Livia Medeiros Cordeiro

**Distribuição, ecologia e filogeografia dos bagres troglóbios
do gênero *Trichomycterus* na área cárstica
da Serra da Bodoquena, MS
(Siluriformes: Trichomycteridae)**

São Paulo
Fevereiro, 2014

Lívia Medeiros Cordeiro

Distribuição, filogeografia dos bagres troglóbios do gênero *Trichomycterus* na área cárstica da Serra da Bodoquena, MS (Siluriformes:Trichomycteridae)

Ecology and phylogeography of *Trichomycterus* troglobitic catfish in Serra da Bodoquena karst area, MS (Siluriformes, Trichomycteridae)

São Paulo

Fevereiro, 2014

Lívia Medeiros Cordeiro

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para a
obtenção de Título de Doutor em
Ciências Biológicas, na Área de
Zoologia.

Orientadora: Prof. Dr. Eleonora Trajano

São Paulo

Fevereiro, 2014

Ficha Catalográfica

Cordeiro, Livia Medeiros

Distribuição, ecologia e filogeografia de bagres troglóbios do gênero *Trichomycterus* na área cárstica da Serra da Bodoquena, MS (Siluriformes: Trichomycteridae) 160p.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia.

1. Distribuição. 2. Populações. 3. Ecologia 4. Genética molecular. 5. Conservação

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Zoologia

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Orientador(a): Dra. Eleonora Trajano

Dedicatória

Dedico ao espeleólogo que desbravou muitas das cavernas percorridas durante este trabalho; ao amigo e mestre Luiz Bernardino, em reconhecimento à sua benemérita contribuição à espeleologia do Mato Grosso do Sul.

Agradecimentos

Um trabalho como este, que envolve várias fases de desenvolvimento e múltiplas ferramentas, não é possível sem o apoio fundamental de várias pessoas e instituições.

Sou imensamente grata à minha orientadora, Profa. Dra. Eleonora Trajano, pela confiança, paciência, orientação e amizade, em todos os níveis do meu aprendizado nesta caminhada e, principalmente, por ter me dado a oportunidade para desenvolver este trabalho tão especial.

Agradeço aos órgãos que suportaram esta pesquisa: CNPq (pela bolsa de Doutorado), CAPES-PROEX 2011/2012 e ao IB-USP (pelo auxílio com as expedições e aquisição de equipamentos). Às instituições que me apoiaram de alguma forma e em diferentes momentos: ICMBio/Parque Nacional da Serra da Bodoquena (em especial à Fernando Vilella e José Guilherme); à prefeitura Municipal de Bodoquena (Sr. Jomar);

À Dra. Erika Hingzt (Instituto Butantã), pela orientação em todas as etapas do estudo de morfometria geométrica e, ao Msc. Fábio Machado (IB-USP) pelas orientações quanto à preparação dos dados e sugestões nas análises.

À Dra. Janice Muriel-Cunha (UFPA, *campus* de Bragança), pela orientação na área de biologia molecular, através do auxílio nas análises de dados moleculares, acesso ao laboratório e equipamento e, também, pela oportunidade que tive de conhecer um pouco do patrimônio espeleológico da Amazônia com sua equipe e do norte do Pará.

Ao biólogo Jefferson Carneiro (UFPA, *campus* de Bragança) pela atenção e por ter compartilhado humildemente sua experiências práticas na rotina do laboratório de biologia molecular.

À Dr. Maria Elina Bichuette (UFSCar), pelas orientações e incentivo no estudo dos cavernícolas do Brasil e por conceder acesso, no início do trabalho, aos lotes de *Trichomycterus* do Mato Grosso do Sul.

Aos doutores da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul: ao Dr. Gustavo Graciolli pelo empréstimo de espécimes da coleção ZUFMS; ao Dr. Paulo Robson de Souza, pelas fotografias de espécimes vivos; ao MZUSP e aos doutores Oswaldo Oyakawa e Mário de Pinna pelo acesso à coleção ictiológica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

Aos doutores George Mattox e Heraldo Britski pelas consideráveis contribuições no momento da qualificação.

Ao Dr. William Sallun-Filho pelas trocas de idéias sobre a evolução geomorfológica da Serra da Bodoquena e por ceder mapas que foram utilizados nesta Tese.

Aos amigos do Laboratório da Profa. Eleonora (Ana, Preps, Sandro e Nada Mal) e do Departamento de Zoologia do IB/USP (Marcos, Karla, Júlia e Loboda).

À Eddir, do Hotel Florida, Bel e Ione, da Pousada Morraria, Landinha, amiga e guia de turismo de Bonito, Cesinha e Alfia, amigos de Bodoquena, pela hospedagem durante as expedições.

Devo muito aos bravos amigos que me ajudaram em campo, aguentando sol, chuva, frio, “quebra-corpo” e horas sem fim nas condições, por vezes, pouco ergonômicas e lamacentas das cavernas: a Tuta Barroco e Drica Castro, pelos treinamentos em mergulho em cavernas, e Edmundo Dinelli (Instrutores de Espeleomergulho), ambos pelos esforços feitos na tentativa de coletar mais espécimes no Buraco das Abelhas; a Cristiano Sampaio-Costa; Saulo Condes Fernandes; Cíntia Doutel Ribas; Alfie; Marciel; Taline; Alessandro Oliveira; Suzana Escarpinati e Tiago.

À Bruna Medeiros Cordeiro (irmã e geoespeleóloga), pelos mapas e formatação, e Paulo Calafati, por me auxiliar na redação e formatação desta Tese, com toda paciência e carinho nos últimos dias de conclusão do trabalho.

Deixo aqui também registrada minha gratidão especial a Rodrigo Borghezan pelo companheirismo nas diversas fases de trabalho, e aos seus pais, Marina e Olívio Borghezan, que sempre confiaram nossas expedições e, cujo o apoio nas idas e vindas de São Paulo ao Mato Grosso do Sul foram essenciais. São minha família do coração!

Aos amigos que deixaram meus dias mais iluminados, Nivaldo Ozório, Alice Jk, Marcio Soares e família, Monika Lozano, Alessandra Dumont, Livia Estrela, Denise Ono e Dr.

A minha mãe, Claudia Medeiros, pelo infinito amor, paciência e preocupação com a minha ausência na família e por aceitar minhas escolhas, sempre me motivando a seguir em frente, quando a missão parecia grande demais. Ao Guilherme Rondon, meu “pai-drasto” por me acolher fraternamente sempre.

Ao meu pai Celso Cordeiro, por ter plantado a semente acadêmica na família e ter me orientado e ensinado que “somente o que sabemos, ninguém nunca poderá nos roubar”. E, aos meus irmãos, Bruna, Júlia, Letícia, Felipe e Davi, pelo incentivo, confiança, alegria nos nossos encontros e por me apoiarem na busca dos meus espeleossônios.

Muitos, ainda, são importantes, mesmo que eu tenha deixado de agradecer aqui.

Sinceramente,

Muito obrigada!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL

1. O meio subterrâneo e os sistemas cársticos.....	1
2. Comunidades subterrâneas e evolução dos troglóbios.....	2
3. Ecologia populacional de troglóbios.....	4
4. Divergência das populações troglóbias.....	5
5. Peixes troglóbios e a família Trichomycteridae.....	6
6. Peixes troglóbios do gênero <i>Trichomycterus</i> na Serra da Bodoquena, MS:....	7
7. O conteúdo desta Tese.....	8
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
Capítulo 1 - Distribuição, ecologia e conservação dos bagres troglóbios do gênero <i>Trichomycterus</i> no carste da Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul (Siluriformes: Trichomycteridae).....	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Material.....	23
3.2. Área de estudo.....	24
3.2.1. Localidades estudadas.....	29
3.3. Prospecção de novas localidades e visita à localidades com ocorrência conhecida de bagres <i>Trichomycterus</i>	47
3.4. Coleta de exemplares.....	48

3.5.Coleta de dados.....	49
3.6.Distribuição de frequências de classes de comprimento-padrão, peso e fator de condição.....	49
3.7.Gruta do Urubu Rei: densidades e tamanhos populacionais e deslocamentos.....	50
3.8.Variáveis ambientais.....	54
4. RESULTADOS.....	54
4.1. Distribuição geográfica.....	54
4.2. Variações abióticas.....	55
4.3. Estudo populacional na Gruta do Urubu Rei.....	60
4.3.1.Densidades, tamanho populacional e deslocamentos individuais.....	61
4.3.2.Distribuição de frequências de classes de comprimento-padrão, peso e fator de condição.....	64
4.3.3.Pigmentação.....	72
4.4.Densidades populacionais, comprimento, peso, fator de condição e pigmentação em diferentes populações de <i>Trichomycterus</i> sp. 1 e <i>T. Dali</i>	73
5. DISCUSSÃO.....	92
5.1.Distribuição de bagres do gênero <i>Trichomycterus</i> no carste da Serra da Bodoquena.....	92
5.2.Variações intra- e interpopulacionais nas densidades populacionais, comprimento-padrão, peso e fator de condição <i>Trichomycterus</i> sp. 1 e <i>Trichomycterus dali</i>	96
5.3.Conservação dos peixes troglóbios <i>Trichomycterus</i> na Serra da Bodoquena.....	103
6. CONCLUSÕES.....	106

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
Capítulo 2 - Filogeografia de bagres subterrâneos do gênero <i>Trichomycterus</i> na área cárstica da Serra da Bodoquena: congruência entre forma e marcadores do mtDNA (Siluriformes: Trichomycteridae).....	112
RESUMO	113
ABSTRACT.....	114
1. INTRODUÇÃO.....	115
2. OBJETIVOS.....	119
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	119
3.1.Material	119
3.2.Área de estudo.....	120
3.3.Coleta de exemplares e fixação.....	123
3.4. Genética molecular.....	123
3.4.1. <i>Primers</i> utilizados.....	123
3.4.2.Extração de DNA, amplificação das regiões genômicas e sequenciamento.....	124
3.4.3.Análise dos dados.....	125
3.5. Morfometria geométrica.....	126
3.5.1. <i>Landmarks</i> utilizados.....	126
3.5.2. Coleta de dados.....	128
3.5.3. Análise de dados.....	128
4. RESULTADOS.....	129
4.1.Análises dos genes mitocondriais cit b, COI e 16S.....	129
4.2.Morfometria geométrica.....	136
4.3.Correlação entre genes e forma.....	147
4.4.Considerações taxonômicas	147

5.DISSCUSSÃO.....	150
6.CONCLUSÕES.....	152
ANEXO I -	161
ANEXO II	183

INTRODUÇÃO GERAL

Há muito tempo as cavernas despertam interesse para investigação biológica por abrigar uma fauna taxonomicamente diversificada e especializada à vida na ausência permanente de luz, exibindo uma notável convergência morfológica entre táxons não relacionados (BARR, 1968; POULSON, 1963; RACOVITZA, 2006; PORTER, 2007). De modo geral, a escuridão permanente e a menor oscilação temporal de variáveis ambientais nestes habitats proporcionam um relaxamento de certas pressões seletivas presentes no meio externo (TRAJANO, 2012). Assim, para se conhecer de forma ampla as peculiaridades dos ecossistemas subterrâneos, ou hipógeos, e promover ações efetivas para sua conservação, é necessário “mergulhar” nesse universo obscuro.

1. O meio subterrâneo e os sistemas cársticos

Em paisagens cársticas, os ecossistemas hipógeos aquáticos e terrestres podem ser especialmente complexos devido aos diferentes níveis de compartimentação dos sistemas subterrâneos (CULVER *et al.*, 2009). O carste é um relevo com hidrologia típica, resultante da combinação da alta solubilidade das rochas com o desenvolvimento de porosidade secundária em forma de condutos, desde protocondutos (canalículos com diâmetros milimétricos a centimétricos) até condutos de grandes dimensões, chamados de cavernas quando acessíveis ao homem (SALLUN-FILHO & KARMANN, 2013).

Apesar da extensão relativamente reduzida das áreas cársticas em superfície (cerca de 10% a 15% das áreas continentais), aproximadamente 25% da população mundial depende dos aquíferos cársticos para atender suas necessidades vitais (FORD & WILLIAMS, 2007). Além do valor significativo para a conservação dos recursos hídricos e da biodiversidade (devido ao elevado endemismo de espécies subterrâneas), essas regiões são de fundamental importância econômica pela presença de atividades turísticas associadas às feições cársticas. Um exemplo brasileiro importante de tal uso econômico do carste é a região de Bonito, no Mato Grosso do Sul, onde

cavernas submersas, ressurgências, rios cristalinos e cachoeiras com tufas calcárias são atrativos turísticos que movimentam a economia local (LOBO & MORETTI, 2009; BOGGIANI *et al.*, 2011; CORDEIRO *et al.*, 2013). Esta é a área de estudo onde desenvolvi a presente Tese.

Uma das feições marcantes da região da Serra da Bodoquena é a presença de grandes condutos submersos, alguns já explorados através de espeleomergulho, o que tornou a região um local importante para formação de mergulhadores técnicos no Brasil (NETO, 2010). Cavernas como o Buraco das Abelhas, uma das mais extensas da região, com 2 km de condutos mapeados e mais 60 m de profundidade, a Nascente da Ceita Curê, uma nascente freática desenvolvida em fenda vertical com 120 m de profundidade, e a Lagoa Misteriosa, uma das mais profundas do Brasil, com 220 m de desnível, são exemplos da presença de grandes sistemas de condutos freáticos exploráveis pelo homem (SALLUN-FILHO *et al.*, 2004). Assim, com a vasta rede de espaços subterrâneos, preenchidos total ou parcialmente por água, não é de se surpreender que populações de vários táxons colonizassem diferentes ambientes subterrâneos, formando comunidades altamente especializadas, o que instiga interessantes questões nas múltiplas áreas da biologia subterrânea.

2. Comunidades subterrâneas e evolução dos troglóbios

Há mais de 150 anos, os animais subterrâneos são classificados em três grandes categorias de acordo com sua relação ecológico-evolutiva com o meio subterrâneo, definidas primeiramente por Schiner, em 1854, e modificadas posteriormente por Racovitza, em 1907. Nestas categorias clássicas, os *troglóbios* são aqueles que habitam exclusivamente o ambiente subterrâneo, geralmente apresentando especializações denominadas troglomorfismos (sensu CHRISTIANSEN, 1962). Os *troglófilos* são habitantes facultativos, capazes de viver dentro ou fora do meio subterrâneo, e os *trogloxenos* são habitantes regulares das cavernas, mas que retornam periodicamente à superfície para alimentar-se (BARR & HOLSINGER, 1985). Muitos cavernícolas

podem ainda ser adaptados a viver no ambiente de solo profundo (edafobiontes) ou a habitarem aquíferos em terrenos calcários ou não (freatobiontes) (BARR, 1968).

TRAJANO (2012) sugere a aplicação do modelo fonte e sumidouro à classificação de Schiner-Racovitza e esta definição será utilizada na presente Tese pelo seu significado biológico. População-fonte é aquela que continua a crescer se isolada de migrantes e a população sumidouro, contrariamente, torna-se extinta se isolada da fonte (FONG, 2004). Assim, considerando-se esta definição, os *troglobios* são espécies constituídas por populações-fonte estritamente subterrâneas; os *troglofilos* incluem populações-fonte em ambos habitats, hipógeo e epígeo, com indivíduos deslocando-se entre esses habitats e promovendo a introgressão de genes selecionados em regimes seletivos epígeos nas populações subterrâneas (e vice-versa); e os *trogloxenos* são aqueles cujas populações-fonte encontram-se no meio epígeo, mas que usam regularmente recursos do meio subterrâneo (no caso dos chamados troglóxenos obrigatórios todos os indivíduos são dependentes tanto de recursos da superfície como do meio subterrâneo) (TRAJANO, 2012).

Os troglóbios podem ser reconhecidos por um conjunto de autapomorfias relacionadas ao regime seletivo particular do meio subterrâneo, denominadas troglomorfismos, dos quais os mais conspícuos e conhecidos são a redução dos olhos e da pigmentação melânica (BARR, 1968; CHRISTIANSEN, 2012). O termo troglomorfismo (sensu CHRISTIANSEN, 1962) designa características evolutivas regressivas e construtivas associadas com ao modo de vida subterrâneo. A evolução regressiva consiste na redução, até a perda total, ao longo da série de transformações de caracteres de estruturas ou funções (TRAJANO & BOCKMANN, 1999), tais como o número e tamanho de células pigmentares melânicas, a capacidade de sintetizar melanina e os fotorreceptores (WILKENS, 1988; FELICE *et al.*, 2008).

Regressões comportamentais análogas às morfológicas afetam caracteres tão diversos como o hábito criptobiótico, o comportamento fotonegativo e a ritmicidade circadiana (PARZEFALL & TRAJANO, 2010). Em contrapartida a tais perdas e às condições específicas do meio hipógeo, caracteres adaptativos (ou construtivos) incluem: aumento de reservas lipídicas,

aumento da resistência e da capacidade de estivação, seleção para a estratégia reprodutiva do tipo K, maior desenvolvimento de sistemas sensoriais não-visuais, principalmente quimorreceptores e mecanorreceptores (VANDEL, 1965; BARR, 1968; CULVER, 1982; HÜPPOP 2000).

3. Ecologia populacional de troglóbios

De um modo geral, as populações troglóbias apresentam baixas densidades populacionais devido à baixa disponibilidade de nutrientes e energia típica do meio subterrâneo, o que, associado à restrição geográfica observada em muitos casos (espécies endêmicas de um único sistema subterrâneo), resultam em populações reduzidas. No entanto, há exceções, tanto no que diz respeito à densidade populacional - caso de habitats com disponibilidade de alimento relativamente alta para a espécie em questão -, como quanto à distribuição, que pode ser relativamente ampla, no caso de espécies distribuídas por aquíferos extensos (embora, nestes casos, estudos detalhados venham revelando que se tratam, de fato, de várias espécies crípticas). Portanto, estudos devem ser feitos caso-a-caso (TRAJANO, 2001; 2003).

O monitoramento de espécies como os troglóbios, intrinsecamente susceptíveis à extinção, é essencial, não apenas por serem cientificamente relevantes, mas também para se estabelecer políticas efetivas de conservação dos frágeis ecossistemas subterrâneos e se levantar as ameaças, observadas em todo mundo, à sua sobrevivência (PROUDLOVE, 2001). Mesmo considerados essenciais para fundamentar a conservação, parâmetros populacionais como tamanho e densidade populacional, distribuição de faixas etárias e de fator de condição (estado de rigidez), deslocamentos individuais, área de vida, crescimento individual e outras características ecológicas foram estudadas em detalhe para um número relativamente reduzido de espécies troglóbias. Desta forma, estudos que venham a contribuir nesta área são extremamente relevantes para a ciência básica e aplicada.

