Allopatric divergence in *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Characidae, *Incertae sedis*) inferred from DNA mapping and chromosomes. *Zoologischer Anzeiger*, vol. 257, p. 119–129.

MEDRADO, AS.; RIBEIRO, MS.; AFFONSO, PRAM.; CARNEIRO, PLS. & COSTA, MA. 2012. Cytogenetic divergence in two sympatric fish species of the genus *Astyanax* Baird and Girard, 1854 (Characiformes, Characidae) from northeastern Brazil. *Genet. Mol. Biol.* vol. 35, n° 4, p. 797-801.

MELO, BF.; BENINE, RC.; MARIGUELA, TC. & OLIVEIRA, C. 2011. A new species of *Tetragonopterus* Cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae: Tetragonopterinae) from the rio Jari, Amapá, northern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, vol. 9, p. 49–56.

MEYER, CP. & PAULAY, G. 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLOS Biology*, vol. 3, p. 2229–2238.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). 2006. *Caderno da região hidrográfica Atlântico Leste*. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Recursos Hídricos (Ed.), Brasília, DF. 156 p.

MOLINA, WF.; ALVES, DEO.; ARAÚJO, WC.; MARTINEZ, PA.; SILVA, MFM. & COSTA, GWWF. 2010. Performance of human immune stimulating agents in the improvement of fish cytogenetic preparations. *Genetics and Molecular Research*, vol. 9, p.1807-1814.

MONTEIRO, LR. & REIS, SF. 1999. *Princípios de Morfometria Geométrica*. Ribeirão Preto, Holos Editora Ltda, 188 p.

MONTOYA-BURGOS, JI.; MARINHO, MMF.; LANGEANI, F. & SERRA, JP. 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, vol. 12, p. 1855-1867.

MORA, C.; TITTENSOR, DP.; ADL, S.; SIMPSON, AGB. & WORM, B. 2011. How many species are there on earth and in the ocean? *PLoS Biol*, vol. 9, n° 8, p. e1001127

NEI, M. & KUMAR, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. 333 p.

NELSON, JS. 2006. *Fishes of the World*. 4^aed. John Wiley e Sons, 622 p.

NETTO, MRCB.; PAULS, E. & AFFONSO, PRAM. 2007. A standard protocol for obtaining fish chromosomes under post-mortem conditions. *Micron*, vol. 38, n° 3. p. 214–217.

NOGUEIRA, C.; BUCKUP, PA.; MENEZES, NA.; OYAKAWA, OT.; KASECKER, TP.; RAMOS NETO, MB. & SILVA, JMC. 2010. Restricted-range fishes and the conservation of Brazilian freshwaters. *Plos One*, vol. 5, n°. 6, p. 1-10.

OLIVEIRA, IA.; ARGOLO, LA.; BITENCOURT, JA.; DINIZ, D.; VICARI, MR. & AFFONSO, PRAM. 2016. Cryptic chromosomal diversity in the complex “*Geophagus*” *brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae). *Zebrafish*, vol. 13, p. 33-44.

OLIVEIRA, RR.; SOUZA, IL. & VENERE, PC. 2006. Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spilomma* Cardoso & Lucinda, 2003. *Neotropical Ichthyology*, vol. 4, p. 93–97.

OLIVEIRA, LC.; RIBEIRO, MO.; DUTRA, ES.; ZAWADZKI, CH.; PORTELA-CASTRO, ALB. & MARTINS-SANTOS. 2015. Karyotype structure of *Hypostomus* cf. *plecostomus* (Linnaeus, 1758) from Tapajós River basin, Southern Amazon: occurrence of sex chromosomes (ZZ/ZW) and their evolutionary implications. *Genetics and molecular research*, vol. 14, n° 2, p. 6625-6634.

PADIAL, JM.; MIRALLES, A.; DE LA RIVA, I. & VENCES, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in zoology*, vol. 7, p. 7-16.

PAMPONET, VCC.; CARNEIRO, PLS.; AFFONSO, PRAM.; MIRANDA, VS.; SILVA JUNIOR, JC.; OLIVEIRA, CG. & GAIOTTO, FA. 2008. A multi-approach analysis of the genetic diversity in populations of *Astyanax* aff. *bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Teleostei, Characidae) from Northeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, vol. 6, p. 621-630.

PANTE, E.; SCHOELINCK, C. & PULLANDRE, N. 2014. From integrative taxonomy to species description: one step beyond. *Systematic Biology*, vol. 64, p. 152–160.

DePAULA, FCF.; SILVA, DML. & SOUZA, CM. 2012. Tipologias Hidroquímicas das Bacias Hidrográficas do Leste da Bahia. *Rev. Virtual Quim.* vol. 4, n°. 4, p. 365-373.

PENG, Z.; HE S., WANG, J.; WANG, W. & R. DIOGO, 2006. Mitochondrial clocks and the origin of the major *Otocephalan* clades (Pisces: Teleostei): A new insight. *Gene*, vol. 370, p. 113-124.