4. Divergência das populações troglóbias

A diferenciação geográfica é um componente central nos estudos de biologia evolutiva com foco no processo de especiação (GOULD & JOHNSTON, 1972). No entanto, a delimitação de espécies de troglóbios pode ser particularmente difícil devido à tendência à ocorrência de homoplasias (regressão de caracteres selecionados pela luz como olhos, pigmentação melânica e desenvolvimento dos mesmos sistemas sensoriais não visuais) seja por convergência ou paralelismo (espécies subterrâneas originadas independentemente do mesmo ancestral epígeo), que comumente obscurecem a interpretação de suas relações filogenéticas (PORTER, 2007; NIEMILLER *et al.*, 2011).

Em troglóbios amplamente distribuídos, com populações ocorrendo em diferentes microbacias, é frequente observar-se um mosaico de variações interpopulacionais na forma corporal, refletindo certo grau de divergência genética, que pode ser por isolamento geográfico em maior ou menor grau. (KLINGENBERG, 2011; MONTEIRO & REIS, 1999; REIS *et al.*, 2006). A morfometria geométrica permite a quantificação e comparação de tais variações a partir de marcos anatômicos, capturando-os em diagramas (BOOKSTEIN, 1991; ROHLF, 1993). Esta é uma ferramenta moderna de grande poder discriminatório, importante para a compreensão dos processos de dispersão, isolamento e diversificação que, no caso dos troglóbios, pode ser o reflexo de mudanças pretéritas ocorridas no interior da rede de espaços subterrâneos de uma região.

Do mesmo modo, padrões filogeográficos são detectáveis a partir de estudos de divergência genética e de fluxo gênico (AVISE, 2000; KREJAC, 2005; PALANDAČIĆ *et al.*, 2011). A genética molecular é atualmente uma ferramenta importante para se detectar a presença de populações isoladas e de espécies crípticas (AVISE, 2000; NIEMILLER *et al.*, 2011; KALVACO & ALMEIDA-TOLEDO, 2007; PORTER, 2007; PEREIRA *et al.*, 2013). Por serem relativamente fáceis de acessar, não se recombinarem (e, portanto, coalescerem mais rápido) e por serem de

herança materna (com algumas exceções), os genes do genoma mitocondrial são extensivamente utilizados para análises filogeográficas (AVISE, 2004; 2009).

A ampliação do uso de análises moleculares para táxons subterrâneos tem fornecido uma fonte rica de discussão sobre o papel relativo dos modelos biogeográficos, particularmente da dispersão (habilidade do organismo deslocar-se e colonizar outros espaços) e da vicariância (isolamento de populações por barreiras geográficas) (PORTER, 2007; SBORDONI, *et al.* 2012; GROSS, 2012; PALANDAČIĆ, 2011). Assim, conhecer os padrões populacionais de divergência é um aspecto importante para se levantar e testar hipóteses sobre a história evolutiva dos organismos subterrâneos.

Obter evidências sobre o processo de especiação a partir de múltiplas fontes, integrando o conjunto de dados genéticos, morfológicos e ecológicos, constitui a abordagem mais robusta e confiável, que produz informações sobre a dinâmica das espécies (WILSON, 2013; GARNIER *et al.*, 2005). Este panorama integrativo é, também, o suporte básico para as ações de manejo e conservação no caso das espécies raras, endêmicas e/ou de baixas densidades demográficas como são, intrinsecamente, os animais troglóbios.

5. Peixes troglóbios e a família Trichomycteridae

Mais de 170 espécies de peixes troglóbios foram registradas em todos os continentes, exceto na Europa e Antártida, distribuídos em 10 ordens e 21 famílias; destes, uma diversidade expressiva de famílias e gêneros pertencentes à ordem Siluriformes (bagres e cascudos) é encontrada na região Neotropical (PROUDLOVE, 2010; MATTOX *et al.*, 2008; TRAJANO & BICHUETTE, 2010). Pré-adaptações (ou exaptações - estados de caráter desenvolvidos sobre um regime seletivo e que, por coincidência de condições, favorecem a vida em hábitat que apresenta regime similar - ARNOLD, 1994) à vida subterrânea são evidentes entre os peixes Siluriformes, favorecendo a origem da atual diversidade de espécies troglóbias nesta ordem. Os bagres

apresentam hábitos noturnos, orientam-se através de sistemas sensoriais químicos e mecânicos e muitas espécies são generalistas ou carnívoras oportunistas (VOLPATO & TRAJANO, 2006; TRAJANO, 2003).

Entre os peixes troglóbios brasileiros, Trichomycteridae é a família com maior número de representantes troglóbios (18 espécies na neotrópica e 12 no Brasil), seguida por Heptapteridae (13 espécies) (TRAJANO & BICHUETTE, 2010; BICHUETTE & RIZZATO, 2012; BICHUETTE *et al.* 2013). O monofiletismo da família Trichomycteridae é bem suportada por um carácter conspícuo que envolve o aparato opercular-interopercular provido de estruturas similares a dentes, que permite aos tricomictérídeos escalar substratos rochosos mesmo sob um intenso fluxo de água e, aos parasitas, ancorarem-se em seus hospedeiros (BASKIN, 1973; DATOVO & BOCKMANN, 2010).

Possivelmente, o comportamento tipicamente criptobiótico e a capacidade de escalar favoreceram a colonização do meio subterrâneo por representantes de diferentes gêneros desta família, tais como *Trichomycterus*, *Ituglanis*, *Silvinichthys* e *Glaphyropoma* (CASTELLANOS-MORALES, 2008; RIZZATO *et al.*, 2011; PROUDLOVE, 2010). O gênero *Trichomycterus*, aparentemente parafilético, compreende atualmente oito espécies nominais troglóbias: *T. chaberti* Durand 1968, da Bolívia; *T. spelaeus* DoNascimento, Villarreal e Provenzano 2001, da Venezuela; *T. sandovali* Ardila-Rodriguez 2006, *T. santanderensis* Castellanos-Morales 2007 e *T. uisae* Castellanos-Morales 2008, da Colômbia; e no Brasil, *T. itacarambiensis* Trajano & de Pinna 1996, *T. rubbioli* Bichuette & Rizzato e *T. dali* Rizzato, Costa-Jr., Trajano & Bichuette, 2011 (PROUDLOVE, 2010; RIZZATO *et al.*, 2011; BICHUETTE & RIZZATO, 2012), sendo esta última, o objeto de estudo da presente Tese. Populações troglófilas do gênero também são conhecidas de cavernas das bacias do São Francisco e Tocantins (MATTOX *et al.*, 2008).

6. Peixes troglóbios do gênero *Trichomycterus* na Serra da Bodoquena, MS:

Os primeiros exemplares de bagres troglomórficos do gênero *Trichomycterus* do Mato Grosso do Sul foram coletados por espeleomergulhadores no final da década de 1990, na caverna subaquática Buraco das Abelhas, município de Bonito. Espécimes troglomórficos do mesmo gênero foram coletados em 2000, na Gruta do Urubu Rei, no município de Bodoquena, caverna distante cerca de 100 km ao norte do Buraco das Abelhas. Em 2008, mais três localidades com populações troglomórficas de *Trichomycterus* foram confirmadas na bacia do Rio Salobra. Com base nos exemplares obtidos até este período, foi descrito *Trichomycterus dali*, mais de dez anos após a coleta dos primeiros bagres, tendo como localidade-tipo a Gruta Saracura, no município de Bonito.

Os exemplares coletados na Gruta do Urubu Rei possuem diferenças morfológicas em relação àqueles incluídos na descrição de *T. dali*. A população desta caverna apresenta uma adiposa pré-dorsal conspicua apenas em juvenis e notável variação intrapopulacional no grau de pigmentação melânica (CORDEIRO *et al.*, 2013). Isto, somado ao potencial para uma distribuição mais ampla devido à continuidade da área cárstica entre as populações conhecidas, e as pressões antrópicas sobre esses habitats, motivou as questões investigadas na presente Tese.

7. O conteúdo desta Tese

Esta Tese de doutorado teve por objetivo investigar a distribuição geográfica, diferentes parâmetros populacionais e os padrões filogeográficos dos peixes troglóbios do gênero *Trichomycterus* em cavernas da área cárstica da Serra da Bodoquena (MS), tendo como ponto de partida a distribuição previamente conhecida das populações. Este trabalho foi dividido em dois capítulos.

O primeiro capítulo refere-se às atividades realizadas em campo, que tiveram como objetivos investigar a área de distribuição dos bagres troglóbios do gênero *Trichomycterus* na área cárstica da Serra da Bodoquena, descrever os habitats onde ocorrem as diferentes populações, realizar o monitoramento populacional na Gruta do Urubu Rei e avaliar o *status* de conservação das

populações. Entre 2010 e 2012, foram realizadas nove expedições à área de estudo para a realização de propecções de novas localidades e para o estudo populacional na Urubu Rei, que incluiu censos visuais e, complementarmente, marcação-recaptura durante 2010 e 2011.

O segundo capítulo aborda a questão dos eventos evolutivos e unidades taxonômicas usando duas ferramentas, a biologia molecular e a morfometria geométrica, em um enfoque filogeográfico. A divergência genética e a distribuição geográfica de genealogias das populações foram investigadas através da análise de três marcadores mitocondriais (citocromo b, citocromo oxidase I e 16S). Através da morfometria geométrica, a variação da forma corporal entre linhagens divergentes é discutida no contexto ecomorfológico. Ambos os dados genéticos e morfogeométricos foram analisados em conjunto para se avaliar o grau de isolamento entre as populações investigadas. Nesse capítulo, são feitas considerações taxonômicas acerca da riqueza de espécies troglóbias do gênero *Trichomycterus*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNOLD, E. N. 1994. Investigating the origins of performance advantage: adaptation, exaptation and lineage effects. In EGGLETON, P., VANE-WRIGHT, R. (eds) *Phylogenetics and Ecology*. Linnean Society of London and Academic Press, p.123–168.
- AVISE, J. C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge: Harvard University Press, 447p.
- AVISE, J. C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. USA: Chapman and Hall, 511p.
- AVISE, J. C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, v.36, p.3-15.
- BARR, T. C. JR. 1968. Cave Ecology and Evolution of Troglóbites. *Evolutionary Biology*, v.2, p.35-97.
- BARR, T. C. JR.; HOLSINGER, J. R. 1985. Speciation in cave faunas. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.16, p.313-337.
- BASKIN, J. N. 1973. *Structure and relationship of the Trichomycteridae*. 389p. Dissertation (Doctoral) - City University of New York, New York.
- BICHUETTE, M. E.; RIZZATO P. P. 2012. A new species of cave catfish from Brazil, *Trichomycterus rubbioli* sp.n., from Serra do Ramalho karstic area, São Francisco River basin, Bahia State (Siluriformes: Trichomycteridae). *Zootaxa*, v. 3480, p.48-66.
- BICHUETTE, M. E.; RIZZATO, P. P.; CAMARGO, A. L.; BRANDI, R.; SENNA-HORTA, L. 2013. Um novo bagrinho troglóbico da Serra do Ramalho. A notável Serra do Ramalho, sudoeste da Bahia. *O Carste*, v.25, p.58-59.
- BOGGIANI, P. C.; TREVELIN, A. C.; SALLUN FILHO, W.; OLIVEIRA E. C.; ALMEIDA, L. H. S. 2011. Turismo e Conservação de Tufas Ativas da Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul. *Pesquisas em Turismo e Paisagens Cársticas*, v. 4, p. 55-63.
- BOOKSTEIN, F. L. 1991. Morphometric Tools for Landmark Data. *Geometry and Biology*, New York: Cambridge University Press.
- CASTELLANOS-MORALES, C. A. 2008. *Trichomycterusuisae*: a new species of hypogean catfish (Siluriformes: Trichomycteridae) from the northeastern Andean Cordillera of Colombia. *Neotropical Ichthyology*, v.6, p.307-314.
- CHRISTIANSEN, K. A. 1962. Proposition pour la classification des animaux cavernicoles. *Spelunca*, v.2, p.76-78 (in French).
- CHRISTIANSEN, K.A. 2012. Troglomorphism. In: CULVER, D. C.; WHITE, W. B. (Org.). *Encyclopedia of Caves*, 2nd ed., Chennai: Academic Press. p. 517-527.
- CORDEIRO, L. M.; BORGHEZAN, R.; TRAJANO, E. 2013. Distribuição, riqueza e conservação dos peixes troglóbicos da Serra da Bodoquena, MS (Teleostei: Siluriformes). *Revista da Biologia*, v.10, n.2, p. 21-27.
- CULVER, D. C.; PIPAN, T.; SCHNEIDER, K. D. 2009. Vicariance, dispersal and scale in the aquatic subterranean fauna of karst regions. *Freshwater Biology*, v.54, p. 918-929.

- CULVER, D. C. 1982. *Cave Life: Evolution and Ecology*. Cambridge, M A: Harvard University Press, 189p.
- DATOVO, A.; BOCKMANN, F. A. 2010. Dorsolateral head muscles of the catfish families Nematogenyidae and Trichomycteridae (Siluriformes: Loricarioidei): comparative anatomy and phylogenetic analysis. *Neotropical Ichthyology*, v.8, p.193-246.
- FELICE, V.; VISCONTI, M. A.; TRAJANO, E. 2008. Mechanisms of pigmentation loss in subterranean fishes. *Neotropical Ichthyology*, v.6, n.4, p.657-662.
- FONG, D. W. 2004. Intermittent pools at headwaters of subterranean drainage basins as sampling sites for epikarst fauna. In: W. K. JONES, W. V. COORD, D. C. CULVER; J. S. HERMAN. *Epikarst*. Proceedings of the symposium held October 1 through 4, 2003, Shepherdstown, Special Publication 9. Charles Town, WV: Karst Waters Institute, p.114-188.
- FORD, D.; WILLIAMS, P. 2007. *Karst hydrogeology and geomorphology*. John Wiley & Sons Ltd, 579p.
- GARNIER, S.; MAGNIEZ-JANNIN, F.; RASPLUS J. Y.; ALIBERT, P. 2005. When morphometry meets genetics: inferring the phylogeography of *Carabus solieri* using Fourier analyses of pronotum and male genitalia. *Journal of Evolutionary Biology* v.18, p.269-280.
- GOULD, S. J.; JOHNSTON, R. F. 1972. Geographic variation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.3, p. 457-498.
- GROSS, J. B. 2012. Cave Evolution. *John Wiley and Sons*, DOI: 10.1002/9780475902.a0023628. 2012.
- HÜPPOP, K. 2000. How do cave animals cope with the food scarcity in caves? In H. Wilkens, D. C. Culver, & W. F. Humphreys (eds). *Subterranean ecosystems*, Amsterdam: Elsevier, p.189-210.
- KAVALCO, K. F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. 2007. Molecular genetics of blind mexican tetra and comments on the karyotypic characteristics of the genus *Astyanax* (Teleostei: Characidae). *Zebrafish*, v.4, p.103-111.
- KLINGENBERG, C. P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*. v.11, p. 353-357.
- KREJAC, K. 2005. *Stygobite phylogenetics as a tool for determining aquiferevolution*. 2005, 115p. (Doctoral Thesis)-University of Texas, Austin.
- LOBO, H. A. S.; MORETTI, E. C. 2009. Sustentabilidade Ecológica do Espeleoturismo na Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul. *Turismo em Análise*, v.20, n.1, p.151-167.
- MATTOX, G. M. T.; BICHUETTE, M. L.; SECUTTI, S.; TRAJANO, E. Surface and subterranean ichthyofauna in the Serra do Ramalho karst area, northeastern Brazil, with updated lists of Brazilian troglobitic and troglophilic fishes. *Biota Neotropica*, v.8, n.4, p.145-152, 2008.
- MONTEIRO, R. L.; REIS, S. F. 1999. *Princípios de morfometria geométrica*. Ed. Hollos, 198p.
- NETO, J. L. B. 2010. Cavernas inundadas na Serra da Bodoquena. *O Carste*, v.2, p.34-38.
- NIEMILLER, M. L.; NEAR, T. J.; FITZPATRICK, B. M. 2011. Delimiting species using multilocus data: diagnosing cryptic diversity in the southern cavefish, *Typhlichthys subterraneus* (Teleostei: Amblyopsidae). *Evolution*, v. 66-3, p. 846-866.

- PARZEFALL, J.; TRAJANO, E. 2010. Behavioral patterns in Subterranean Fishes. In: TRAJANO, E.; BICHUETTE, M. E.; KAPOOR, B. G. (Org). *Biology of Subterranean Fishes*, 1ed. Enfield: Science Publishers, p. 81-114.
- PALANDAČIĆ, A.; BONACCI, O.; SNOJ, A. 2011. Molecular data as a possible tool for tracing groundwater flow in karst environment: example of *Delminichthys adspersus* in Dinaric karst system. *Ecohydrology*. doi: 10.1002/eco.269.
- PEREIRA, L. H. G.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics* (Online), v. 14:20, <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/14/20>.
- POULSON, T. L. 1963. Cave adaptation in amblyopsid fishes. *American Midland Naturalist*, v.70, p.257-290.
- PORTER, M. L. 2007. Subterranean biogeography: what have we learned from molecular techniques? *Journal of Cave and Karst Studies*, v.69, p.179–186.
- PROULDLOVE, G. S. 2010. Biodiversity and distribution of subterranean fishes of the world. In: TRAJANO, E.; BICHUETTE; KAPOOR B. G. (Eds.) *Biology of subterranean fishes*, 1ed. Enfield: Science Publishers, p. 65-80.
- RACOVITZA, E. G. 2006. Essay on biospeleological problems: French, English, Romanian. Facsimile of the publication *Essai sur les problèmes biospéologiques* (1907), translated by D. C. CULVER; O. MOLDOVAN. Cluj-Napoca, Romania: Institut de Speologie “Emil Racovitza”.
- REIS, R. E.; TRAJANO, E.; HINGST-ZAHER, E. 2006. Shape variation insurface and cave populations of the armoured catfishes *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the São Domingos karst area, upper Tocantins River, Brazil. *Journal of Fish Biology*, v.68, p.414-429.
- RIZZATO, P. P.; COSTA-JUNIOR, E.; TRAJANO, E.; BICHUETTE, M. E. 2011. *Trichomycterusdali*: a new highly troglomorphic catfish (Siluriformes: Trichomycteridae), from Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Central Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v.9, p.477-491.
- ROHLF, F. J. 1993. Relative warp analysis and an example of its application to mosquito wings. In: *Contributions to Morphometrics*; MARCUS, L.F.; BELLO, E.; GARCIA -VALDECASAS, A. (Eds). Museo Nacional de Ciencias Naturales, v.8, p.131-159, Madrid.
- SALLUN FILHO, W.; KARMANN, I.; BOGGIANI, P. C. 2004. Paisagens cársticas da Serra da Bodoquena, MS. In: MANTESSO, V. N.; BARTORELLI, A.; CARNEIRO, C. D. R.; BRITO NEVES, B. B. (Org.). *Geologia do continente Sul-Americano: Evolução da Obra de Fernando Flavio Marques de Almeida*. 1ed.São Paulo: BECA, p.425-433.
- SALLUN FILHO, W.; KARMANN, I. Províncias cársticas e cavernas no Brasil. 2012. In: HASSUI, Y.; CARNEIRO, C. D. R.; ALMEIDA, F. F. M.; BARTORELLI, A. (Org.). *Geologia do Brasil*. São Paulo: Beca, p. 629-641.
- SBORDONI, V.; ALLEGRUCCI, G.; CESARONI, D. 2012. Population structure. In: WHITE, W.B.; CULVER, D.C. (Org.). *Encyclopedia of Caves*. 2ed. Chennai: Academic Press, p.608-618.
- TRAJANO, E. 2012. Ecological classification of subterranean organisms. In: WHITE, W.B.; CULVER, D.C. (Org.). *Encyclopedia of Caves*. 2ed. Chennai: Academic Press, p. 275-277.

- TRAJANO, E. 2001. Ecology of subterranean fishes: an overview. *Environmental Biology of Fishes*, v. 62, p.133-160.
- TRAJANO, E. 2003. Ecology and ethology of subterranean catfishes. In: ARRATIA, G.; KAPOOR, B. G.; CHARDON, M., DIOGO, R. (Org.). *Catfishes*. 1ed. Enfield: Science Publishers, v.2, p.601-635.
- TRAJANO, E.; BICHUETTE, M. E. 2010. Subterranean fishes of Brasil. In: TRAJANO, E; BICHUETTE; KAPOOR B. G. (Eds.) *Biology of subterranean fishes*, 1ed. Enfield: Science Publishers, p.331-335.
- TRAJANO, E.; BOCKMANN, F. A. 1999. Evolution of ecology and behaviour in brazilian heptapterine cave catfishes, based on cladistic analysis (Teleostei: Siluriformes). *Mémoires de Biospéologie*, Paris, v.26, p.123-129.
- VANDEL, A. 1965. Biospeleologie: La Biologie des Animaux Cavernicoles. Oxford, England: Pergamon Press.
- VOLPATO, G. L.; TRAJANO, E. 2006. Biological rhythms. In: VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M.; RANDALL, D. J. (Org.). *Fish Physiology*, v.21. The physiology of tropical fishes. Amsterdam: Elsevier Science, 1 ed, p.101-153.
- WILKENS, H. 1988. Evolution and genetics of epigean and cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). Support for the neutral mutation theory. In: HECHT, M. K.; WALLACE, B. (Eds.). *Evolutionary biology*, New York: Plenum Publishing Corporation, p.271-367.
- WILSON, L. 2013. Geographic variation in the greater Japanese shrew-mole, *Urotrichus alpidoides*: Combining morphological and chromosomal patterns. *Mammalian Biology* , v.78, p.267-275.

**Distribuição e ecologia populacional dos bagres troglóbios do
gênero *Trichomycterus* no carste da Serra da Bodoquena, Mato
Grosso do Sul (Siluriformes: Trichomycteridae)**

RESUMO

Neste trabalho foram investigados a distribuição de populações e aspectos populacionais (densidades populacionais e distribuição da classe de tamanho, peso e fator de condição) de bagres *Trichomycterus* troglóbios, com enfoque na Gruta do Urubu Rei, entre abril de 2010 a outubro de 2012. As prospecções em campo resultaram na confirmação de 11 localidades com ocorrência desses bagres, distribuídas ao longo de 115 km na direção norte-sul ao longo das cabeceiras cársticas do Rio Miranda, quatro delas tratando-se de novos registros. A densidade da população de *Trichomycterus* sp. 1 na Gruta do Urubu Rei está sujeita às variações sazonais entre anos relacionadas aos ciclos pluviométricos regionais. O predomínio de classes de tamanhos juvenis ($CP < 40$ mm), os deslocamentos relativamente grandes de indivíduos maduros, as variações na densidade populacional indicam que a Gruta do Urubu Rei abriga uma população aberta e possui condições ambientais propícias à reprodução e crescimento, funcionando como uma caverna “berçário”. As comparações dos parâmetros estudados sugerem que as populações-fontes de *Trichomycterus* sp. 1 ocupam ambientes freáticos próximos à superfície, possivelmente devido à maior disponibilidade alimentar nestes locais. Por outro lado, os dados de densidade populacional e de distribuição das classes de tamanho indicam que *T. dali* e *Trichomycterus* sp. 2 possivelmente habitam ambientes freáticos profundos e reproduzem-se próximo à superfície. Até o momento, pouco se sabe sobre a ecologia destas espécies em cavernas subaquáticas da região, fazendo-se necessários estudos futuros para compreender a dinâmica das populações no freático profundo. Os bagres *Trichomycterus* subterrâneos da Serra da Bodoquena devem ser considerados vulneráveis à extinção, pois seus habitats estão sujeitos à degradação antrópica, como a contaminação e exploração da água subterrânea, assoreamento do aquífero de condutos e o turismo não-controlado.

Palavras-chave: Biologia subterrânea, ecologia populacional, distribuição geográfica, cavernas, *Trichomycterus*.

ABSTRACT

The present study focused the distribution of *Trichomycterus* populations and populational aspects (population density and distribution of size, weight and condition factor classes), in the Urubu Rei Cave, between April 2010 and October 2012. Field surveys confirmed the occurrence of *Trichomycterus* catfishes in 11 localities, included four new records, distributed along 115 km in the north-south direction encompassing the karst headwaters of the Miranda River basin,. The population density of *Trichomycterus* sp. 1 in the Urubu Rei Cave showed seasonal and inter-years variations related to regional pluviometric cycles. The predominance of juvenile size classes (SL < 40 mm), the relatively long-distance movements of mature individuals and variations in population densities indicate that Urubu Rei Cave shelters an open population with environmental conditions favorable for reproduction and growth. The comparisons of parameters indicate that the source populations of *Trichomycterus* sp. 1 occupy groundwater habitats near the surface, possibly due to greater food availability in this zone. On the other hand, data on population density and distribution of size classes suggest that *T. dali* and *Trichomycterus* sp. 2 probably inhabit deep phreatic habitats and reproduce near the surface so far. Little is known about the ecology of these species in underwater caves hence further studies are necessary to understand the population dynamics in the deep phreatic zone. Subterranean *Trichomycterus* catfish from Serra da Bodoquena should be considered at least vulnerable, because their habitats are subjected to anthropogenic degradation, such as exploitation and contamination of groundwaters and sedimentation conduits aquifer and poorly controlled touristic visitation.

Key-words: Subterranean biology, population ecology, geographic distribution, caves, *Trichomycterus* catfish.

1. INTRODUÇÃO

O meio subterrâneo, ou hipógeo, consiste no contínuo de espaços interconectados formados em rocha maciça, representados, entre outros, pelas cavernas (JUBERTHIE, 2000). Paisagens cársticas são regiões sustentadas por rochas carbonáticas onde predominam processos de dissolução química da rocha pela água, gerando o desenvolvimento de porosidade secundária na forma de condutos e, conseqüentemente, sistemas hidrológicos subterrâneos (SALLUN-FILHO & KARMANN, 2012). Os relevos cársticos são caracterizados, então, pela presença de cavernas, sumidouros, ressurgências e pela escassez de escoamento superficial (FORD & WILLIAMS, 2007; SALLUN-FILHO & KARMANN, 2012). Essas regiões representam cerca de 10% da superfície dos continentes, com uma biodiversidade subterrânea endêmica de alto interesse científico e para conservação, além de abrigar aquíferos de grande importância econômica e social (FORD & WILLIAM, 2007; WATSON *et al.*, 1997).

Os habitats subterrâneos aquáticos variam em gradiente vertical, desde corpos d'água isolados, na zona insaturada (em contato com ar) até condutos freáticos profundos, na zona saturada (totalmente preenchida por água) (TRAJANO, 2001; TRAJANO & BICHUETTE, 2010; FORD & WILLIAMS, 2007). No nível freático superficial, a água subterrânea pode se conectar com a superfície através de insurgências, nascentes ou ressurgências (PALMER, 2007). Assim como os ambientes superficiais, os habitats subterrâneos enquadram-se em duas grandes categorias ecológicas: lóticos e lênticos (TRAJANO, 2001). Os primeiros caracterizam-se pela presença de fluxo de água (que pode ser lento a intenso, com trechos encachoeirados, dependendo do gradiente hidráulico), teores mais altos de oxigênio dissolvido, fundo com predomínio de rochas (com matacões, seixos e cascalhos e, por vezes, a própria rocha mãe exposta), com trechos alternados entre corredeiras e poções de fluxo mais

lento. Os habitats lênticos, por sua vez, apresentam fluxo de água lento ou ausente, teores mais baixos de oxigênio dissolvido e fundo frequentemente com sedimentos finos (silte, argila) e/ou com exposição da rocha-mãe. As cavernas submersas, ou inundadas - cavidades inundadas posteriormente à uma fase vadosa (preenchida por ar) por elevação do lençol freático e/ou rebaixamento do terreno -, e as cavernas freáticas - condutos freáticos amplos, nunca expostos acima do nível de base - podem ter características lólicas ou lênticas, dependendo do tipo de fluxo de água e da variação sazonal (TRAJANO, 2001; FORD & WILLIAMS, 2007; PALMER, 2007).

As comunidades que coevoluem nesses habitats são constituídas por populações troglófilas, populações de espécies formadas por indivíduos capazes de completar seu ciclo de vida tanto no meio epígeo como hipógeo, podem deslocar-se entre estes, ou seja, com fluxo gênico entre populações-fonte epígeas e subterrâneas; populações troglógenas, formadas por indivíduos que precisam retornar periodicamente ao meio epígeo para completar o ciclo de vida; e troglóbias, cujas populações-fonte são restritas ao meio subterrâneo (*sensu* TRAJANO, 2012). Estes últimos geralmente apresentam modificações morfológicas, fisiológicas e comportamentais associadas a este modo de vida, denominadas troglomorismos (CULVER, 1982; CHRISTIANSEN, 2012). Em contraste com meio superficial, caracterizado pela presença de ciclos diários e sazonais bem definidos, os habitats subterrâneos apresentam ausência permanente de luz e tendência à estabilidade ambiental, condições que determinam diversos aspectos da biologia dos organismos troglóbios (BARR, 1968; CULVER, 1982; JUBERTHIE, 2000).

As especializações à vida subterrânea incluem, por exemplo, a redução até perda total das estruturas visuais e da pigmentação melânica, o incremento no número e/ou tamanho de estruturas sensoriais não visuais, a tendência à estratégia do ciclo de vida do tipo K, com baixa fecundidade, reprodução tardia e pouco frequente, crescimento lento e aumento da

longevidade, a regressão da ritmicidade circadiana, da fotofobia, do comportamento agonístico e do hábito criptobiótico (POULSON, 1963; CULVER, 1982; PARFEZALL & TRAJANO, 2010).

Peixes teleósteos são os organismos cavernícolas mais conspícuos, amplamente distribuídos como troglófilos e troglóbios (estes últimos exceto na Europa) (PROUDLOVE, 2010). No Brasil, a ictiofauna subterrânea é taxonomicamente rica e diversificada, com mais de 26 espécies troglóbias conhecidas atualmente, predominantemente representadas por Siluriformes heptapterídeos e tricomictérídeos (TRAJANO & BICHUETTE, 2010; BICHUETTE & RIZZATO, 2012; BICHUETTE *et al.*, 2013). Esta alta diversidade, quando comparada com outras regiões do mundo, deve-se pelo menos em parte, à alta diversidade ictiofaunística neotropical, fornecendo uma ampla variedade de potenciais colonizadores para os habitats hipógeos (TRAJANO & BICHUETTE, 2010). Entre os peixes troglóbios brasileiros, algumas espécies são endêmicas de um único sistema cárstico (um sistema cárstico abrange a zona de recarga, a zona de descarga e todo o trecho de escoamento da água subterrânea entre elas - SALLUN-FILHO & KARMANN, 2012), ocorrendo em ambientes tipicamente lóticos como, por exemplo *Rhamdia* sp. e *Ancistrus* sp., (espécies não descritas da Serra da Bodoquena, MS – CORDEIRO *et al.*, 2013), *Rhamdia enfurnada* Bichuette & Trajano, 2005 (Gruna do Enfurnado, BA), *Trichomycterus itacarambiensis* Trajano & Pinna, 1996 (Gruta Olhos d'água, MG) outras, como *Pimelodella kronei* (Ribeiro, 1907) (Alto Ribeira, SP) e *Ancistrus cryptophthalmus* Reis, 1987 (São Domingos, GO), ocorrem em áreas maiores, mas ainda restritas, abrangendo algumas microbacias. Outras, ainda, especialmente aquelas adaptadas ao meio freático, com características lênticas, tem distribuição relativamente ampla, embora estudos filogeográficos venham revelando expressiva diversidade escondida, como no caso de *Rhamdiopsis krugi* Bockmann & Castro, 2010 (BICHUETTE, RANTIN, HINGZT-ZAHER & TRAJANO, em andamento).

Devido às suas características biológicas e ecológicas, somadas ao endemismo decorrente da alta compartimentação dos habitats subterrâneos, os troglóbios são intrinsicamente frágeis, vulneráveis a alterações ambientais, apresentando populações frequentemente pequenas e com baixa capacidade de resiliência (CULVER, 1982; TRAJANO, 2000). TRAJANO (2001) sugere que as populações de peixes troglóbios podem ser consideradas muito pequenas, se tiverem tamanhos da ordem de centenas de indivíduos; pequenas, se da ordem de milhares de indivíduos; médias a grandes, se da ordem de dezenas de milhares de indivíduos ou mais.

Do mesmo modo, as densidades populacionais podem variar entre espécies de peixes troglóbios, sem correlação taxonômica. TRAJANO (2001) propôs uma classificação com base na média dos valores estimados, uma referência interessante para fins comparativos intra- e interespecíficos e para o monitoramento a médio e longo prazo. Assim, são consideradas populações de baixa densidade aquelas com 0,1 ind./m² ou menos; densidades médias, entre 0,1 e 1,0 ind./m²; e altas densidades, mais de 1,0 ind./m². Para empregar estas classificações e levantar outros parâmetros populacionais, são necessárias várias visitas ao local de estudo em questão para se obter estimativas quantificadas através de métodos adequados para cada caso.

Segundo TRAJANO (2001), técnicas de marcação-recaptura (MR) produzem estimativas mais confiáveis e robustas do tamanho das populações, sendo as densidades calculadas a partir das áreas ocupadas pela população estimada, enquanto os censos visuais (CV) produzem cálculos diretos das densidades populacionais, sendo o tamanho da população estimada a partir da área ocupada pela população. Na prática, estudos baseados em MR demandam um maior número de ocasiões de coleta de dados e técnicas específicas de marcação, enquanto CVs são mais simples, podendo ser realizados de fora da água ou através de mergulho-livre nas partes acessíveis da caverna, quando a transparência da água o permite.

Entre as áreas cársticas brasileiras, a Serra da Bodoquena destaca-se por sua alta diversidade de troglóbios, com 31 espécies reconhecidas por especialistas, a maioria ainda não descrita, incluindo peixes siluriformes, crustáceos Peracarida, com destaque para relictos filogenéticos como o Speleogriphacea *Potiicoara brasiliensis* Pires, 1987 e o Amphipoda *Megagidiella azul* Koenemann & Holsinger, 1999, planárias aquáticas do gênero *Girardia*, aracnídeos como opiliões *Eusarcus* e aranhas Ctenidae, diplópodes Polydesmida, diversos colêmbolos e alguns insetos (CORDEIRO *et al.*, no prelo). Estes autores reconhecem quatro compartimentos de aparente relevância biogeográfica para os cavernícolas, correspondendo a diferentes microbacias (margem direita do Rio Salobra, margem esquerda do Rio Salobra, Rio Perdido e bacias Formoso-Prata). Troglóbios freáticos (bagres *Trichomycterus*, crustáceos Peracarida aquáticos, planárias) apresentam distribuições amplas através desses compartimentos, atingindo áreas distantes, como *Potiicoara brasiliensis*, que ocorre em regiões descontínuas à Serra da Bodoquena (Corumbá - MS e Serra das Araras - MT), enquanto as espécies aquáticas que vivem em riachos (siluriformes como *Rhamdia* sp. e *Ancistrus* sp.) estão distribuídas em áreas mais restritas, em um único sistema de cavernas. Já os terrestres em geral, que vivem na zona vadosa, descontínua, tendem a apresentar distribuições restritas aos respectivos compartimentos (CORDEIRO *et al.*, *op. cit.*).

Os peixes troglóbios são os únicos vertebrados especializados encontrados em ecossistemas subterrâneos neotropicais e, geralmente, são os predadores de topo nestes ambientes, o que faz deles espécies-chave indicadoras de integridade dos sistemas subterrâneos onde ocorrem (BICHUETTE & TRAJANO, 2010). As principais ameaças a estas espécies são a degradação do hábitat, manipulações hidrológicas, poluição ambiental, superexploração e a introdução de espécies exóticas (PROUDLOVE, 2001; BICHUETTE & TRAJANO, 2010). Por serem endêmicas, ocorrerem em áreas pequenas e terem, geralmente, populações pequenas, qualquer ameaça pode ter consequências graves (PROUDLOVE, 2001;

TRAJANO, 2001; BICHUETTE & TRAJANO, 2010). Por estas razões, as populações e espécies troglóbias tem sido consideradas ameaçadas ou vulneráveis, segundo os critérios da IUCN (*International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources*) (PROUDLOVE, 2001). GALLÃO & BICHUETTE (2012) propõem que os limites espaciais de proteção dos peixes troglóbios devem englobar os sistemas e as bacias hidrográficas nas quais estes ocorrem para que, seja mantida a integridade dos habitats.

Muitos ecossistemas subterrâneos do Mato Grosso do Sul, assim como grande parte dos ecossistemas subterrâneos em geral, estão ameaçados por alterações antrópicas como o turismo não controlado, o assoreamento decorrente do desmatamento e mineração a céu aberto e o uso e contaminação do subsolo, carecendo de ações urgentes para sua proteção efetiva, de modo a garantir a utilização sustentável do solo e dos aquíferos (BICHUETTE & TRAJANO, 2010; CORDEIRO *et al.*, 2013).