PEREIRA, LHG. 2011. Identificação molecular dos peixes da bacia do Alto rio Paraná. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. Tese de doutorado em sistemática animal. 178 p.

PEREIRA, LHG.; HANNER, R.; FORESTI, F. & OLIVEIRA, C. 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics*, vol.14, n° 20, p.1-14.

PEREIRA, LHG.; MAIA, GMG.; HANNER, R.; FORESTI, F. & OLIVEIRA, C. 2011. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA*, vol. 22, p.71–79.

PERES, WAM.; BERTOLLO, LAC.; BUCKUP, PA.; BLANCO, DR.; KANTEK, DLZ. & MOREIRA-FILHO, O. 2012. Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition: karyotypic evidence in *Astyanax* “*bimaculatus* group” (Characiformes: Characidae). *Rev Fish Biol Fisheries*, vol. 22, n° 2, p. 519–526.

PERES-NETO, PR. 1995. Introdução a análises morfométricas. In: PERES-NETO, PR.; VALENTIN, JL. & FERNANDEZ, FAS. *Tópicos em Tratamento de Dados Biológicos*. Rio de Janeiro, Oecologia Brasiliensis, vol. 2, p. 57-89.

PINNA, MCC.; HELMER, JL.; BRITSKI, HA. & NUNES, LR. 2010. A new species of *Trichogenes* from the rio Itapemirim drainage, southeastern Brazil, with comments on the monophyly of the genus (Siluriformes: Trichomycteridae). *Neotropical Ichthyology*, vol. 8, n° 4, p. 707-717.

PINTO, RCABL. 2013. Caracterização da ictiofauna do rio Catolé Grande, no município de Itapetinga-BA. Itapetinga-BA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Dissertação Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento. 80 p.

PIRES, AC. & MARINONI, L. 2010. União entre DNA barcoding e taxonomia tradicional através da Taxonomia Integrativa: uma visão que contesta o debate questionando uma ou outra metodologia. *Biota Neotropica*, vol. 10, n°. 2, p. 339-346.

PITANGA, B. 2015. Estudo taxonômico de *Hypostomus* Lacèpède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) do Estado da Bahia, Brasil, com ênfase em *H. brevicauda* (Günther, 1864) e *H. wuchereri* (Günther, 1864). Salvador-BA. Universidade Federal da Bahia. Dissertação de mestrado em Diversidade Animal. 90 p.

PRENDINI, L. 2005. Comment on identifying spiders through DNA barcodes. *Can J Zoo*, vol. 183, p.481–91.

PULLANDRE, N.; LAMBERT, A.; BROUILLET, S. & ACHAZ, G. 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation, *Mol Ecol*. vol. 21 n°.8, p. 1864-1877.

RAMBAUT, A. & DRUMMOND, AJ. 2015b. TreeAnnotator v1.8.2: MCMC Output analysis. <http://beast.bio.ed.ac.uk>.

RAMBAUT, A.; SUCHARD, MA.; XIE, W. & DRUMMOND, AJ. 2013. Tracer v.1.6.0: MCMC Trace Analysis Tool. <http://beast.bio.ed.ac.uk>.

RAMOS, TPA.; RAMOS, RTC. & RAMOS, SAA. 2014. Ichthyofauna of the Parnaíba river Basin, Northeastern Brazil. *Biota Neotropica*. vol. 14, p. 1–8.

RATNASINGHAM, S. & HEBERT, PDN. 2013. A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS ONE*, vol. 8, n°. 7, p. e66213.

RATNASINGHAM, S. & HEBERT, PDN. 2007. “Bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>).” *Molecular Ecology Notes*, vol. 7, n°. 3, p. 355–364.

REIS, RE.; KULLANDER, SO., & FERRARIS Jr., C. 2003. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS. 729 p.

RIBEIRO, AC. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, vol. 4, n°. 2, p. 225-246.

RIBEIRO, AC.; LIMA, FCT. & MENEZES, NA. 2011. Biogeografia dos peixes de água doce da América do Sul. In: Claudio Carvalho; Eduardo Almeida. (Org.). *Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos*. 1ed. São Paulo: Roca, p. 261-276.

ROCHA, GRA. & SCHIAVETTI, A. 2007. Diversity of fish and fisheries from the Lake Encantada Environmental Protection Area, Ilhéus, Brazil. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, vol. 17, p.702-711.

ROHLF, FJ & MARCUS, LF. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends Ecol. Evol.* vol. 8, nº4, p. 129– 32

ROHLF, FJ, SLICE, D. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Syst. Zool.* vol. 39, p. 40–59

ROHLF, FJ. 2013. *TpsDIG2: Thin Plate Spline Digitizing Landmarks*. 2.16 ed. New York: State University of New York at Stony Brook, Stony Brook.

ROSA, KO.; ZIEMNICZAK, K.; DEBARROS, AV.; NOGAROTO. V.; ALMEIDA, MC.; CESTARI, MM.; ARTONI, RF. & VICARI, MR. 2012. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5SrDNA or telomere sequence vestiges. *Rev Fish Biol Fish.* vol. 22, nº 3, p. 739–749.

ROSA, RS. & LIMA, FCT. 2008. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. p. 9- 275 In: Machado, A. B. M., G. M. Drummond e A. P. Paglia (Eds.). *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção*, Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 897 p.

ROSA, RS. 2004. Diversidade e conservação dos peixes da Caatinga. In: SILVA, JMC.; TABARELLI, M.; FONSECA, MT. & LINS, LV. (Orgs). *Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação*. Brasília, MMA, p. 149-161.

ROSA, RS.; MENEZES, NA.; BRITSKI, HA.; COSTA, WJEM. & GROTH, F. 2005. Diversidade, padrões de distribuição e conservação dos peixes da caatinga. In: LEAL, IR.; TABARELLI, M. & SILVA, JMC. (Eds). *Ecologia e conservação da caatinga*. Recife: Editora UFPE, 822 p.

ROUHAN, G. & GAUDEUL, M. 2014. Plant taxonomy: an historical perspective, current challenges and perspectives. In *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols* (Besse, P., ed.), Versão online.

ROXO, FF.; ALBERT, JS.; SILVA, GSC.; ZAWADZKI, CH.; FORESTI, F. & OLIVEIRA, C. 2014. Molecular Phylogeny and Biogeographic History of the Armored Neotropical Catfish Subfamilies Hypoptopomatinae, Neoplecostominae and Otothyriinae (Siluriformes: Loricariidae). *PLoS ONE*, vol. 9, nº 8, p. e105564.

ROXO, FF.; OCHOA, LE.; SILVA, GSC. & OLIVEIRA, C. 2015. *Rhinolekos capetinga*: a new cascudinho species (Loricariidae, Otothyriinae) from the rio Tocantins basin and comments on its ancestral dispersal route. *ZooKeys*, vol. 481: 109–130.

ROXO, FF.; ZAWADZKI, CH.; ALEXANDROU, MA.; COSTA SILVA, GJ.; CHIACHIO, MC.; FORESTI, F. & OLIVEIRA, C. 2012. Evolutionary and biogeographic history of the subfamily Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Ecology and Evolution*, vol. 2, p. 2438–2449.

ROZAS, J.; LIBRADO P.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, JC.; MESSEGUER, X. & ROZAS, R. 2010. DnaSP, DNA Sequence Polymorphism version 5.10. Universitat de Barcelona. <http://www.ub.edu/dnasp/>. Acessado em 15 de outubro de 2014.

RUBERT, M.; DA ROSA, R.; ZAWADZKI, CH.; MARIOTTO, S.; MOREIRA-FILHO, O. & GIULIANO-CAETANO, L. 2016. Chromosome mapping of 18S ribosomal RNA genes in eleven *Hypostomus* Species (Siluriformes, Loricariidae): Diversity Analysis of the Sites. *Zebrafish*. doi: 10.1089 / zeb.2016.1279.

SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*, vol. 4, n°. 4, p. 406–425.

SANGER, F.; NICHLEN, S. & COULSON, AR. 1977. DNA Sequencing with chain-termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 74, n°. 12, p. 5463-5467.

SANTOS, ACdeA. 2005. Peixes. In: JUNCÁ, F. A; FUNCH, L. e ROCHA, W. (orgs.). *Biodiversidade e Conservação da Chapada Diamantina*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.

SARDEIRO, B. 2012. Uma nova espécie de *Hypostomus* Lacépède (Siluriformes: Loricariidae) da bacia do rio Paraguaçu e redescrição de *Hypostomus unae* (Steindachner, 1878), Estado da Bahia, Brasil. Dissertação (Mestrado em Diversidade Animal) – Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 64 p.

SARMENTO-SOARES, LM. & MARTINS-PINHEIRO, RF. 2009. A fauna de peixes na bacia do rio dos Frades e microbacias vizinhas, extremo sul da Bahia, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Prof. Mello Leitão - Nova Série*, vol. 26, p. 25-46.

SARMENTO-SOARES, LM.; BRITSKI, HA.; ANJOS, MS.; ZANATA, AM.; MARTINS-PINHEIRO, RF. & BARRETTO, MG. 2016. First record of genus *Imparfinis* from a northeastern coastal Brazilian river basin: *I. borodini* Mees & Cala, 1989 in Rio de Contas, Bahia. *Check List*, vol. 12, p. 1832-1848.

SARMENTO-SOARES, LM.; MARTINS-PINHEIRO, RF. & ARANDA, AT. 2007a. Evaluation of fish fauna in less explored aquatic systems of southern Bahia- BioBahia project-Parte II. Acesso em <http://www.nossosriachos.net>.

SARMENTO-SOARES, LM.; MAZZONI, R. & MARTINS-PINHEIRO, RF. 2007b. A fauna de peixes na bacia do Rio Peruípe, extremo Sul da Bahia. *Biota Neotropica*. vol. 7, n. 3. P. 291-308.