No final da década de 1990, os primeiros bagres troglomórficos do gênero *Trichomycterus* da área cárstica da Serra da Bodoquena foram descobertos por espeleomergulhadores na caverna inundada Buraco das Abelhas (bacia do Rio da Prata), município de Bonito, MS (COSTA-JUNIOR, 1998). Esses bagres eram relativamente comuns nessa caverna, sendo observados até profundidades de 60 m, e destacavam-se morfologicamente não só por olhos não visíveis externamente e de pigmentação melânica como, também, por uma crista adiposa pré-dorsal bem desenvolvida nos adultos e por barbilhões nasais extremamente longos (RIZZATO *et al.*, 2011). Mais de 10 anos depois, os bagres do Buraco das Abelhas, com espécimes adicionais provenientes de outras três localidades da bacia do Rio Salobra (cavernas Saracura, Morro do Jericó e Flor da Bodoquena), foram descritos formalmente como *Trichomycterus dali* Rizzato, Costa-Jr., Trajano & Bichuette, 2011, tendo por localidade-tipo a gruta Saracura. Em 2000, bagres troglomórficos do mesmo gênero foram identificados ao norte da mesma região, na gruta do Urubu Rei (dados de espécimes

depositados na coleção do MZUSP e ZUFMS). Contudo, estes apresentavam características distintas de *T. dali*, como o perfil dorsal mais baixo e variabilidade quanto à pigmentação, com a presença de indivíduos com pigmentação melânica intensa. Assim, com o evidente potencial para a ocorrência de outras populações do gênero *Trichomycterus* em cavernas da região, a carência de informações sobre os habitats e parâmetros populacionais destes troglóbios para fins de conservação, o levantamento em campo destas informações foi o objetivo geral do presente trabalho, realizado entre abril de 2010 e outubro 2012.

2. OBJETIVOS

- Investigar a distribuição dos peixes troglóbios do gênero *Trichomycterus* na Serra da Bodoquena.
- Descrever os tipos de habitats ocupados pelas populações encontradas.
- Realizar o monitoramento da população na Gruta do Urubu Rei, a fim de investigar os parâmetros populacionais, com foco na densidade e no tamanho populacional, distribuição das frequências de classes de comprimento-padrão, peso e fator de condição (estado de rigidez) e deslocamentos individuais em diferentes épocas do ciclo anual.
- Comparar parâmetros populacionais em diferentes localidades, abordando densidades populacionais e frequências de classes de comprimento-padrão, peso e fator de condição.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

O estudo genético e morfológico das amostras provenientes das prospecções realizadas neste trabalho, a partir de sequências do DNA mitocondrial e da análise com

morfometria geométrica, revelou a existência de três unidades taxonômicas entre os bagres troglóbios do gênero *Trichomycterus* na área de estudo, conforme apresentado no Capítulo 2 desta Tese. Destas, *T. dali* é a única descrita formalmente. Assim, as populações estudadas aqui serão denominadas: *Trichomycterus* sp. 1 (previamente conhecida da gruta do Urubu Rei), *Trichomycterus* sp. 2 (conhecida somente no Buraco das Abelhas), e *Trichomycterus dali* (previamente conhecida das grutas Saracura, a localidade-tipo, Morro do Jericó e Flor da Bodoquena).

Trichomycterus sp. 1 possui o corpo mais cilíndrico do que as outras duas espécies, com alto grau de variação na pigmentação, desde indivíduos totalmente despigmentados até intensamente pigmentados (Figura 1A). *Trichomycterus dali* possui dobras adiposas dorsais conspícuas nos adultos, anterior e posteriormente à nadadeira dorsal. A espécie foi descrita como totalmente despigmentada, porém o exame de novas populações revelou variabilidade nesse caráter (Figura 1B). *Trichomycterus* sp. 2 pode ser considerada a mais troglomórfica entre as espécies investigadas, apresentando corpo totalmente despigmentado e, assim como *T. dali*, uma dobra adiposa pré-dorsal conspícua nos adultos (Figura 1C).

3.2. Área de estudo

A Serra da Bodoquena é uma área cárstica com aproximadamente 200 km de extensão e atingindo 800 m de altitude, localiza-se na borda sudoeste da Planície do Pantanal sulmatogrossense, sendo constituída por um conjunto de planícies e um planalto (Planalto da Bodoquena) de rochas carbonáticas do Grupo Corumbá (ALMEIDA, 1965; SALLUN-FILHO & KARMANN, 2007) (Figura 2). A maior extensão desta área cárstica é drenada por microbacias da bacia Rio Miranda (Rios Salobra, Formoso e Prata), à leste, e pela bacia Rio Apa (Rio Perdido), à oeste. A vegetação é composta por Cerrado (savana brasileira), com formações que variam entre floresta estacional e floresta estacional decidual (SCREMIN-

DIAS *et al.*, 1999). O clima é tropical úmido, com duração da época seca de 4 a 6 meses (de abril a setembro), temperatura média entre 22 a 24°C e a média anual de precipitação de 1400 mm (SALLUN-FILHO *et al.*, 2009).

Parte da Serra da Bodoquena é área protegida pelo parque Nacional da Serra da Bodoquena (PNSB). O PNSB foi criado pelo Decreto s/nº de 21 de setembro de 2000, possui aproximadamente 77 mil hectares, divididos em dois fragmentos, um menor, abrangendo a área do Rio Salobra, e o maior, na área do Rio Perdido. As nascentes destes rios estão no entorno do PNSB, em propriedades particulares e em assentamentos rurais (Campina, Canaã e Guaicurus), onde se desenvolvem atividades econômicas de pecuária e agricultura.

As rochas do Grupo Corumbá na região da Serra da Bodoquena são predominantemente calcários da Formação Bacaina, mais expressiva ao sul, e da Formação Tamengo, que domina a superfície do Planalto da Bodoquena, a oeste (CAMPANHA *et al.*, 2011), onde se concentraram os trabalhos de campo. A formação Tamengo caracteriza-se por calcários calcíticos escuros a pretos, por vezes sulfetados, com frequentes intercalações de pelitos (conglomerados areno-argilosos), geralmente bem estratigrafados e com ocorrência de fácies mais maciças (CAMPANHA *et al.*, 2011). A espessura do pacote carbonático da formação Tamengo atinge cerca de 550 m de profundidade e esta recobre diretamente o embasamento cristalino e rochas das formações Puga, Cerradinho e Bocaina, também do grupo Corumbá (CAMPANHA *et al.*, 2011).

Dois compartimentos geomorfológicos principais são reconhecidos na Serra da Bodoquena, as quais possuem características contrastantes e opostas (SALLUN-FILHO *et al.*, 2004). O Setor Norte (microbacia do Rio Salobra) possui sistemas fluviais dominantes, epicarste exposto, alto entalhamento das drenagens superficiais e sistemas de circulação cárstica suspensos, ou seja, acima do nível de base regional (no caso, o Rio Salobra), principalmente na região do Planalto da Bodoquena. O Setor Sul possui carste poligonal no

Planalto da Bodoquena, com amplas planícies cársticas apresentando agradação, aquífero de condutos muito desenvolvido, rotas de fluxo profundas, sistema fluvial incipiente, baixo entalhamento de vales e feições vadosas (espeleotemas) de cavernas atualmente abaixo do nível da água (NA). Essas características morfológicas contrastantes são atribuídas a distintos regimes da tectônica Cenozóica nestes setores, relativos à subsidência do Pantanal, com soerguimento mais intenso no bloco norte e subsidência no bloco sul (SALLUN-FILHO & KARMANN, 2007).

Segundo o Cadastro Nacional de Cavernas da Sociedade Brasileira de Espeleologia (SBE - <http://www.cavernas.org.br/cnc>), atualmente, 87 cavernas estão registradas oficialmente na área cárstica da Serra da Bodoquena. Contudo muitas outras são conhecidas (obs. pess. L. M. Cordeiro), mas ainda não estão registradas em cadastros oficiais, sendo recorrente a citação de cerca de 200 cavernas conhecidas na região (SALLUN-FILHO *et al.*, 2004; CAMARGO & LOURENÇÃO, 2007).

Figura 1 - Táxons estudados e os respectivos valores de comprimento-padrão (CP): (A), *Trichomycterus* sp. 1, exemplar da Gruta Califórnia; (B) *Trichomycterus dali*, exemplar da Gruta do Bebedouro e (C) *Trichomycterus* sp. 2, exemplar do Buraco das Abelhas (Fotos: A e B - L. M. Cordeiro; C - J. Sabino).

Figura 2 - Localização da área de estudo com indicação das unidades de relevo (imagem SRTM retirada de <http://www.relevobr.cnpm.embrapa.br/download/ms/ms.htm>).

3.2.1. Localidades estudadas

Segue abaixo uma descrição das localidades com ocorrência de bagres troglóbios do gênero *Trichomycterus* na área de estudo. Detalhes sobre as visitas, realizadas sempre na época seca (final de abril ao início de outubro), e os novos registros são apresentados nos Resultados. Sempre que possível, são apresentados fotos e mapas topográficos para melhor ilustração dos ambientes ao leitor.

Microbacia do Rio Salobra:

Gruta do Urubu Rei (20° 29' 39" S – 56° 5' 09" O; 315 m alt.)

A Gruta do Urubu Rei localiza-se na escarpa do vale do Córrego da Serra e é o principal tributário desta drenagem, constituindo uma ressurgência suspensa, 150 m acima do nível de base regional (Rio Salobra). Sua entrada, a ressurgência do curso d'água que percorre a caverna, é marcada pela presença de uma cachoeira com tufas calcárias, que também estão presentes ao longo de toda a drenagem e são ativas com o aumento da vazão da ressurgência na época de chuvas (Figura 3A e B). O curso d'água na Gruta do Urubu Rei é permanente, com profundidades entre 0,15 a 1,5 m, abastecido principalmente por uma fenda freática, a qual intercepta o piso próximo ao fundo da caverna (Figura 3C). A gruta possui uma única galeria meandrante com 473 m de desenvolvimento planimétrico, desnível de 3,7 m, larguras variando entre 2 a 7 m e alturas, entre 1,5 a 4 m (Figura 4). Em sua porção mais distal, o conduto principal é interceptado no teto por fendas verticais em pelo menos cinco pontos, originadas pelo encontro de fendas profundas do epicarste (*karren*) com o conduto principal. Uma espessura de cerca de 50 m de calcário acima da caverna é estimada (SALLUN-FILHO, 2005). O substrato ao longo do curso da água consiste na rocha mãe exposta, com camada fina de biofilme, poucos trechos com cascalho próximo à entrada e, na porção mais distal,

após a fenda freática, a galeria segue estreita e parcialmente encoberta por sedimentos argilosos.

Figura 3 - Entrada da Gruta do Urubu Rei: (A) baixa vazão na cachoeira durante a época seca, em julho de 2010; (B) com alta vazão, em outubro de 2010; (C) fenda freática no fundo da caverna, de onde vem a maior parte da água que abastece a ressurgência

Figura 4 – Mapa topográfico, em planta, da Gruta do Urubu Rei, com perfis transversais (modificado de SALLUN-FILHO, 2005). Números em vermelho indicam os limites posteriores dos setores delimitados para o estudo populacional e as estrelas, os pontos de amostragem para coleta manual e armadilhas do tipo covo.

Mina do Velho (20°32'37" S – 56°50'13" O; 458 m alt.)

A Mina do Velho consiste em um estavele localizado na região do distrito de Morraria, zona rural do município de Bodoquena. Estaveles são nascentes permanentes que apresentam fluxo bidirecional, funcionam como insurgências quando o NA está baixo e como ressurgências, quando o NA eleva-se na época de chuvas. A nascente está na área de carste poligonal do Setor Norte, indicada no estudo geomorfológico de SALLUN-FILHO (2005), o que favorece seu comportamento hidrológico. A abertura da cavidade é uma fenda vertical, com 2 m de comprimento, 1 m de largura e desnível de 1,5 m de profundidade. O nível da água apresenta altura máxima de 0,4 m e ocorre fluxo na direção oeste-leste, o substrato é formado por cascalhos, silte e folhiço (Figuras 5A – C). O local encontra-se sombreado por um pequeno capão de mata e, segundo moradores locais, foi utilizado por muitos anos para o abastecimento de água humano e de animais de criação.

Figura 5 – Mina do Velho: (A) entrada da Mina do Velho sob capão de mata; (B) fundo da cavidade, com a armadilha do tipo covo rodeada por bagres; (C) representação topográfica da cavidade, à esquerda em planta, à direita em perfil.

Gruta Califórnia (20° 42' 08" S – 56° 50' 45" O, 460 m alt.)

Localizada na Fazenda Califórnia, 30 km ao sul do distrito de Morraria, a Gruta Califórnia é conhecida desde a década de 1980, pois apresenta uma das maiores entradas de caverna da Serra da Bodoquena, com aproximadamente 30 m de altura e 40 m de largura. O interior da gruta é formado por um amplo salão e condutos ramificados à esquerda da sua porção distal, somando-se um desenvolvimento linear de aproximadamente 150 m. A gruta consiste de uma grande insurgência, sumidouro do córrego Califórnia, que atualmente encontra-se em estágio avançado de assoreamento (Figura 6A). O nível da água pode subir consideravelmente nos períodos chuvosos, alagando parcialmente o grande salão (Figura 6B). O local onde foram realizadas as coletas foi acessado através de uma fenda vertical estreita que não constava na área mapeada, localizada em um dos condutos no fundo da caverna. Quinze metros abaixo, atingiu-se o nível da água subterrânea, sem fluxo aparente naquele momento (Figuras 6C e D). Observou-se a continuidade subaquática do conduto, sendo que a profundidade máxima da água era de 1 m, e o substrato formado pela rocha mãe, coberta por uma grossa camada de silte.

Figura 6 – Gruta Califórnia: (A) Vista geral do paredão e do assoreamento do Córrego Califórnia, a seta aponta a entrada da caverna; (B) marca mais alta do nível da água na parede do grande salão (indicada pela seta); (C) local onde foram realizadas as coletas mostrando o covo instalado; (D) mapa topográfico, em planta (acima) e perfil longitudinal (abaixo) (extraído de SALLUN-FILHO, 2005).

Toca da Onça (20° 43' 30" S – 56° 49' 05" O; 505 m alt.)

A Toca da Onça é uma ressurgência permanente, tributário do Córrego Salobrinha, localizada no interior do setor norte do Parque Nacional da Serra da Bodoquena - PNSB. A cavidade com 4 m de extensão e 1,5 m de altura, é formada por uma fenda horizontal em um paredão, não chegando a formar-se zona afótica. Há dois poços naturais, um aberto diretamente no meio externo, com profundidade estimada em 4 m (Figura 7A) e outro na Toca da Onça, com profundidade máxima observada de 7 m (Figura 7B). Segundo relatado por MORACHIOLLI (2002), a conexão subaquática entre os dois poços foi percorrida durante mergulho exploratório.

Gruta do Senhor Valdemar (20° 43' 38" S – 56° 48' 24" O; 649 m alt.)

Localizada no limite entre o fragmento norte do PNSB e o Assentamento Canaã, a Gruta do Sr. Valdemar está 1 km distante da Toca da Onça. A gruta possui aproximadamente 50 m de desenvolvimento linear e desnível de 6 m. A entrada é formada por uma pequena dolina de abatimento, com cerca de 1 m de diâmetro, que dá acesso ao salão seco principal. Através de uma passagem estreita, acessam-se galerias meandantes, com seção vertical em forma de chave e com *pendants* na porção inferior (indicando a circulação frequente de água com deposição de sedimentos no local – PALMER, 2007). Os bagres foram coletados em uma pequena fenda a 2 m abaixo do observador, com o uso da armadilha do tipo covo (Figura 8).

Gruta Flor da Bodoquena (20° 45' 49" S – 56° 48' 07" O, 535 m alt.)

A Gruta Flor da Bodoquena está localizada no centro da porção norte do PNSB, cujo acesso se dá através do Assentamento Canaã, pela linha do Córrego Palheadão, afluente do Rio Salobra. A gruta apresenta aproximadamente 100 m de desenvolvimento, desnível de 25

m e é formada por um conduto principal com cerca de 2 m de altura e 5 m de largura, interceptado transversalmente por um segundo conduto. Neste conduto o desenvolvimento continua gradualmente verticalizado, até atingir o nível da água. Neste trecho, foram observadas feições de dissolução do tipo *scallops* (sensu PALMER, 2007), de dimensões características de condutos com passagem de água com fluxo intenso e turbulento, ao menos periodicamente. Os bagres foram observados em dois ambientes distintos nesta caverna, em uma poça isolada no nível superior (Figura 9A), com fundo argiloso, e no nível freático, acessado através do conduto verticalizado (Figura 9B), com substrato formado pela rocha mãe.

Gruta Morro do Jericó (20° 46' 19" S – 56° 44' 56" O; 270 m alt.)

A Gruta Morro do Jericó localiza-se no cânion do Rio Salobra, na porção norte do PNSB. A caverna com 200 m de desenvolvimento linear e desnível de 20 m, possui três pequenas entradas, que podem ser avistadas da margem do rio (Figuras 10 e 11). Os bagres foram coletados em um lago na extremidade distal do conduto inferior, com profundidade máxima de 1 m, largura de 2,5 m e extensão de 4 m; a água apresentava fluxo muito lento, transversalmente ao conduto. O nível inferior encontrava parcialmente preenchido por sedimento areno-argiloso, que também forma o principal substrato do lago.

Figura 7 – Toca da Onça: (A) poço externo; (B) poço na caverna.

Figura 8 – Fenda vertical onde foi realizada coleta com covo na gruta do Sr. Valdemar.

Figura 9 – Locais de coleta na Gruta Flor da Bodoquena: (A) poça isolada em patamar superior; (B) conduto vertical conectado ao nível freático (Fotos: A. L. Guil).

Figura 10 – Paredão do cânion do Rio Salobra, Parque Nacional da Serra da Bodoquena, com as entradas da Gruta Morro do Jericó indicadas pelas setas.

Figura 11 – Mapa topográfico Gruta Morro do Jericó, em planta (acima) e em perfil longitudinal (abaixo) (Autor: GESB - Grupo de Espeleologia Serra da Bodoquena, 2007).

Mina da Sede (20° 47' 23" S – 56° 49' 41" O; 567 m alt.)

Localizada na Fazenda Flor da Bodoquena, a Mina da Sede é uma nascente utilizada para o abastecimento da sede da fazenda. A profundidade máxima observada no momento da visita foi de pouco menos de 1 m e diâmetro da nascente é de cerca de 2 m. Um muro com cerca 3 m de altura foi construído ao redor da nascente, formando um reservatório improvisado para aumentar o armazenamento de água na fazenda durante as épocas chuvosas (Figuras 12A e B). A poucos metros da nascente foi construída uma casa para abrigar a bomba elétrica utilizada na retirada de água. Segundo morador local, tal uso da Mina da Sede é feita continuamente nos últimos 30 anos e a nascente nunca secou completamente.