SARMENTO-SOARES, LM.; MAZZONI, R. & MARTINS-PINHEIRO, RF. 2008. A fauna de peixes dos Rios dos Portos Seguros, extremo Sul da Bahia, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão, Nova Série*, vol. 24, p. 119-142.

SARMENTO-SOARES, LM.; ZANATA, AM. & MARTINS-PINHEIRO, RF. 2011. *Trichomycterus payaya*, new catfish (Siluriformes: Trichomycteridae) from headwaters of rio Itapicuru, Bahia, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, vol. 9, n°. 2, p. 261-271.

SCHLICK-STEINER, B.; STEINER, FM.; SEIFERT, B.; STAUFFER, C.; CHRISTIAN E. & CROZIER, RH. 2010. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology*, vol. 55, p. 421–438.

SCHMIDT, TSB.; MATIAS RODRIGUES, JF. & VON MERING, C. 2015. Limits to robustness and reproducibility in the demarcation of operational taxonomic units. *Environ Microbiol*, vol. 17, p. 1689–1706.

SCHNEIDER, H. 2007. *Métodos de Análise Filogenética - Um Guia Prático*. 3ª Edição, Ribeirão Preto: Holos Editora, 200 p.

SCHAEFER, SA. 2003. Subfamily Hypoptopomatinae. p. 321-329. In: R.E. Reis, S.O. Kullander & C.J. Ferraris, Jr. (eds.), *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Brazil: Edipucrs, 627 p.

SEVERI, W.; EL-DEIR, ACA.; FELIX, RTS.; ARAUJO,IMS.; DA LUZ, SCS.; CALADO NETO, NA.; COSTA, BDF.; JUCÁ-CHAGAS, R. & BARRETTO, MG. 2010. Composição e abundância da ictiofauna na área de influencia dos reservatórios de Pedra e Funil, bacia do Rio de Contas, Bahia. In: MOURA, NA.; ARAÚJO, EL.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, MC.; PIMENTEL, RMM.; ALBUQUERQUE, UP. (Eds.) *Reservatórios do Nordeste do Brasil: biodiversidade, ecologia e manejo*. Bauru: NUPEEA, p. 541-572.

SILVA, de OA. 2008. Recursos hídricos, ação do estado e reordenação territorial: o processo de implantação da barragem e do distrito de irrigação de ponto novo no estado da Bahia - Brasil. Santiago de Compostela: Universidade de Santiago de Compostela. Tese de doutorado. Departamento de Geografia . 320 p.

SILVA, GS.; ROXO, FF.; LUJAN, NK.; TAGLIACOLLO, VA.; ZAWADZKI, CH. & OLIVEIRA, C. 2016. Transcontinental dispersal, ecological opportunity and origins of an

adaptive radiation in the Neotropical catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular ecology*. vol. 25, n° 7, p. 1511-1529.

SILVA-BRANDÃO, KL.; LYRA, ML. & FREITAS, AVL. 2009. Barcoding Lepidoptera: Current situation and perspectives on the usefulness of a contentious technique. *Neotrop Entomol*, vol. 38, p. 441–51

SLICE, D. 2007. Geometric Morphometrics. *Annual Review of Anthropology*, online. vol. 36: 261–281.

STULL, KE.; KENYHERCZ, MW. & L'ABBÉ, EN. 2014. Ancestry estimation in South Africa using craniometrics and geometric morphometrics. *Forensic Sci Int*. vol. 16. n° 245, p.206.e1-206.e7

SULLIVAN, JP.; LUNDBERG, JG. & HARDMAN, M., 2006. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriforms) using RAG1 and RAG2 nuclear gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 41, 636–662.

SUMMER, AT. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromation. *Exptl. Cell Res. Research*, vol. 75, p.304-306.

SWISS ACADEMY OF SCIENCES. 2007. The future of systematics in Switzerland: systematics as a key discipline in biology. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* vol. 45, p. 285–288

TAJIMA, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, vol. 123, p. 585-595.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 28, p. 2731-2739.

TELETCHEA, F. 2009. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, vol. 19, n° 3, p. 265-293.

TOCCHIO, LJ.; GURGEL-GONÇALVES, R.; ESCOBAR, LE. & PETERSON, AT. 2015. Niche similarities among white-eared opossums (Mammalia, Didelphidae): is ecological niche modelling relevant to setting species limits? *Zoologica Scripta*, vol. 44, p. 1–10.

TRINDADE, MEJ.; CETRA, M. & JUCÁ-CHAGAS, R. 2010. Ichthyofauna of the Ribeirão Limoeiro, Cachoeira River Basin, BA. *Biota Neotropica*, vol. 10, n° 4, p. 111-118.

UNMACK, P.; BARRIGA, JP.; BATTINI, MA.; HABIT, EM.; & JOHNSON, JB. 2012. Phylogeography of the catfish *Hatcheria macraei* reveals a negligible role of drainage divides in structuring populations. *Molecular Ecology*, vol. 27, p. 1263–1269.

VARI, RP.; ZANATTA, AM. & CAMELIER, P. 2010. New Species of *Cyphocharax* (Ostariophysi: Characiformes: Curimatidae) from the Rio de Contas Drainage, Bahia, Brazil. *Copeia*, vol. 3, n° 103, p. 382-387.

VILLARES-JUNIOR, GA.; CARDONE, IB. & GOITEIN, R. 2016. Comparative feeding ecology of four syntopic *Hypostomus* species in a Brazilian southeastern river. *Brazilian Journal of Biology*, Doi.org/10.1590/1519-6984.00915.

VÖLKER M.; SONNENBERT R.; RÁB P. & KULLMANN, H. 2007. Karyotype differentiation in *Chromaphyosemion* killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae). III: Extensive karyotypic variability associated with low mitochondrial haplotype differentiation in *C. bivittatum*. *Cytogenetic and Genome Research*, vol. 116, p. 116–126.

WARD, RD. 2012. FISH-BOL, a case study for DNA barcodes. *Methods Mol Biol.* vol. 858, p. 423-439.

WARD, RD.; HANNER, R. & HEBERT, PDN. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, vol. 74, n° 2, p. 329–356.

WARD, RD.; ZEMLAK, TS.; INNES, BH.; LAST, PR. & HEBERT, PDN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, vol. 360, n° 1462, p. 1847–1857.

WHEELER, QD. 2008. Introduction: toward the new taxonomy. In: Q.D. Wheeler (ed.), *The New Taxonomy. The systematics association special volume series 76*. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, p. 1–18.

WIEMERS, M. & FIEDLER, K. 2007. Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology*., vol. 4, n° 8, p. 1-16.

YANG, Z. & RANNALA, B. 2016. Species Identification by Bayesian Fingerprinting: A Powerful Alternative to DNA Barcoding. *bioRxiv*. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/041608>

ZANATA, AM. & CAMELIER, P. 2009. *Astyanax vermilion* and *Astyanax burgerai*: new characid fishes (Ostariophysi: Characiformes) from Northeastern Bahia, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, vol. 7, n° 2, p.175-184.

ZANATA, AM.; SARDEIRO, B. & ZAWADZKI, CH. 2013. A new dark-dotted species of *Hypostomus* Lacépède (Siluriformes: Loricariidae) from rio Paraguaçu, Bahia State, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, vol. 11, n° 2, p. 247-256.

ZAWADZKI, CH.; RENESTO E. & MATEUS, RP. 2008b. Allozyme analysis of *Hypostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the Rio Corumbá, Upper Rio Paraná Basin, Brazil. *Biochemical Genetics*, vol. 46, p. 755–769.

ZAWADZKI, CH.; RENESTO, E.; PERES, MP. & PAIVA, S. 2008a. Allozyme variation among three populations of the armored catfish *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Siluriformes, Loricariidae) from the Paraná and Paraguay river basins, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 31, n°. 3, p. 767-771.

ZAWADZKI, CH.; OLIVEIRA, AS.; OLIVEIRA, RR. & RAPP PY-DANIEL, L. 2015. *Hypostomus melanepheles*, a new armored catfish species from the rio Tapajós basin, Brazil (Teleostei: Loricariidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, vol. 26, p. 49-58

ZAWADZKI, CH.; TENCATT, LFC. & FROEHLICH, O. 2014. A new unicuspid-toothed species of *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Paraguai basin. *Neotropical Ichthyology*, vol. 12, p. 97-104.

ZELDITCH, ML.; SWIDERSKI, DL.; SHEETS, HD. & FINK, WL. 2004. *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer* (Elsevier, San Diego). 437 p.

ZHANG, J.; CAI, Z. & HUANG, L. 2006. Population genetic structure of crimson snapper *Lutjanus erythropterus* in East Asia, revealed by analysis of the mitochondrial control region. *J Mar Sci*, vol. 63, p. 693–704

ZHANG, J.; KAPLI, P.; PAVLIDIS, P. & STAMATAKIS, A. 2013. *A General Species Delimitation Method with Applications to Phylogenetic Placements*. *Bioinformatics* (Oxford, England), vol. 29, n° 22, p. 2869-2876

Anexo 1. Tabela de distancia interespecífica do gênero *Hypostomus* a partir de seqüências do gene COI depositadas no Genbank e BOLD Systems.