Gruta do Bebedouro (20° 48' 07" S – 56° 49' 09" O; 567 m alt)

Localizada na Fazenda Flor da Bodoquena, a cerca de 2 km da Mina da Sede, a Gruta do Bebedouro é conhecida pelos moradores locais por ser uma fonte de água constantemente utilizada para abastecer o rebanho de gado da fazenda. Uma bomba hidráulica e um sistema mecânico eólico (roda de vento) encontram-se instalados ao lado da caverna (Figuras 12C e D), porém o equipamento não funcionava nas ocasiões das visitas. A caverna é basicamente subaquática, formada por uma fenda vertical de 10 m de comprimento, 8 m de profundidade e largura de 1 m, até onde foi possível observar. Teto e paredes são formados pela rocha mãe, recoberta por fina camada de silte. Raízes da vegetação superficial foram observadas na parte subaquática (Figura 12E).

Figura 12 – Fazenda Flor da Bodoquena: (A) casa de máquina e poço construído na Mina da Sede; (B) interior do poço onde espécimes de *Trichomycterus dali* foram observados; (C) bomba elétrica e (D) roda de vento utilizados na captação de água na Gruta do Bebedouro; (E) interior da gruta do Bebedouro.

Gruta Saracura (20° 53' 57" S – 56° 47' 41" O; 521 m alt.)

A Gruta Saracura localiza-se entre o limite do fragmento norte do PNSB e o Assentamento Guaicurus. Possui uma pequena entrada principal, com altura e largura de 1,5 m, e quatro outras aberturas estreitas para o exterior (Figura 13A). Ao fundo da caverna, um lago margeado por depósitos de calcita (Figura 13B) dá acesso à parte subaquática da caverna, basicamente vertical até a profundidade de 60 m, tornando-se horizontal a partir desta cota. A parte seca possui 230 m de desenvolvimento linear, onde ocorrem poças isoladas (Figura

13C). Esta é a localidade tipo de *Trichomycterus dali* e tem sido ocasionalmente visitada por espeleomergulhadores com propósito de treinamento e exploração.

Figura 13 – Gruta Saracura: (A) entrada da caverna; (B) mergulhador no poço profundo onde forma coletados os espécimes de *Trichomycterus dali*; (C) mapa topográfico em planta (Autor: GESB).

Microbacia do Rio da Prata:

Buraco das Abelhas (21° 29' 16" S – 56° 43' 24" O; 425 m alt.)

Localizada no extremo sul do PNSB, o Buraco das Abelhas é o maior sistema de condutos subaquáticos mapeados no Brasil, atualmente com mais de 2 km topografados, em profundidade máxima de 65 m e cerca de 3 km explorados (Figura 14). Os condutos são relativamente amplos, com perfis preferencialmente horizontais e rocha mãe exposta no piso e paredes. O nível da água pode subir até 10 m na época chuvosa, quando o fluxo da nascente torna-se intenso e esta passa a abastecer o leito geralmente seco do córrego local, tributário da microbacia do Rio da Prata (Figuras 15A a C). A caverna vem sendo utilizada esporadicamente para o treinamento de mergulhadores técnicos e continuidade das explorações. Apesar do fluxo eventual de mergulhadores ocorrer no local desde o fim da década de 1990, esforços tem sido realizados para ordenar a operação do mergulho e implementar um plano de manejo, porém a burocracia do PNSB, em relação à aquisição da área, dificulta a regulamentação da atividade no local. Peixes não troglomórficos (*Rhamdia quelen* e *Astyanax* sp.) são abundantes na região de entrada. A partir de 100 metros lineares da entrada da caverna e a 12 m de profundidade, estes peixes ocorrem sintopicamente com *T. dali* (COSTA JR., 2000). Em setembro de 2012, três tentativas foram feitas para coleta direta de *Trichomycterus* sp. 2 por mergulho autônomo, em um trecho de 150 m a partir da entrada, atingindo-se profundidade máxima de 25 m (Figura 14).

Figura 14 – Mapa topográfico do Buraco das Abelhas, a maior caverna inundada da Serra da Bodoquena, em planta e em perfil (canto superior direito) (Autor: José Lourenço Barroco Neto 2007). A linha pontilhada delimita o trecho onde foram realizados censos visuais em setembro de 2012.

Figura 15 – Variação do nível da água no Buraco das Abelhas: (A) mergulhadores na entrada da caverna na época seca; (B) nível da água alto durante a época de chuva (Fotos: Rodrigo Borghezán).

Microbacia do Rio Formoso:

Nascente do Taquaral (21° 06' 30" S – 56° 37' 50" O; 445 m alt.)

A Nascente do Taquaral é uma caverna freática descoberta em 2010 por mergulhadores, localizada na borda do PNSB, próximo ao município de Bonito (Figura 16A e B). O conduto principal explorado até o momento possui aproximadamente 1 km de extensão e desenvolve-se horizontalmente entre 12 e 20 m de profundidade. A presença de bagres troglomórficos similares aos do Buraco das Abelhas neste local foi observado pelos mergulhadores (Adriana de Castro e Tuta Barroco, comun. Pess.). Duas tentativas foram feitas para capturar espécimes e confirmar tal informação. Contudo, não foi possível realizar as coletas e/ou observações devido às condições inadequadas para o mergulho em julho de

2012 (com baixa visibilidade na água), e as condições da estrada que não permitiram o transporte do equipamento até o local em setembro de 2012.

Figura 16 – Nascente do Taquaral. (A) Mergulhadores na ressurgência; (B) mergulhador iluminando o conduto durante exploração (Foto: Alvanir S. Oliveira).

3.3. Prospecção de novas localidades e visita à localidades com ocorrência conhecida de bagres *Trichomycterus*

Para a realização do trabalho de campo, foram levantadas inicialmente informações sobre a fauna cavernícola e distribuição de cavernas no Estado do Mato Grosso do Sul a partir da literatura e de bancos de dados espeleológicos brasileiros (CODEX - Redespeleo, <http://www.redespeleo.org/codex>; CNC - Sociedade Brasileira de Espeleologia, <http://www.sbe.com.br/cnc>; e CANIE - CECAV/ICMBio, <http://www.icmbio.gov.br/cecav/canie>). Assim, a partir das coordenadas de cavernas e áreas com potencial para ocorrência de peixes subterrâneos, somadas aos relatos de moradores locais, foram realizadas prospecções em campo procurando-se abranger a maior área possível. A cada expedição, foram dedicados entre 5 a 10 dias a esta atividade. As coordenadas geográficas de cada localidade visitada foram registradas com GPS Garmin, modelo 60CSx, e

o banco de informações foi tratado e organizado utilizando-se os programas GPS Track Maker, versão 13.8, e Google Earth, versão 7.1.2.2041. Na descrição das localidades, as coordenadas geográficas e a altitude foram registradas na entrada das cavernas.

Os resultados desta compilação de cavernas com informações sobre fauna cavernícola da Serra da Bodoquena, somadas aos resultados de coletas recentes realizadas durante este trabalho de campo, são apresentados no Anexo I (artigo aceito para publicação na revista *Biota Neotropica*).

3.4. Coleta de exemplares

Os exemplares de *Trichomycterus* sp. 1 e *Trichomycterus dali* foram capturados com redes de mão e armadilhas do tipo covo. Em cada local foi feito CV e observações naturalísticas *ad libitum* antes de perturbar o ambiente (Figura 17A). A seguir, a coleta direta com redes de mão foi feita a partir da beira do corpo da água e/ou através de flutuação (Figura 17B). Nos covos, a isca utilizada foi sardinha enlatada, embalada em pequenos sacos de *nylon* para impedir a ingestão da isca pelos bagres.

O tempo de amostragem foi variável dependendo da localidade, entre 40 minutos e três horas para coleta direta e, para os covos, entre 30 minutos e quatro horas. Neste último caso, com o objetivo de aumentar a probabilidade de captura na Gruta Califórnia, Toca da Onça e Buraco das Abelhas, locais com maior dificuldade de captura dos espécimes, dois covos foram instalados e retirados no dia seguinte.

Na tentativa de capturar tricomictérideos no meio epígeo, em busca de uma espécie proximamente relacionada aos *Trichomycterus* subterrâneos para fins comparativos, foram feitas em abril e julho de 2010 amostragens ao longo de 200 m do Córrego da Serra, próximo à foz da drenagem que ressurgue na Gruta do Urubu Rei. Nessas ocasiões, foram utilizados

covos, rede de arrasto (4 m de comprimento, 1,5 m de altura e malha de 5 mm) e coleta direta com flutuação.

3.5. Coleta de dados

Cada exemplar coletado foi anestesiado em solução fraca de benzocaína para a tomada dos seguintes dados: comprimento padrão (CP), utilizando-se paquímetro Mitutoyo (precisão 0,01 mm); peso, medido com dinamômetro do tipo Pesola de 10 gramas (precisão de 0,02 g); classe de pigmentação e, quando possível, sexo (Figura 17C). O grau de pigmentação foi enquadrado em quatro classes: 0 (despigmentado), 1 (pouco pigmentado), 2 (pigmentação média) e 3 (pigmentação melânica intensa). Em exemplares adultos, o sexo foi verificado pressionando-se a região abdominal no sentido antero-posterior do animal para se verificar a liberação de sêmen ou óvulos quando as gônadas estavam desenvolvidas. Quando possível, o sexo pode ser determinado também pela observação das gônadas por transparência.

3.6. Distribuição de frequências de classes de comprimento-padrão, peso e fator de condição

A partir dos dados de comprimento-padrão e peso, foram confeccionados histogramas com a distribuição das frequências de classes de tamanho, peso e fator de condição para cada localidade onde espécimes de *Trichomycterus* sp. 1 e *Trichomycterus dali* foram coletados. No caso da Urubu Rei, foram consideradas todas as capturas. Para as grutas Saracura, Morro do Jericó e Califórnia, não foram confeccionados gráficos de distribuição de classes devido ao pequeno número de exemplares.

O fator de condição (ou estado de hígidez) alométrico (K) foi calculado pela fórmula: $K = 1000 * Wt / LS^b$, sendo Wt o peso total do indivíduo (g); LS o comprimento-padrão

(cm); e b , o coeficiente angular da regressão entre o peso (g) e o comprimento-padrão (cm), ambos transformados em logaritmo natural (VAZZOLER, 1996).

Tabelas com o resumo estatístico dos dados (número de amostras, valores máximos e mínimos, média, mediana e desvio-padrão) são mostradas para os eventos de coleta na Gruta do Urubu Rei e para as localidades de *Trichomycterus* sp. 1 e *Trichomycterus dali*.

Para os exemplares da Gruta do Urubu Rei foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk a fim de se verificar a normalidade dos dados. A seguir, a comparação das variáveis comprimento-padrão, peso, fator de condição entre os eventos de coleta foi realizada através da análise de variância de testes paramétricos - ANOVA e não paramétricos - Kruskal Wallis (H). Quando detectada significância entre as variáveis ($p < 0,05$), foram realizados testes *post hoc* (Tukey ou Wilcoxon) para separar os grupos significamente distintos (ZAR, 2010). Para estas análises, foi utilizado o programa PAST, versão 3.1 (HAMMER et al., 2001).

Adicionalmente, diagramas do tipo *box-plot*, ou *box-and-whiskers plot* (ZAR, 2010) foram confeccionados com o objetivo de se comparar a dispersão dos dados de cada variável entre as localidades e, no caso da Gruta do Urubu Rei, entre os eventos de coleta. Estes diagramas mostram a mediana, 25 a 75 % dos quartis (primeiro e terceiro quartis, representados pelas caixas), os menores e maiores valores até 1,5 de diferença do primeiro e terceiro quartis, respectivamente (são os valores de *whiskers*, traços menores acima e abaixo da caixa). Acima ou abaixo dos valores de *whiskers* são apresentados os *outliers* (simbolizados pelos pontos).

3.7. Gruta do Urubu Rei: densidades, tamanhos populacionais e deslocamentos

A Gruta do Urubu Rei foi inicialmente escolhida para o estudo populacional por ser a localidade onde a maior população de bagres *Trichomycterus* sp. 1 pode ser observada ao longo de uma extensa área, sem a utilização de mergulho autônomo.

A caverna foi visitada no fim da estação de chuvas e meio e fim da estação seca para coleta de dados populacionais, totalizando nove eventos de amostragem para CV (abril, julho e outubro de 2010, 2011 e 2012). Ao menos três dias de trabalho foram dedicados a esta atividade a cada evento amostral, sendo o primeiro dedicado ao CV e os dois seguintes à coleta e tomada de dados dos exemplares. Por questão de segurança, devido ao risco de aprisionamento por inundação, a caverna não foi visitada durante a estação chuvosa e, em três ocasiões (outubro de 2011, julho e outubro de 2012), não foram feitas coletas para tomada de dados dos exemplares devido à ocorrência de chuvas torrenciais e instabilidade do clima. Nessas ocasiões, optou-se pela realização apenas dos CVs para se evitar um longo tempo de permanência na caverna.

A caverna foi dividida em 23 setores, sendo que o primeiro (setor zero) é um pequeno poço no meio externo, abastecido pela água da ressurgência, e os setores 1 a 22 correspondem a seções contínuas com 5 a 20 m de comprimento ao longo do conduto da caverna, demarcados com fitas coloridas e cordinhas de *nylon*. As áreas de cada setor e as distâncias em relação à entrada foram obtidas a partir do mapa em planta (Figura 4). Os setores 1 a 4 correspondem à zona de entrada (que recebe luz direta em algum horário do dia), o setor 5 corresponde à zona de penumbra (onde percebe-se apenas a luz refletida) e, o setor 6 ao 22, à zona escura.

A fim de se testar a ocorrência de variações sazonais na densidade e tamanho populacionais, foram realizados CVs em todos os eventos de amostragem, sempre pela mesma observadora. Toda área da caverna foi percorrida e o número total de peixes avistados foi anotado para cada setor, para um tempo médio total de observação direta em torno de 3 horas. As observações foram feitas com auxílio de lanternas por fora da água nos setores mais rasos ou através de *snorkeling* (flutuação com máscara de mergulho e *snorkel*), naqueles com mais 0,5 m de profundidade.

Nos dias seguintes ao CV, os exemplares eram coletados em redes de mão e armadilhas do tipo covo. A coleta foi realizada em sete pontos no interior da caverna e no poço externo (Figura 4), sendo que o esforço amostral variou de duas a três horas para coleta com redes de mão, enquanto a exposição dos covos foi de três a quatro horas.

Entre abril de 2010 e outubro de 2011, após a tomada de dados, foram feitas marcas individuais com a injeção subcutânea de pigmento fluorescente não-tóxico do tipo elastômero, produzido pela Northwest Marine Technology Inc. Foram utilizados pigmentos de três cores (vermelho, azul e verde), injetados em seis posições nos exemplares (Figura 17D). Previamente, em testes em laboratório feitos em espécimes coletados em 2008 por Trajano e equipe nessa caverna o elastômero permaneceu em três deles por pelo menos 90 dias. A tinta nanquim, utilizada com sucesso por TRAJANO (1997) em *T. itacarambiensis*, também foi testada em laboratório, porém, os quatro espécimes marcados com este pigmento apresentaram fortes contrações muscular logo após a injeção e dois morreram alguns dias depois. Não sabemos por que esta espécie apresentou tal reação ao nanquim.

A densidade populacional em cada setor foi calculada dividindo-se o número total de indivíduos observados pela área do respectivo setor. A densidade média para toda a caverna foi obtida pela divisão do número total de indivíduos observados pela área total da mesma. O tamanho populacional foi considerado a partir do número absoluto de peixes contabilizados no CV. A análise não-paramétrica Kruskal-Wallis foi utilizada para avaliar-se as diferenças entre as médias das densidades entre os eventos de coleta, seguida do teste *post hoc* de Wilcoxon para identificar os meses significativamente distintos.

Para a estimativa dos deslocamentos individuais, foi considerada a distância entre o ponto médio do setor onde o espécime foi capturado e o setor onde houve a recaptura.

Figura 17 – Trabalho de campo: (A) censo visual feito a partir de fora da água; (B) coleta direta durante flutuação; (C) tomada de comprimento-padrão com espécime anestesiado sobre esponja úmida; (D) espécime de *Trichomycterus* sp. 1 marcado com elastômero em três posições.

3.8. Variáveis ambientais

Os dados de precipitação mensal foram extraídos da estação meteorológica do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia), localizada na cidade de Miranda, distante cerca de 50 km da região de estudo.

Os valores de pH, condutividade (ms.cm^{-1}), oxigênio dissolvido (mg.l^{-1}), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e salinidade (%) foram medidos com aparelho digital da Marca Horiba, modelo U 10, em cada localidade visitada e a cada evento de coleta, quando a localidade foi visitada mais de uma vez. O fluxo da água foi classificado em ausente, lento, moderado ou intenso, e os substratos em sedimentos finos (silte, argila e areia), cascalhos e rocha mãe.

4. RESULTADOS

4.1. Distribuição geográfica

O total de 65 cavernas foi visitado durante os trabalhos de campo e a ocorrência de bagres troglomórficos do gênero *Trichomycterus* foi confirmada em 11 localidades, todas inseridas na bacia do Rio Miranda (Figura 18). Destas, quatro tratam-se das localidades conhecidas anteriormente, de onde são provenientes os espécimes incluídos na descrição de *Trichomycterus dali* (Gruta Saracura, Morro do Jericó, Flor da Bodoquena e Buraco das Abelhas), sendo que apenas nesta última caverna não foi possível coletar exemplares adicionais, apesar do esforço dispendido. Três outras localidades com registro conhecido mas que não haviam sido incluídas na descrição, foram confirmadas, localizadas e re-identificadas a partir de registros encontrados em coleções zoológicas (MZUSP e ZUFMS) e das descrições de MORACHIOLLI (2002). São elas: Gruta do Urubu Rei e Toca da Onça, para *Trichomycterus* sp. 1 e Bebedouro, para *T. dali*. Quatro localidades são registros novos obtidos durante os trabalhos de campo: Mina da Sede, para *T. dali*; Mina do Velho, Sr.

Valdemar e Califórnia, para *Trichomycterus* sp. 1. A provável ocorrência de uma 12ª população troglóbia de bagres *Trichomycterus* (nascente do Taquaral) está por ser confirmado.

Trichomycterus sp. 1 e *T. dali* estão distribuídas ao longo das cabeceiras da margem esquerda do Rio Salobra, a primeira ao norte e a segunda ao sul desta microbacia. A primeira espécie, antes conhecida somente de uma caverna, a Gruta do Urubu Rei, passa a ter sua distribuição ampliada para aproximadamente 500 km². A segunda, por sua vez, teve a distribuição reduzida a partir dos resultados de morfologia, morfometria geométrica e biologia molecular no Capítulo 2. Assim, no momento *T. dali* ocorreria em uma área de aproximadamente 400 km².

Sendo confirmada a presença de bagres *Trichomycterus* troglóbios na Nascente do Taquaral, este será o primeiro registro para a microbacia do Rio Formoso. Até o momento, *Trichomycterus* sp. 2 é conhecida somente do Buraco das Abelhas, mas é possível que outras populações ocorram nas cabeceiras do Rio da Prata.

Nenhum espécime de Trichomycteridae foi coletado no Córrego da Serra, drenagem contígua à Gruta do Urubu Rei. No trecho amostrado, foram identificadas quatro espécies de peixes típicos de ambientes de pequenas drenagens: *Ancistrus* sp. (Loricariidae); *Rhamdia quelen* (Heptapteridae); *Characidium* cf. *zebra* e *Astyanax* cf. (Characidae). Este córrego encontra-se em estágio avançado de assoreamento e, portanto, a composição original da ictiofauna local deve ter sido alterada.

4.2. Variações abióticas

Os padrões anuais de precipitação variaram drasticamente ao longo do estudo (Figura 19). O ano que precede o início do trabalho de campo (2009) foi atipicamente chuvoso, com o maior volume de precipitação mensal registrado no mês de dezembro, aproximadamente 350

mm. Moradores do Assentamento Canaã relataram que, neste mês, chuvas torrenciais causaram enchentes catastróficas, com o transbordamento do Rio Salobra, e muitos danos materiais. Em 2010, o padrão pluviométrico foi mais próximo do que é esperado para região, com época seca entre maio e setembro. No ano seguinte (2011), os volumes de precipitação caíram abruptamente, sendo este um ano atipicamente seco na região. Em 2012, como em 2009, ocorreram altos volumes de precipitação em meses tipicamente secos, entre maio e setembro (Figura 19). Portanto, os trabalhos de campo foram realizados em anos com variação extrema dos níveis pluviométricos e um padrão atípico para a região.

A Figura 20 traz as variáveis ambientais registradas na Gruta do Urubu Rei ao longo do estudo e na Tabela 1 estão apresentados os valores das variáveis ambientais para as localidades visitadas onde ocorrem bagres troglóbios do gênero *Trichomycterus*.

Figura 19 – Valores de precipitação mensal ao longo dos anos de 2009 a 2012 (INMET 2013), mostrando diferenças entre os anos.

Figura 20 – Variáveis ambientais registradas entre abril de 2010 e maio de 2012 na Gruta do Urubu Rei, Bodoquena, MS. Os valores de salinidade foram constantes (0,01 %) e não são mostrados no gráfico. T°C – temperatura (°C); Cond. – condutividade (ms/cm*10); OD – oxigênio dissolvido (mg/l).

Tabela 1 – Variáveis ambientais medidas nas cavernas onde ocorrem populações troglóbias de *Trichomycterus*, com as respectivas datas das visitas. Cond. – condutividade (ms.cm^{-1}); OD – oxigênio dissolvido (mg.l^{-1}); T – temperatura ($^{\circ}\text{C}$); Sal. – salinidade (%). *Para a Gruta do Urubu Rei são apresentados os valores médios.

Localidade	Data	pH	Cond.	OD	T	Sal.
Urubu Rei	*	8,0	0,39	5,3	22,3	0,01
Mina do Velho	set/2011	7,3	0,55	3,50	21,8	0
Califórnia	set/2011	7,6	0,49	4,30	22,5	0
Toca da Onça	ago/2011	7,6	0,38	4,50	20,7	0
Toca da Onça	out/2012	8,1	0,29	3,57	20,9	0,01
Sr. Valdemar	ago/2011	7,9	-	-	18,3	-
Flor da Bodoquena	mar/2010	7,5	0,45	6,10	22,0	0,01
Flor da Bodoquena	mai/2011	7,0	0,45	7,35	22,8	0,01
Flor da Bodoquena	ago/2011	7,2	0,45	4,96	22,1	0,01
Morro do Jericó	jul/2011	7,4	0,42	-	24,1	-
Mina da Sede	ago/2011	7,2	0,51	6,30	23,6	0
Bebedouro	ago/2011	7,2	0,51	6,25	23,3	0
Saracura	jun/2012	6,2	0,43	5,10	22,4	0,01
Abelhas	jul/2011	7,2	0,44	3,28	23,3	0,01

De modo geral, os valores de pH tiveram próximos da neutralidade e os altos valores de condutividade registrados nas localidades estudadas foram típicos de aquíferos cársticos (CULVER, 1982). Os valores de oxigênio dissolvido foram mais variáveis, o que deve refletir as diferentes condições de turbulência e variações sazonais no nível da água. A temperatura variou em torno da média regional, 22°C (SALLUN-FILHO & KARMANN, 2007), com o valor mais alto registrado na Gruta Morro do Jericó ($24,1^{\circ}\text{C}$) e o mais baixo na Gruta do Sr. Valdemar ($18,3^{\circ}\text{C}$). É importante destacar que, nesta última, a visita foi realizada entre os dias mais frios de 2011, quando as temperaturas externas na região chegaram a -2°C .

Em abril de 2011, as variáveis físico-químicas na Gruta do Urubu Rei apresentaram características de estação chuvosa, porém os dados pluviométricos da estação de Miranda não registraram chuvas neste período. Neste caso, é necessário considerar a distância de mais de 50 km entre estação e a zona de recarga da caverna, o que, possivelmente, impediu o registro de algum evento de chuva mais pontual na área da Urubu Rei.

4.3. Estudo populacional na Gruta do Urubu Rei

4.3.1. Densidade, tamanho populacional e deslocamentos individuais

A tentativa de se estimar o tamanho populacional através de MR foi realizada em abril, julho e outubro de 2010 e de 2011. Um total de 154 bagres foi marcado, mas em apenas oito foi possível detectar traços de marca e só três puderam ser reconhecidos individualmente, indicando rápida perda da marca por absorção em campo, diferentemente do observado em laboratório. Assim sendo, a primeira premissa dos estudos baseados em técnicas de MR (BEGON, 1979) de que todas as marcas sejam permanentes e reconhecidas corretamente na recaptura, não foi atendida.

Os dados dos três espécimes recapturados e identificados precisamente são apresentados na Tabela 2. Os deslocamentos registrados foram a montante, com a distância máxima percorrida por uma fêmea madura, de 300 m em 14 dias. O maior incremento em comprimento observado, correspondendo a uma taxa de crescimento de 2 mm/mês, foi observado para essa fêmea; não se verificou variação expressiva no peso.

Tabela 2 - Intervalo de tempo entre capturas, variação de comprimento-padrão (CP), peso (P), sexo e distância de deslocamento de três indivíduos de *Trichomycterus* sp.1 recapturados na Gruta do Urubu Rei. Variação CP = CP na recaptura – CP inicial; Desl. – deslocamento; (+) deslocamento à montante.

Indivíduo Recapturado	Data	Intervalo (dias)	CP (mm)	Variação CP	Variação P (g)	Sexo	Desl. (m)
1	Abr-2010	14	27,6	-0,26	-0,02	?	+40
2	Abr-2010	14	42,5	+1,02	-0,02	Fêmea	+300
3	Jul-2011	83	34,4	+1,68	0	?	+200

O número absoluto de indivíduos contabilizados nos CVs por evento de coleta foi: 218, em abril 2010; 134, em julho de 2010; 22, em outubro de 2010; 29, em abril de 2011; 27, em julho de 2011; 10, em outubro de 2011; 78, em maio de 2012; 42, em julho de 2012; e seis em outubro de 2012. Em outubro de 2010 e 2012 só foi possível realizar o CV do setor 0 ao 5, devido ao aumento do nível da água, impossibilitando a passagem pelo sifão que dá acesso ao restante da caverna.

TRAJANO (2001), comparando estimativas baseadas em MR e CV para as mesmas populações, observa que os valores obtidos através do primeiro, são em média, 2,5 a 3 vezes superiores aqueles obtidos pelo segundo método, sugerindo um fator de correção de três vezes para estimativas baseadas em CV. Assim, aplicando-se este fator, o tamanho populacional na Urubu Rei teria variado entre 654 a 30 indivíduos ao longo do presente estudo. Nota-se que estes valores não devem ser tomados como absolutos.

Excluindo-se os CVs realizados no poço externo à gruta, o maior valor foi registrado em outubro de 2010 (0,22 ind./m²) e, o menor, em outubro de 2011 (0,01 ind./m²). A variação na densidade populacional entre os meses amostrais foi significativa ($H = 57,22$; $p < 0,001$). Os valores de significância do teste *post hoc* de Wilcoxon são apresentados na Tabela 3. Os meses amostrados em 2010 não foram significativamente diferentes entre si em relação à densidade média, mas foram significativamente diferentes dos meses de 2011 e de julho de 2012. A diferença observada deve-se ao acentuado declínio populacional registrado em 2011, quando as densidades registradas ficam próximas à zero (Figura 21).

Figura 21 - Diagramas *boxplot* mostrando distribuição das densidades populacionais de *Trichomycterus* sp. 1, nos setores, em torno das médias para cada mês de amostragem na Gruta do Urubu Rei (eixo y - indivíduos/m²).

A Figura 22 mostra as densidades populacionais ao longo dos setores da Gruta do Urubu Rei. A maior densidade de indivíduos, de 6,0 ind./m², foi registrada nos setores 0 a 6 em abril de 2010, final da estação chuvosa, enquanto em julho e outubro de 2011 foram registradas os valores mais baixos (0,02 e 0,01 ind./m², respectivamente). As seções que mantiveram as densidades mais altas ao longo do estudo foram os trechos do setor 1 ao 6, zona próxima à entrada da caverna e, em menor escala, do 19 ao 22, setores próximos à fenda freática.

Tabela 3 – Valores de significância do teste *post hoc* de Wilcoxon para as densidades mensais de *Trichomycterus* sp. 1 entre os eventos de coletas na Gruta do Urubu Rei ($H=57,22$; $p<0,001$). Os valores significativos são destacados em negrito.

	jul/10	out/10	abr/11	jul/11	out/11	mai/12	jul/12	out/12
abr/10	0,254	0,955	<0,001	<0,001	<0,001	0,023	<0,001	0,021
jul/10		0,518	<0,001	<0,001	<0,001	0,234	0,001	0,096
out/10			0,014	0,008	0,002	0,227	0,016	0,103
abr/11				0,536	0,0208	0,021	0,303	0,818
jul/11					0,0857	0,005	0,127	0,638
out/11						<0,001	0,008	0,177
mai/12							0,083	0,283
jul/12								1

Figura 22 - Densidade de *Trichomycterus* sp. 1 ao longo dos setores amostrados na Gruta do Urubu Rei em abril, junho e outubro de 2010, 2011 e 2012. (A) Meses de 2010 com os dados de todos os setores e (B) sem o setor 0.

4.3.2. Distribuição de frequências de classes de comprimento-padrão, peso e fator de condição

A Tabela 4 resume os dados de comprimento-padrão (CP), peso e fator de condição para cada mês amostral e para o total de indivíduos coletados ao longo do estudo.

O tamanho dos indivíduos adultos que puderam ter o sexo determinado em campo variou entre 42,20 e 44,48 mm para os machos e, entre 39,90 e 57,34 mm, para as fêmeas. Os dados mostram que a população da Gruta do Urubu Rei é composta predominantemente por indivíduos imaturos, com tamanho médio de 30,20 mm ($dp = \pm 10,49$ mm). Analisando-se os eventos de coleta separadamente (Figura 23), duas modas de tamanho foram registradas em abril de 2010, uma de 25 a 29 mm CP e outra de 35 a 39 mm CP. Em julho de 2010, a distribuição de classes de tamanho esteve mais próxima de uma distribuição normal, incluindo indivíduos adultos com CP entre 40 e 60 mm, mas com a moda concentrada em juvenis com CP de 30 a 34 mm; em outubro desse ano, a classe mais frequente foi de adultos com CP entre 40 a 44 mm. Nos anos seguintes, as classes mais frequentes foram de CP menores que em 2010, entre 15 e 29 mm.

Houve diferença no CP entre os eventos de coleta ($H = 62,02$; $p < 0,001$), devido à maior frequência de indivíduos menores em 2011 e 2012, do que aqueles amostrados em 2010 (Figura 24). Os meses de abril, julho e outubro de 2010 foram distintos de abril e julho de 2011 ($p < 0,001$ para todos os pares) e de maio de 2012 ($p = 0,006$; $p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente).

A Figura 25 apresenta a distribuição das classes de peso para cada evento de coleta e para o conjunto dos dados. A classe mais frequente do conjunto de dados foi de 0,0 a 0,2 g, concentrando 45% do total de indivíduos capturados. O comportamento desta variável foi similar ao observado para o CP, com diferença nos valores mensais ($H = 65,35$; $p < 0,001$). Devido à diminuição do peso (Figura 26), os meses abril, julho e outubro de 2010 foram

significativamente diferentes de abril e julho de 2011 e maio de 2012 ($p < 0,05$ para todos os pares).

A Figura 27 mostra a regressão entre o logaritmo de comprimento- padrão (mm) e peso (g) para a obtenção do valor de coeficiente angular ($b = 2,847$) utilizado no cálculo dos fatores de condição alométricos da população de *Trichomycterus* sp. 1 na Gruta do Urubu Rei.

A distribuição das frequências do fator de condição para cada mês e para o total de indivíduos capturados consta na Figura 28. Nesta análise, a média do fator de condição para a população foi de 34,1, com as tendências mensais de distribuição das classes similares às do CP e peso. Houve diferença significativa no estado de hígidez dos indivíduos entre os eventos de coleta ($H = 32,41$; $p < 0,001$), devido à distinção entre abril de 2010 e julho 2010 ($p < 0,001$); abril de 2010 e abril de 2011 ($p = 0,02$); julho de 2010 e julho de 2011 ($p = 0,003$); abril de 2011 e julho de 2011 ($p = 0,04$); e maio de 2012 e todos os meses anteriores ($p < 0,001$). A Figura 29 mostra que esta diferença deve-se à queda no valor do fator de condição dos indivíduos em 2011.

Tabela 4- Número de indivíduos (N), valores mínimo e máximo, média, mediana e desvio padrão (dp) do comprimento-padrão (CP), peso e fator de condição registrados para *Trichomycterus* sp. 1 na Gruta do Urubu Rei em cada evento de coleta e para todos os eventos conjuntamente.

		abr/10	jul/10	out/10	abr/11	jul/11	mai/12	Total
	N	44	49	18	56	43	9	232
CP (mm)	Mínimo	15,28	17,24	21,52	15,88	14,58	17,22	14,58
	Máximo	48,60	60,34	51,58	46,12	58,08	35,32	60,34
	Média	33,86	37,02	37,48	24,03	25,51	23,65	30,22
	Mediana	37,16	36,54	39,39	22,16	21,68	21,60	27,50
	dp	9,62	11,00	7,20	6,91	9,85	6,06	10,49
Peso (g)	Mínimo	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
	Máximo	1,2	2,5	1,4	1,2	2,4	0,5	2,5
	Média	0,5	0,7	0,6	0,2	0,3	0,2	0,4
	Mediana	0,5	0,5	0,7	0,1	0,1	0,2	0,3
	dp	0,3	0,5	0,3	0,2	0,5	0,1	0,4
FC	Mínimo	13,2	11,6	18,9	10,2	11,3	14,4	10,2
	Máximo	108,6	118,0	77,3	92,8	117,6	40,3	118,0
	Média	39,8	44,7	45,3	22,1	26,9	26,2	34,1
	Mediana	41,4	41,2	49,8	14,4	16,6	26,4	27,8
	dp	19,1	24,4	14,8	17,0	23,8	9,8	22,2

Figura 23 - Distribuição das classes de comprimento-padrão de *Trichomycterus* sp. 1 na Gruta do Urubu Rei em cada evento de coleta e para o conjunto de dados de todo período amostral (2010 a 2012). Todos os gráficos apresentam as mesmas classes de CP no eixo x.

Figura 24 - Diagrama de *box-plot* do comprimento-padrão de *Trichomycterus* sp. 1, na Gruta do Urubu Rei, para cada evento de coleta e para todos o período conjuntamente.

Figura 25 - Distribuição das classes de peso (g) de *Trichomycterus* sp. 1 na Gruta do Urubu Rei em cada evento de coleta e para o conjunto de dados de todo período amostral (2010 a 2012). Todos os gráficos apresentam as mesmas classes de peso no eixo x.

Figura 26 - Diagrama de *box-plot* dos valores de peso de *Trichomycterus* sp. 1 na gruta do Urubu Rei para cada evento de coleta e para todos o período conjuntamente.

Figura 27 - Regressão Linear entre o log do peso (g) e log do comprimento-padrão (mm) de *Trichomycterus* sp. 1 na Gruta do Urubu Rei para o conjunto de dados ao longo de todo período amostral (n=232).

Figura 28 - Distribuição das classes de fator de condição de *Trichomycterus* sp. 1 na Gruta do Urubu Rei para cada evento de coleta e para todos os eventos conjuntamente.

Figura 29 - Diagrama de *box-plot* do fator de condição de *Trichomycterus* sp. 1, na Gruta do Urubu Rei, para cada evento de coleta e para todos os meses conjuntamente.

4.3.3. Pigmentação

A Tabela 5 apresenta a porcentagem de indivíduos de cada classe de pigmentação em cada evento de coleta e para o conjunto de indivíduos capturados na Gruta do Urubu Rei. Estes dados mostram que, de modo geral, cerca da metade da população consiste de indivíduos despigmentados e que estes bagres retêm a capacidade de sintetizar melanina quando expostos à luz.

Tabela 5 - Porcentagem de indivíduos de cada classe de pigmentação em cada evento de coleta e para o conjunto de indivíduos capturados na Gruta do Urubu Rei. 0 - despigmentados; 1 - pouco pigmentado; 2 - pigmentação média e 3 - pigmentação intensa.

Pigmentação	abr/10	jul/10	out/10	abr/11	jul/11	mai/12	Todos
0	8,8	34,7	83,3	92,9	86,0	22,2	55,2
1	8,8	57,1	16,7	5,4	9,3	77,8	21,6
2	36,8	6,1	0,0	1,8	4,7	0,0	11,6
3	45,6	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11,6

Apenas em abril de 2010 os indivíduos com pigmentação melânica intensa foram predominantes (45,6 %). Neste mês, 25 dos 56 indivíduos foram amostrados no poço externo à caverna e nas seções recebem luz direta do meio epígeo (setores 0, 1, 2 e 3). Nos meses subsequentes, e para todos os indivíduos capturados, os despigmentados e pouco pigmentados foram predominantes.

4.4. Densidades populacionais, comprimento, peso, fator de condição e pigmentação em diferentes populações de *Trichomycterus* sp. 1 e *T. dali*

Para as novas localidades de ocorrência de *Trichomycterus* sp. 1, as densidades populacionais estimadas, com os respectivos números totais de espécimes contados (n), foram: na Mina do Velho, 17,5 ind./m² (n = 70) em setembro de 2011 e 25 ind./m² (n = 100) em outubro de 2012; na Gruta Califórnia, 11,0 ind./m² (n = 22); na Gruta do Sr. Valdemar, 5,0 ind./m² (n = 5) em julho de 2010 e 18,0 ind./m² (n = 18) em agosto de 2011; na Toca da Onça < 0,01 ind./m² (n = 3) em agosto de 2011 e < 0,01 ind./m² (n = 2) em outubro de 2012.

A Tabela 6 traz um resumo dos dados de CP, peso e fator de condição para as populações de *Trichomycterus* sp. 1, exceto da Toca da Onça, onde nenhum espécime foi coletado.

Tabela 6 - Número de indivíduos de *Trichomycterus* sp. 1 (N), valores mínimo e máximo, média, mediana e desvio padrão (dp) de comprimento-padrão (CP), peso e fator de condição registrados nas grutas Califórnia, Mina do Velho, Sr. Valdemar e Urubu Rei.

		Califórnia	Mina do Velho	Valdemar	Urubu Rei	
		N	5	24	16	232
CP (mm)	Mínimo	29,20	31,68	32,46	14,58	
	Máximo	62,08	99,24	69,90	60,34	
	Média	43,14	57,12	52,72	30,22	
	Mediana	36,66	52,99	52,67	27,50	
	dp	15,19	15,56	9,07	10,49	
Peso (g)	Mínimo	0,4	0,7	0,4	0,1	
	Máximo	3,8	11,5	4,4	2,5	
	Média	1,5	3,2	1,9	0,4	
	Mediana	0,7	2,1	1,6	0,3	
	dp	1,5	2,6	1,0	0,4	
FC	Mínimo	13,6	11,2	7,8	10,2	
	Máximo	19,9	22,5	36,1	118,0	
	Média	16,8	15,1	18,6	34,1	
	Mediana	16,7	14,8	18,2	27,8	
	dp	2,5	2,7	5,6	22,2	

O maior exemplar coletado de *Trichomycterus* sp. 1 foi uma fêmea com 99,24 mm de CP e peso igual a 11,5 g, coletado na Mina do Velho. Considerando todos os exemplares coletados desta espécie, não houve diferença significativa entre o tamanho de machos e fêmeas ($t = -1,4616$; $p = 0,161$), porém as fêmeas tenderam a ser maiores que os machos (Figura 30).

Ao contrário do observado na Urubu Rei, cuja população é composta essencialmente por indivíduos juvenis, as outras localidades são compostas essencialmente por adultos. A maior frequência de tamanho foi na faixa de 50,0 a 54,9 mm na Mina do Velho e, na Gruta do Sr. Valdemar, duas classes foram predominantes, de 40,0 a 44,9 mm e de 50,0 a 54,0 mm (Figura 31). Para a Gruta Califórnia, a estrutura de classes estárias não é apresentada devido ao pequeno número de indivíduos amostrados ($n = 5$). Os valores de CP foram

significativamente diferentes entre as populações ($H = 82,7$; $p < 0,001$). Os indivíduos da Gruta do Urubu Rei foram menores que os da Califórnia ($p = 0,04$), da Mina do Velho ($p < 0,001$) e do Sr. Valdemar ($p < 0,001$). A figura 32 apresenta graficamente os valores da mediana, desvio-padrão e intervalo de confiança do CP de *Trichomycterus* sp. 1 nas cavernas estudadas.

Acompanhando os valores de CP, o peso dos indivíduos diferiu entre as populações ($H = 82,67$; $p < 0,001$), sendo que os indivíduos da Urubu Rei tem dentro do esperado, peso menor do que aqueles das grutas Califórnia ($p < 0,04$), Mina do Velho ($p < 0,001$) e do Sr. Valdemar ($p < 0,001$). Em relação à distribuição das classes de peso, na Mina do Velho e na Gruta do Sr. Valdemar a maior frequência foi de indivíduos com mais de 2,40 g e, em ambas as localidades, uma segunda moda ocorreu nas faixas de 1,80 a 2,00 g e 1,50 e 1,70 g, respectivamente (Figura 33). A Figura 34 traz as tendências de peso de *Trichomycterus* sp. 1 nas quatro cavernas.

O coeficiente angular (b) da relação entre peso e CP de *Trichomycterus* sp. 1 foi $b = 2,6404$, na Mina do Velho; $b = 2,8474$, na Califórnia, e, $b = 2,731$ na Gruta do Sr. Valdemar. O fator de condição diferiu entre as populações dessa espécie ($H = 27,01$; $p = 0,001$), mas, ao contrário do observado para o CP e peso, os exemplares da Gruta do Urubu Rei apresentaram estado de hígidez superior aos da Mina do Velho ($p = 0,001$) e Gruta do Sr. Valdemar ($p = 0,03$), porém não diferindo significativamente dos da Gruta Califórnia ($p = 0,10$). Uma moda de fator de condição foi observada tanto para a população da Mina do Velho como para a da Gruta do Sr. Valdemar, respectivamente entre 20,0 e 29,9 e 10,0 e 19,9 (Figura 35). A Figura 36 compara as dispersão das amostras do fator de condição de *Trichomycterus* sp. 1 nessas quatro cavernas.

Figura 30 - Diagrama de *box-plot* mostrando a diferença no tamanho de machos (n=6) e fêmeas (n=14) de *Trichomycterus* sp. 1.

Figura 31 - Distribuição das frequências de comprimento-padrão (mm) de *Trichomycterus* sp. 1 na Mina do Velho (n=24) e na Gruta do Sr. Valdemar (n=16).

Figura 32- Diagrama de *box-plot* do comprimento-padrão para as quatro localidades de ocorrência de *Trichomycterus* sp. 1, Califórnia, Mina do Velho, Sr. Valdemar e Urubu Rei.

Figura 33 - Distribuição das frequências de peso (g) de *Trichomycterus* sp. 1 na Mina do Velho (n=24) e na Gruta do Sr. Valdemar (n=16).

Figura 34 - Diagrama de *box-plot* do peso (g) para as quatro localidades de ocorrência de *Trichomycterus* sp. 1, Califórnia, Mina do Velho, Sr. Valdemar e Urubu Rei.

Figura 35 - Distribuição das frequências do fator de condição de *Trichomycterus* sp. 1 na Mina do Velho (n=24) e na Gruta do Sr. Valdemar (n=16).

Figura 36- Diagrama *box-plot* do fator de condição para os exemplares amostrados nas quatro localidades de ocorrência de *Trichomycterus* sp. 1, Califórnia, Mina do Velho, Sr. Valdemar e Urubu Rei.

Quanto às classes de pigmentação melânica, todos os indivíduos da Gruta Califórnia são despigmentados (Pigmentação 0) ao passo que, na Gruta do Sr. Valdemar, 38 % enquadram-se na classe Pigmentação 1 e 62 % na de Pigmentação 2; na Mina do Velho, 13 % enquadram-se na Pigmentação 1, 25 %, na de Pigmentação 2, e 63 %, na de Pigmentação 3.

As densidades populacionais de *T. dali* e os respectivos números totais de indivíduos observados (n) foram: na Gruta Bebedouro, 0,87 ind./m² (n = 70); na Mina da Sede, 7,50 ind./m² (n = 30); no Morro do Jericó, 1,00 ind./m² (n = 10); e na Gruta Flor da Bodoquena, 0,52 ind./m (n = 13). Na Saracura, as observações feitas pelo biólogo Edmundo Costa-Junior indicam que a densidade populacional é baixa (< 0,01 ind./m²). Em duas visitas realizadas nesta localidade (incluindo a expedição de 2008, realizada por E. Trajano e equipe), somente em uma ocasião, em julho de 2012, três indivíduos foram observados próximos à superfície,

após duas horas de observação. Na Gruta do Bebedouro, os indivíduos maiores concentravam-se no fundo da fenda (abaixo de 4 m de profundidade), raramente subindo à superfície; quatro foram observados em descanso em meio de raízes submersas.

A Tabela 7 apresenta um resumo dos dados de CP, peso e fator de condição para as populações de *Trichomycterus dali*. Para esta espécie, não foi possível determinar o sexo dos indivíduos na observação por transparência, indicando que, possivelmente, estes não se encontravam em período reprodutivo. Como os espécimes da Gruta Saracura foram examinados a partir de material previamente fixado e/ou dissecado, os dados de peso e fator de condição não foram considerados para esta localidade.

O menor exemplar foi coletado na Flor da Bodoquena (CP = 14,6 mm) e o maior, na Gruta do Bebedouro (CP = 83,3 mm). O tamanho médio dos espécimes variou entre as populações ($H = 17,28$; $p = 0,002$), sendo que os exemplares amostrados nas cavernas Bebedouro e Saracura foram significativamente maiores do que os provenientes da Flor da Bodoquena ($p = 0,01$ e $p = 0,04$), da Mina da Sede ($p = 0,001$ e $p = 0,009$) e do Morro do Jericó ($p = 0,05$ e $p = 0,05$, respectivamente). A Figura 37 traz os diagramas *box plot* para CP de *T. dali* nessas cavernas.

Tabela 7 - Número de indivíduos de *Trichomycterus dali* (N), valores mínimo e máximo, média, mediana e desvio padrão (dp) de comprimento-padrão (CP), peso e fator de condição registrados nas grutas Flor da Bodoquena, Mina da Sede, Bebedouro, Saracura e Morro do Jericó.

		F. Bodoquena	M. da Sede	Bebedouro	Saracura	M. Jericó
	N	12	14	19	3	6
CP (mm)	Mínimo	14,61	21,63	27,43	48,16	21,72
	Máximo	62,01	47,62	83,33	79,47	57,07
	Média	33,55	32,70	47,06	62,21	34,19
	Mediana	29,89	31,16	46,31	59,00	30,08
	dp	13,27	6,85	13,47	15,90	12,30
Peso (g)	Mínimo	0,1	0,2	0,1	-	0,5
	Máximo	2,2	1,4	8,6	-	0,8
	Média	0,6	0,7	1,7	-	0,6
	Mediana	0,4	0,6	0,9	-	0,5
	dp	0,7	0,3	2,3	-	0,2
FC	Mínimo	5,1	5,2	5,9	-	40,6
	Máximo	29,6	10,5	10,4	-	46,5
	Média	11,7	8,3	8,4	-	44,4
	Mediana	9,6	8,4	8,5	-	45,3
	dp	7,0	1,8	1,4	-	2,6

Figura 37 - Mediana, desvio-padrão e intervalo de confiança do comprimento-padrão de exemplares de *Trichomycterus dali* amostrados nas grutas Flor da Bodoquena, Mina da Sede, Bebedouro, Saracura e Morro do Jericó.

Figura 38 - Distribuição das frequências do comprimento-padrão de exemplares de *Trichomycterus dali* amostrados nas grutas Flor da Bodoquena (n=12), Mina da Sede (n=14), Bebedouro (n=19).

A distribuição de classes de CP revela uma moda na faixa de 25 a 29 mm nas populações das cavernas Flor da Bodoquena e Mina da Sede, na faixa de 45 a 49 mm, na caverna Bebedouro (Figura 38). O tamanho médio na Gruta Saracura foi de 69,21 mm, com o menor espécime medindo 48,16 mm e o maior, 79,47 mm.

Não houve diferença significativa quanto ao peso entre as populações de *T. dali* ($H = 4,114$; $p = 0,25$), mas é possível observar uma tendência no sentido de comprimentos maiores na Gruta do Bebedouro (Figura 39). A distribuição das classes de peso (Figura 40) mostrou uma moda, na faixa de zero a 0,5 g na Gruta Flor da Bodoquena, e na faixa de 0,3 a 0,5 g na Mina da Sede. Já na Gruta do Bebedouro duas modas destacaram-se, a primeira na faixa de 0,3 a 0,5 g e, secundariamente, uma de indivíduos $> 2,4$ g. No Morro do Jericó, o peso médio foi de 0,6 (dp = 0,2), variando entre 0,5 g e 0,8 g.

Figura 39 - Mediana, desvio-padrão e intervalo de confiança de peso (g) de exemplares de *Trichomycterus dali* amostrados na Gruta Flor da Bodoquena, Mina da Sede, Bebedouro, Gruta Saracura e Morro do Jericó.

Figura 40 - Distribuição das frequências de peso (g) de exemplares de *Trichomycterus dali* amostrados nas grutas Flor da Bodoquena (n=12), Mina da Sede (n=14), Bebedouro (n=19).

O coeficiente de angular da relação entre peso e CP (b) de *T. dali* foi $b = 2,125$, no Morro do Jericó; $b = 3,3355$, na Flor da Bodoquena; $b = 3,2954$, na Gruta do Bebedouro e na Mina da Sede $b = 3,283$ na Mina da Sede.

O estado de higidez diferiu entre as populações ($H = 12,27$; $p = 0,006$), devido à diferença significativa entre a Gruta Morro do Jericó e as demais localidades ($p < 0,01$), Morro do Jericó ($p < 0,01$) e Flor da Bodoquena ($p < 0,01$), Bebedouro ($p < 0,01$) e Mina da Sede ($p < 0,01$). A Figura 41 traz os diagramas de *box-plot* com as diferenças na distribuição do fator de condição, mostrando que no Morro do Jericó o estado de higidez da amostra estudada foi maior que o das outras populações. A distribuição das classes do fator de condição indica que as faixas de 0 a 19,9 foram as mais frequentes na Flor da Bodoquena, Bebedouro e Mina da Sede (Figura 42).

Quanto as classes de pigmentação, a porcentagem de indivíduos por classes de pigmentação foi, na Gruta Flor da Bodoquena, 91 % na classe Pigmentação 0 e 9 % na de Pigmentação 1; no Morro do Jericó, 83% na classes Pigmentação 0 e 17 % na de Pigmentação 1; na Mina da Sede, 14 % na de Pigmentação 1, 14 % na de Pigmentação 2 e 72 % na de Pigmentação 3; na Gruta do Bebedouro, 5 % na de Pigmentação 0; 16 % na de Pigmentação 1, 21 % na de Pigmentação 2 e 58 % na de Pigmentação 3. Na Gruta Saracura três espécimes analisados eram da classe de Pigmentação 0 e um da classe Pigmentação 1 (este último refere-se a um indivíduo mantido em laboratório entre 2008 e 2009).

Para *Trichomycterus* sp. 2 do Buraco das Abelhas, nenhum indivíduo foi observado durante os censos visuais realizados em setembro de 2012 e a tentativa de coleta com covo também não teve sucesso de captura. Dentre os quatro espécimes examinados provenientes o maior tinha CP = 98,4 mm. Todos os exemplares do Buraco das Abelhas, incluindo os da

coleção ictiológica do MZUSP e os mantidos por quase 10 anos no laboratório da Profa. Dra. Eleonora Trajano, enquandram-se na classe 0 de pigmentação.

Figura 41 - Mediana, desvio-padrão e intervalo de confiança do fator de condição de exemplares de *Trichomycterus dali* nas grutas Flor da Bodoquena, Mina da Sede, Bebedouro, Gruta Saracura e Morro do Jericó.

Figura 42 - Distribuição das frequências do fator de condição de exemplares de *Trichomycterus dali* nas grutas Flor da Bodoquena (n=12), Mina da Sede (n=14), Bebedouro (n=19).

5. DISCUSSÃO

5.1. Distribuição de bagres do gênero *Trichomycterus* no carste da Serra da Bodoquena

Os levantamentos realizados em campo, somados aos registros em cavernas subaquáticas, anteriores ao presente estudo (COSTA-JUNIOR, 1998; MORACHIOLLI, 2002), indicam que as populações de bagres troglóbios do gênero *Trichomycterus* encontram-se distribuídas ao longo da área de cabeceiras cársticas da bacia do Rio Miranda na Serra da Bodoquena. Considerando-se os pontos extremos de ocorrência conhecida dessas populações, o Buraco das Abelhas, ao sul, e a Gruta do Urubu Rei, ao norte, esta área abrange 115 km de extensão no sentido norte-sul e 10 km, no sentido leste-oeste, entre as altitudes de 270 e 650 m. Esta é uma área extremamente ampla, comparável apenas no Brasil a de *Rhamdiopsis krugi* (BOCKMANN & CASTRO 2010).

Nota-se que as informações constantes dos cadastros nacionais de cavernas foram pouco eficazes, durante as prospecções, devido à baixa precisão das coordenadas geográficas disponíveis. Assim, em poucos casos foi possível identificar as cavernas encontradas e, por vezes, houve dúvida se algumas já eram cadastradas ou não. A contribuição dos moradores locais foi de fundamental importância para se encontrar cinco das 11 localidades confirmadas (Mina do Velho, Sr. Valdemar, Toca da Onça, Bebedouro e Mina da Sede).

É importante salientar que a região menos prospectada espeleologicamente está ao sul do Planalto da Bodoquena e abrange as microbacias do Rio Perdido, pertencente à bacia do Rio Apa, e do Rio da Prata, afluente da bacia do Miranda. Assim, a ampliação dos levantamentos espeleobiológicos será necessária para se verificar se as espécies troglóbias do gênero, e também de outros táxons, ocorrem nessas áreas.

A ocorrência de populações troglóbias de *Trichomycterus* na microbacia do Rio Perdido é possível do ponto de vista geológico, pois os calcários são contínuos entre as duas grandes redes de drenagens do carste da Serra da Bodoquena, Miranda e Apa, não existindo, em princípio, barreiras à dispersão entre elas (SALLUM-FILHO, 2005). Uma possível barreira seria a hidrológica, pois as grandes bacias drenam o carste em direções opostas, a do Rio Miranda para a direção nordeste e a do Apa, para o sudoeste.

Uma das dificuldades em se aplicar o método comparativo ao estudo dos bagres troglóbios do gênero *Trichomycterus* é a condição parafilética do gênero, diagnosticado pela ausência de sinapomorfias que caracterizam os outros gêneros da subfamília (BASKIN, 1973; de PINNA 1989; 1998; DATOVO & BOCKMANN, 2010). As amostragens extensivas realizadas no Córrego da Serra durante o presente trabalho, em busca de um possível grupo-irmão ou táxon proximalmente relacionado às espécies investigadas, e o levantamento de registros ictiofaunísticos na literatura mostram que a presença de bagres *Trichomycterus* epígeos em drenagens superficiais da área de estudo é pouco provável.

As águas cristalinas dos rios e riachos superficiais e as intensas atividades turísticas, que demandam monitoramentos e planos de manejo, tem estimulado o desenvolvimento de estudos sobre as comunidades epígeas da ictiofauna regional. Levantamentos utilizando censos visuais, coleta com rede de arrasto e pesca elétrica já foram realizados na microbacia do Salobra, córregos Salobrinha e Azul e Rio Salobra, na microbacia do Rio Formoso, córregos Taquaral, Olaria, Seco, Mutum, Restinga, Bonito e Rio Formoso; e na microbacia do Rio da Prata, Rio Olho d'Água, sem registro confirmado de bagres do gênero *Trichomycterus* nas drenagens superficiais desse carste (CASATTI *et al.*, 2010; COSTA-TERRA & SABINO, 2007; FROEHLICH, 2003; FROEHLICH, 2010; CAVALLARO, 2005). COSTA-TERRA & SABINO (2007) citam a ocorrência de um tricomictérideo no Rio Formoso, identificado

como *Trichomycterus* sp. No entanto, o exemplar fixado foi perdido e a identificação permaneceu incerta, feita somente com base na morfologia externa (Luclécia Carnaúba da Costa-Terra, comun. pess.).

Apenas duas espécies de tricomictérideos ocorrem na bacia do Pantanal sulmatogrossense: *Trichomycterus johnsoni* (Flower, 1932), que ocorre no baixo Rio Negro e alto Rio Paraguai (em Decalvados, Mato Grosso), e *Ituglanis herberti* (Miranda Ribeiro, 1940), que ocorre nas bacias dos rios Negro, Taboco, Taquari e Miranda, nesta última, no “Rio Bodoquena” (de PINNA & WOLSIACKI, 2003; WILLINK *et al.*, 2000). Nota-se que, na época da descrição de *I. herberti*, não existia acesso à região da Serra da Bodoquena. Portanto, é provável que os ictiólogos tenham denominado como “Rio Bodoquena” a foz do Rio Salobra no Rio Miranda, já na planície do Pantanal (Otávio Froehlich, comun. pess.).

Assim, é possível que o espécime citado por COSTA-TERRA & SABINO (2007) como *Trichomycterus* sp. seja, na realidade *I. herberti*, que ocorreria no Rio Formoso, outro tributário importante do Rio Miranda. A partir das observações acima, a ausência atual de bagres do gênero *Trichomycterus* nas drenagens superficiais do carste da Serra da Bodoquena aponta para a hipótese de que os bagres *Trichomycterus* troglóbios sejam espécies relictuais, ou seja, linhagens subterrâneas derivadas de espécie epígea atualmente extinta no planalto carbonático.

É interessante notar que as outras espécies de peixes troglóbios conhecidas na Serra da Bodoquena apresentam distribuição mais restrita, em um único sistema de cavernas. *Ancistrus formoso*, espécie altamente troglomórfica, habita as nascentes do Rio Formoso (as cavernas freáticas Formoso e Formosinho), sem registros posteriores à sua descrição (SABINO & TRAJANO, 1997). Já *Rhamdia* sp. e *Ancistrus* sp., caracterizados por alta variabilidade no grau de redução de olhos e pigmentação, ocorrem em sintopia em quatro

cavernas da margem direita do Rio Salobra (CORDEIRO *et al.*, 2013). Para estas três espécies, os congêneres epígeos ocorrem nas drenagens superficiais contínuas aos sistemas subterrâneos (BORGHEZAN, 2013; COSTA-TERRA & SABINO, 2007).

TRAJANO (2001) sugere que a subsidência regional é provavelmente a causa da inundação de cavernas alagadas, como aquelas habitadas por *Ancistrus formoso* e *Trichomycterus* sp. 2, e destaca que o hábitat hipógeo original, presente quando estes peixes colonizaram pela primeira vez as cavernas, seria bem diferente do meio freático onde ocorrem atualmente uma vez que esses são animais de riachos, tipicamente lóticos. No caso de *Trichomycterus* sp. 2, esta hipótese parece ser verdadeira, já que espeleotemas vadosos são observados nos trechos mais superficiais do Buraco das Abelhas (obs. pess).

A distribuição de *Trichomycterus* sp. 1 e *T. dali*, restrita à margem esquerda do Rio Salobra, pode estar relacionada a dois aspectos da geologia e geomorfologia regional. O primeiro é a presença de um ambiente favorável à formação de sistemas subterrâneos mais complexos nesta margem devido ao domínio dos calcários calcíticos da Formação Tamengo, mais solúveis que os outros calcários do Grupo Corumbá. O segundo estaria relacionado à evolução geomorfológica regional que, influenciada pela subsidência da planície do Pantanal, teria causado o rápido entalhamento do Rio Salobra, o qual atingiu rochas impermeáveis (SALLUN-FILHO, 2005) e, portanto, a dispersão pelo nível freáticos sob o Rio Salobra é muito pouco provável. Assim, assumindo-se que os bagres *Trichomycterus* troglóbios não dispersem via superfície, o próprio Rio Salobra deve constituir uma barreira geográfica, isolando-os em sistemas subterrâneos na sua margem esquerda.

A influência da geologia e geomorfologia na geração dos padrões de divergência genética e morfológica das populações aqui estudadas é discutida no Capítulo 2 desta Tese.

5.2. Variações intra- e interpopulacionais nas densidades populacionais, comprimento-padrão, peso e fator de condição *Trichomycterus* sp. 1 e *Trichomycterus dali*

Apesar dos métodos de marcação-recaptura (MR) terem sido utilizados com sucesso para outras espécies de peixes troglóbios (TRAJANO, 2001), o mesmo não foi eficiente no estudo realizado na Gruta do Urubu Rei.

É possível que o predomínio de juvenis na população da Gruta Urubu Rei tenha contribuído para a baixa eficiência da marcação. Provavelmente, a pequena quantidade de elastômero que podia ser injetado em indivíduos pequenos e em condição metabólica de crescimento, mais acelerada que nos adultos, favoreceu a rápida absorção do pigmento. O mesmo lote de elastômero foi utilizado no estudo populacional de *Ancistrus* sp., realizado na Gruta das Fadas simultaneamente a este trabalho e, neste caso, as marcas permaneceram por mais de um ano e a identificação precisa dos indivíduos recapturados foi possível (BORGHEZAN, 2013). Deste modo, a experiência com a população da Gruta do Urubu Rei demonstra que um método de marcação individual para peixes troglóbios pode ser eficiente para algumas espécies, mas não necessariamente para outras. Neste trabalho, o censo visual (CV) demonstrou-se útil para o monitoramento populacional e comparações intra- e interpopulacionais.

Além da possibilidade de perda das marcas, as baixas taxas de recaptura na Gruta do Urubu Rei sugerem que esta caverna abriga uma população aberta (com alta proporção de indivíduos migrantes), e/ou que ali ocorra uma população grande, o que é pouco provável tendo em vista as baixas densidades obtidas nos CVs. Altas taxas de recaptura indicam populações de tamanho pequeno, ou com pequenas taxas de deslocamento individual, como foi observado, por exemplo, para *P. kronei*, *T. itacarambiensis* e *A. crypthophthalmus* (TRAJANO, 1991; 1997; BICHUETTE & TRAJANO, 2007), e também para duas outras

espécies de siluriformes troglóbios estudadas na Serra da Bodoquena, *Rhamdia* sp. e *Ancistrus* sp. (BORGHEZAN, 2013). A princípio, a primeira hipótese, de que a Gruta do Urubu Rei abriga uma população aberta, parece ser a mais plausível. De qualquer modo, os CVs apontam para a presença de população flutuante, que pode atingir tamanho da ordem de até 10^3 indivíduos em anos com ciclos de chuva normais (caso de 2010). Este estudo em médio prazo demonstrou que a população da Gruta Urubu Rei está sujeita a grandes variações temporais na densidade populacional, muito provavelmente associadas às variações na pluviosidade sazonais e entre anos. Apesar de não serem dados quantificados, é interessante destacar que em anos anteriores ao presente estudo (2002, 2003 e 2008) a abundância de bagres *Trichomycterus* sp. 1 na caverna era maior do que o estimado em 2011 e 2012, anos excepcionais. Portanto, a densidade média da população deve ser considerada pelo ano de 2010, de 0,2 ind./m², quando o ciclo anual de pluviosidade foi dentro do padrão considerado normal para a região.

A densidade populacional na Gruta do Urubu Rei pode ser considerada média a alta em comparação a outros peixes troglóbios (TRAJANO, 2001). Em relação a outras espécies subterrâneas de Trichomycteridae, este valor é comparável ao observado para as espécies do gênero *Ituglanis* que ocorrem em cavernas do estado de Goiás: *I. mambai* da Lapa do Sumidouro (0,12 ind./m² no fim da estação seca e 0,04 ind./m² início da estação seca – BICHUETTE & TRAJANO, 2008); *I. bambui* da Caverna Angélica (mín. 0,04 ind./m²), *I. epikarsticus* da Caverna São Mateus (0,08 ind./m²), *I. ramiroi* da Caverna São Bernardo (0,03 ind./m²) (BICHUETTE & TRAJANO, 2004); *I. passensis* da Lapa Passa Três (0,08 a 0,26 ind./m² – FERNÁNDEZ & BICHUETTE, 2002); e, também, a outras espécies troglóbias de *Trichomycterus*: *T. itacarambiensis* Gruta Olhos d'Água, Minas Gerais (0,15-0,20 ind./m² na estação seca, estimada a partir de MR – TRAJANO, 1997), *T. rubbioli* da Lapa dos Peixes e

Gruna Água Clara, Serra do Ramalho, Bahia (15 a 17 espécimes observados ao longo de 180 m do riacho subterrâneo da Lapa dos Peixes – BICHUETTE & RIZZATO, 2012) e *Trichomycterus* sp. da Cueva del Guacharo, Venezuela (0,01 ind./m² – TRAJANO, 2001).

A diferença significativa no fator de condição entre os anos amostrados, com tendência para distribuição em classes de valor mais baixo em 2011, demonstra que os indivíduos ficaram gradativamente mais magros ao longo do período estudado. Em épocas de estiagem é esperado que ocorra uma redução do alimento disponível na caverna. Como o curso da água na Gruta do Urubu Rei é abastecido por uma janela freática, naturalmente pobre em nutrientes (CULVER, 1982), a entrada de matéria orgânica no conduto principal deve se dar, em grande parte, pela percolação de água através das fendas profundas do epicarste, que interceptam o teto da caverna em alguns trechos. A ausência de grandes acúmulos de material orgânico e a espessura de 50 m de rocha calcária acima do conduto, indicam que o *input* de energia neste sistema seja baixo, tornando a população ainda mais suscetível às variações na pluviosidade.

A associação do declínio populacional à redução das chuvas, a curto e longo prazo, foi observada para *Trichomycterus itacarambiensis* (TRAJANO, 1997; TRAJANO *et al.* 2009). Neste caso, o declínio na densidade populacional foi mais evidente nas seções próximas à ressurgência do que nos trechos à montante, devido à diminuição das enchentes sazonais entre 1994 e 2008. Como consequência de redução das enchentes, teria havido uma diminuição na capacidade do curso da água de transportar sazonalmente material orgânico ao longo dos 5 km entre a insurgência e a ressurgência da Gruta Olhos d'Água, reduzindo a disponibilidade de alimentos nos trechos à jusante do rio subterrâneo.

Na Gruta Urubu Rei, a maior amplitude de variação de densidade populacional ocorreu nos setores próximos à zona de transição entre os ambientes epígeo e hipógeo. Nestas

seções, foram observados possíveis predadores de bagres troglóbios, destacando-se os hemípteros epígeos da família Belostomatidae e girinos da rã *Leptodactylus siphax*. Ambas as espécies são capazes de predação de peixes pequenos em ambientes aquáticos mais lânticos (SILVA & GIARETTA, 2009; TOBLER *et al.*, 2007). Em abril de 2010, no poço externo abastecido pela água da ressurgência, a densidade de bagres foi a mais alta registrada ao longo do monitoramento (6,0 ind./m²) e a abundância dos possíveis predadores foi baixa, com apenas dois juvenis de Belostomatidae e nenhum exemplar de *L. siphax*. Na visita seguinte, apenas um peixe foi observado neste mesmo setor, enquanto centenas de girinos de *L. siphax* e cerca de 20 hemípteros Belostomatidae ocupavam o poço. Nota-se que não ocorrem outras espécies de peixes na drenagem da Gruta do Urubu Rei.

De modo geral, a zona de entrada das cavernas pode oferecer condições favoráveis ao estabelecimento, permanente ou sazonal, de organismos de superfície, os quais podem interagir como competidores e/ou predadores das espécies troglóbias. Por sua vez, na ausência de competidores e predadores epígeos, os troglóbios podem ocasionalmente alimentar-se em ambientes de superfície (CULVER, 1982; SKET, 1977). Como os regimes de predação diferem notavelmente entre o meio epígeo e hipógeo, este tipo de interação ecológica na zona de transição deve ter, possivelmente, uma importante implicação evolutiva no isolamento dos peixes troglóbios no meio subterrâneo. TOBLER *et al.* (2007) verificaram que belostomatídeos predam frequentemente *Poecilia mexicana* na Cueva del Azufre e exibem uma preferência pelos peixes maiores. Estudos futuros poderão testar o efeito da predação na manutenção de bagres *Trichomycterus* sp. 1 no meio subterrâneo, aproveitando as condições favoráveis a este tipo de investigação na ressurgência da Gruta do Urubu Rei.

As densidades populacionais relativamente mais altas e constantes nos setores próximos à fenda freática (0,3 a 0,10 ind./m²), em relação aos trechos da porção mediana da

caverna sugerem que esse seja um ponto importante de entrada e saída de indivíduos. Esta movimentação de indivíduos entrando e saindo da fenda foi observada diversas vezes durante os trabalhos de campo, o que fortalece a hipótese de que a Gruta do Urubu Rei abriga uma população aberta.

Entre setembro de 2013 e janeiro de 2014, três eventos reprodutivos de espécimes provenientes da Mina do Velho, ocorreram em laboratório 65, 42 e 58 filhotes em cada evento. Os filhotes da primeira prole mediam 4 mm de comprimento-padrão após a absorção do saco vitelínico e, 90 dias depois, 14 indivíduos desta prole apresentavam tamanhos entre 15,8 e 21,3 mm. Estes dados sugerem que, em pouco tempo, os juvenis dessa espécie podem atingir os tamanhos mínimos e médios observados na Urubu Rei. Apesar de poucos, os três deslocamentos registrados indicam que espécimes adultos podem percorrer os 400 m do conduto da Urubu Rei em poucos dias, mostrando-se bem menos sedentários que outros peixes subterrâneos brasileiros estudados por MR, tais como bagres *P. kronei*, *T. itacarambiensis*, *Rhamdia* sp. da Bodoquena, todos de maior porte que *Trichomycterus* sp. 1 (TRAJANO, 1997; 2001; TRAJANO & BICHUTTE, 2007; BORGHEZAN, 2013).

Portanto, considerando-se o número de indivíduos contados nos CVs, a capacidade de deslocamento de indivíduos maduros e os dados referentes à fecundidade e taxas de crescimento da prole em *Trichomycterus* sp. 1, é razoável supor que poucos adultos reprodutivos, que habitem temporariamente a caverna, sejam capazes de colonizar a Gruta do Urubu Rei em um tempo relativamente curto.

Contrastando com os dados observados na Gruta do Urubu Rei, os maiores valores de densidade populacional e de comprimento-padrão registrados na Mina do Velho (17,5 ind./m²), na Gruta do Sr. Valdemar (18,0 ind./m²) e na Gruta Califórnia (10 ind./m²), assim como a distribuição das classes de tamanho, sugerem que estas localidades abrigam

populações-fonte. Por serem habitats superficiais, é provável que a entrada de matéria orgânica seja maior nestas cavernas, permitindo que suportem maiores densidades populacionais devido à maior disponibilidade alimentar.

Por outro lado, é esperado que, em condições de alta densidade populacional, a competitividade intraespecífica aumente, principalmente por recursos alimentares e espaço (BEGON *et al.*, 2007), condição que não seria favorável aos indivíduos em estágios iniciais de desenvolvimento. O tricomictério epígeo *Hatcheria macreii*, da Patagônia, por exemplo, ocupa diferentes nichos ao longo do desenvolvimento ontogenético (BARRIGA & BARTTINI, 2009). Neste caso, a área marginal do rio foi identificada como o provável habitat berçário dos estágios larva-juvenil, devido à menor probabilidade de predação interespecífica.

Assim sendo, é possível que as áreas marginais do aquífero superficial, em ambientes menos abertos à superfície, como o conduto da Gruta do Urubu Rei, constituam locais de reprodução e crescimento para *Trichomycterus* sp. 1 (habitat berçário), menos expostos a competição e predação intra- e interespecífica. Este é o primeiro registro dessa natureza para peixes troglóbios brasileiros (e, até onde sabemos, para mundo).

Ao contrário do observado para *Trichomycterus* sp. 1, os dados atuais indicam que *T. dali* e *Trichomycterus* sp. 2 distribuem-se espacialmente de modo diferente no habitat subterrâneo.

Assim como *Trichomycterus* sp. 1, foi observada alta densidade populacional de *T. dali* no meio freático superficial, em contato direto com o meio epígeo, no caso, a Mina da Sede com a notável densidade de 7,5 ind./m². Porém, os maiores indivíduos ocorrem nas cavernas Bebedouro e Saracura, que tingem o freático profundo. O ambiente freático superficial da Mina da Sede, assim como das cavernas Flor da Bodoquena e Morro do Jericó,

teria maior disponibilidade alimentar que o freático profundo, favorecendo o desenvolvimento dos imaturos. É provável que ao longo do crescimento os indivíduos sejam cada vez mais capazes de se afastar da superfície ao adquirir maior eficiência energética para deslocar-se para o meio oligotrófico do freático profundo. Portanto, os dados de distribuição sugerem que os adultos de *T. dali* habitam preferencialmente o meio freático mais profundo do que *Trichomycterus* sp. 1, o local de reprodução e crescimento é possivelmente no freático superficial, incluindo áreas abertas ao meio epígeo.

O mesmo padrão observado para *T. dali* é esperado para *Trichomycterus* sp. 2. A adiposa dorsal mais desenvolvida nessas duas espécies e os maiores valores obtidos para o coeficiente angular de *T. dali* ($b > 3$), em comparação com *Trichomycterus* sp. 1 ($b < 3$), podem ser consideradas evidências da especialização ao meio freático profundo. Neste tipo de ambiente, mais oligotrófico do que o ambiente freático superficial, é esperado que os organismos sejam mais eficientes na utilização energética do alimento e na capacidade de armazenar gordura (HÜPPOP, 2