Morfotipos	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.	Artigo de ref.
1. <i>H. affinis</i>	-																					Pereira <i>et al.</i> ,2013
2. <i>H. alatus</i>	0.04	-																				De Carvalho <i>et al.</i> , 2011
3. <i>H. albopunctatus</i>	0.05	0.04	-																			Pereira <i>et al.</i> ,2013
4. <i>H. ancistroides</i>	0.01	0.04	0.05	-																		Pereira <i>et al.</i> ,2013
5. <i>H. auroguttatus</i>	0.05	0.03	0.01	0.04	-																	Pereira <i>et al.</i> ,2011
6. <i>H. brevis</i>	0.02	0.04	0.05	0.02	0.05	-																Pereira <i>et al.</i> ,2013
7. <i>H. cochliodon</i>	0.05	0.04	0.05	0.04	0.05	0.05	-															Cremer <i>et al.</i> , 2011
8. <i>H. commersoni</i>	0.01	0.04	0.05	0.01	0.04	0.01	0.04	-														Rosso <i>et al.</i> , 2012
9. <i>H. derbyi</i>	0.01	0.04	0.05	0.01	0.04	0.02	0.04	0.01	-													Pereira <i>et al.</i> ,2013
10. <i>H. heraldoi</i>	0.05	0.03	0.00	0.05	0.02	0.05	0.05	0.05	0.04	-												Pereira <i>et al.</i> ,2013
11. <i>H. hermanni</i>	0.04	0.00	0.04	0.04	0.03	0.05	0.04	0.04	0.04	0.03	-											Pereira <i>et al.</i> ,2013
12. <i>H. iheringii</i>	0.04	0.01	0.04	0.04	0.03	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.01	-										Pereira <i>et al.</i> ,2013
13. <i>H. lutkeni</i>	0.05	0.03	0.02	0.04	0.01	0.05	0.05	0.04	0.04	0.02	0.03	0.03	-									Frantini-Silva <i>et al.</i> ,2015
14. <i>H. microstomus</i>	0.04	0.01	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.01	0.02	0.04	-								Pereira <i>et al.</i> ,2013
15. <i>H. myersi</i>	0.04	0.01	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.01	0.02	0.04	0.01	-							Pereira <i>et al.</i> ,2013
16. <i>H. nigromaculatus</i>	0.04	0.01	0.04	0.04	0.03	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.01	0.02	0.04	0.02	0.01	-						Pereira <i>et al.</i> ,2013
17. <i>H. paulinus</i>	0.05	0.02	0.05	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	0.04	0.05	0.03	0.02	0.05	0.03	0.03	0.03	-					Pereira <i>et al.</i> ,2013
18. <i>H. regani</i>	0.05	0.01	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.01	0.02	0.04	0.02	0.01	0.01	0.04	-				Pereira <i>et al.</i> ,2013
19. <i>H. strigaticeps</i>	0.05	0.03	0.02	0.04	0.01	0.05	0.05	0.04	0.02	0.03	0.04	0.02	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	-				Pereira <i>et al.</i> ,2013
20. <i>H. topovae</i>	0.04	0.01	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.01	0.02	0.04	0.02	0.01	0.02	0.03	0.02	0.04	-		Pereira <i>et al.</i> ,2013
21. <i>Hypostomus</i> sp.	0.04	0.01	0.04	0.04	0.03	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.01	0.02	0.03	0.02	0.01	0.01	0.03	0.02	0.04	0.02	-	Pereira <i>et al.</i> ,2013

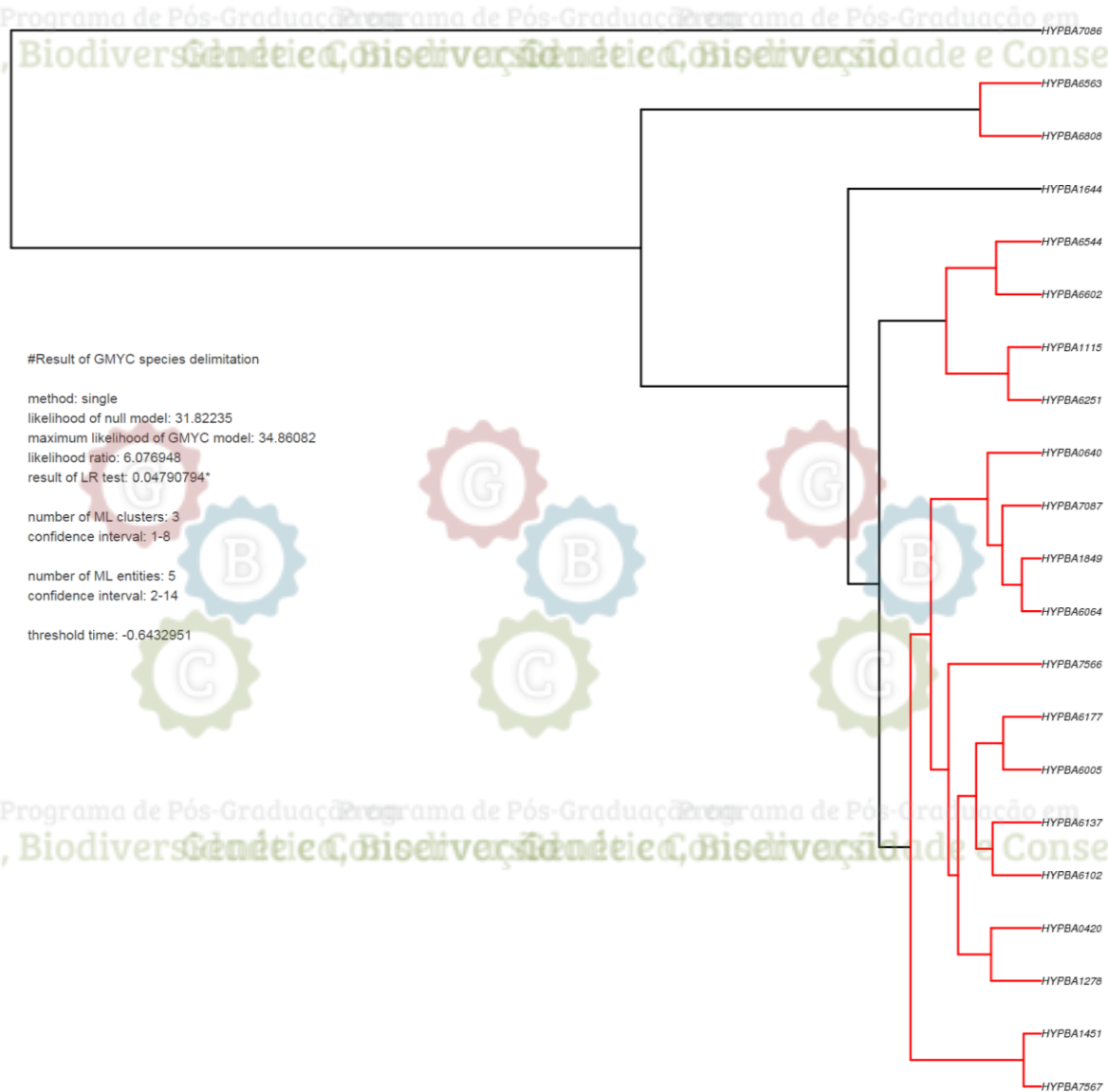
Obs.: Locais de coleta: **Bacia do rio Paraíba do sul** (*H. affinis*, *H. auroguttatus*); **Bacia do rio São Francisco** (*H. alatus*, *H. lutkeni*, *Hypostomus* sp.); **Bacia do Alto Paraná** (*H. albopunctatus*, *H. ancistroides*, *H. brevis*, *H. cochliodon*, *H. derbyi*, *H. heraldoi*, *H. hermanni*, *H. iheringii*, *H. microstomus*, *H. myersi*, *H. nigromaculatus*, *H. paulinus*, *H. regani*, *H. strigaticeps*, *H. topovae* e *Hypostomus* sp.) **Sistema Amazônico** (*H. commersoni*).

Anexo 2. Número de observações e percentual de classificação com base na Validação Cruzada.

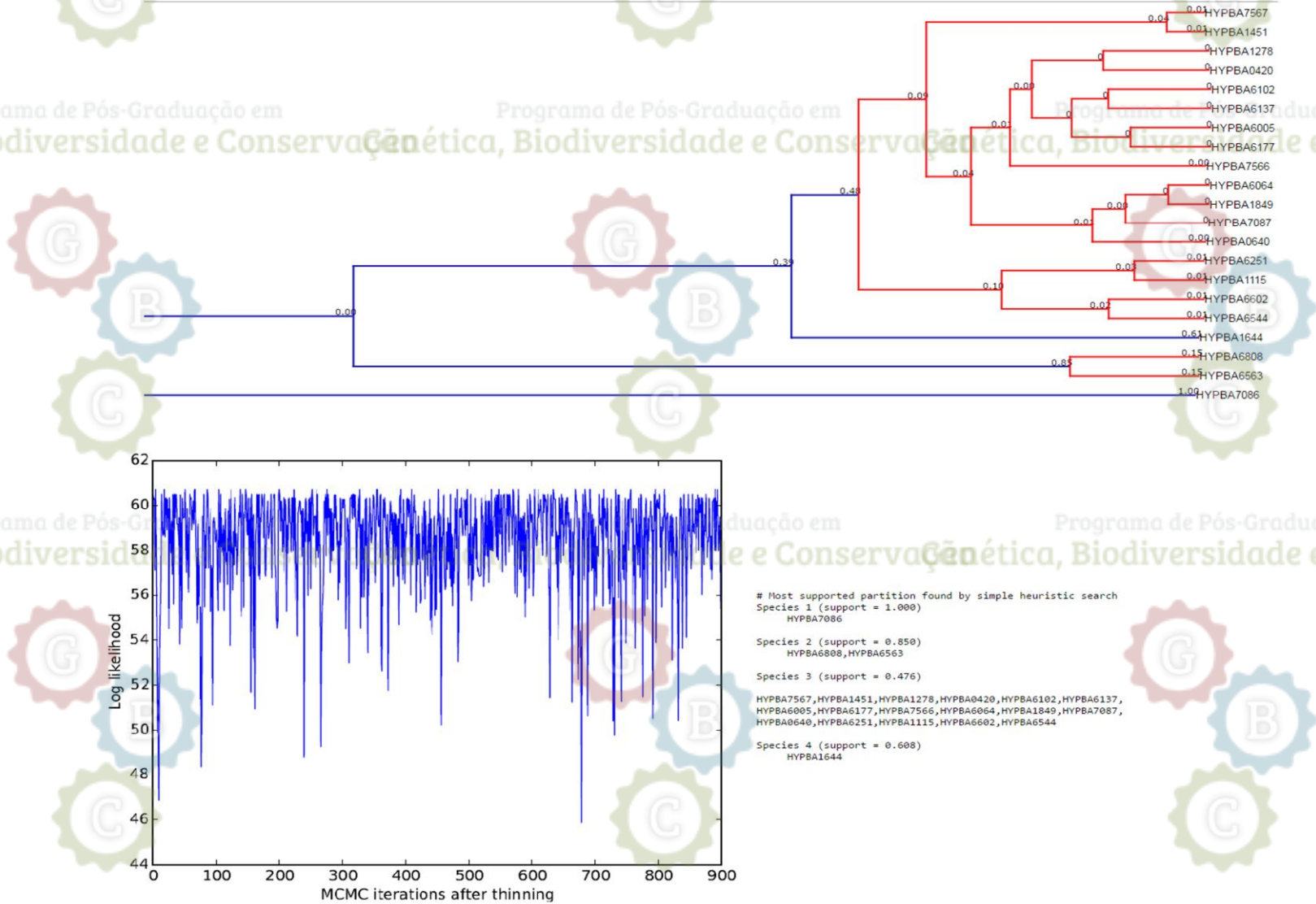
Dorsal									
	<i>H. aff. wuchereri</i>	<i>H. chrysostiktos</i>	<i>H. jaguar</i>	<i>H. breviceauda</i>	<i>Hypostomus sp. n. 1</i>	<i>H. unae</i>	<i>H. wuchereri</i>	N	%
<i>H. aff. wuchereri</i>	27	0	7	2	2	10	1	49	68.7%
<i>H. chrysostiktos</i>	2	13	0	0	0	2	0	17	
<i>H. jaguar</i>	8	1	27	0	2	3	0	41	
<i>H. breviceauda</i>	0	0	0	1	0	0	0	1	
<i>Hypostomus sp. n. 1</i>	7	0	2	0	44	3	1	57	
<i>H. unae</i>	0	0	5	0	5	35	0	45	
<i>H. wuchereri</i>	0	0	0	0	1	0	6	7	
Vental									
	<i>H. aff. wuchereri</i>	<i>H. chrysostiktos</i>	<i>H. jaguar</i>	<i>H. breviceauda</i>	<i>Hypostomus sp. n. 1</i>	<i>H. unae</i>	<i>H. wuchereri</i>	N	%
<i>H. aff. wuchereri</i>	34	1	5	0	6	3	0	49	72.0%
<i>H. chrysostiktos</i>	0	16	1	0	0	0	0	17	
<i>H. jaguar</i>	7	1	23	0	1	9	0	41	
<i>H. breviceauda</i>	0	0	0	1	0	0	0	1	
<i>Hypostomus sp. n. 1</i>	11	0	3	0	42	1	0	57	
<i>H. unae</i>	2	0	5	0	3	35	0	45	
<i>H. wuchereri</i>	0	0	0	0	0	0	7	7	
Lateral									
	<i>H. aff. wuchereri</i>	<i>H. chrysostiktos</i>	<i>H. jaguar</i>	<i>H. breviceauda</i>	<i>Hypostomus sp. n. 1</i>	<i>H. unae</i>	<i>H. wuchereri</i>	N	%
<i>H. aff. wuchereri</i>	39	0	1	0	7	2	0	49	79.3%
<i>H. chrysostiktos</i>	1	15	0	0	1	0	0	17	
<i>H. jaguar</i>	3	0	30	0	2	6	0	41	
<i>H. breviceauda</i>	0	0	0	1	0	0	0	1	
<i>Hypostomus sp. n. 1</i>	4	0	0	0	51	1	1	57	
<i>H. unae</i>	2	0	7	0	2	32	2	45	
<i>H. wuchereri</i>	0	0	0	0	2	1	4	7	

*N = número de espécimes por morfotipos; % = porcentagem geral para vista analisada.

Anexo 3. Árvore recuperada pela análise GMYC.



Anexo 4. Árvore recuperada pela análise bPTP e plot mostrando a convergência das cadeias.



Most supported partition found by simple heuristic search

- Species 1 (support = 1.000)
HYPBA7086
- Species 2 (support = 0.850)
HYPBA6808, HYPBA6563
- Species 3 (support = 0.476)
HYPBA7567, HYPBA1451, HYPBA1278, HYPBA0420, HYPBA6102, HYPBA6137, HYPBA6005, HYPBA6177, HYPBA7566, HYPBA6064, HYPBA1849, HYPBA7087, HYPBA0640, HYPBA6251, HYPBA1115, HYPBA6602, HYPBA6544
- Species 4 (support = 0.608)
HYPBA1644

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação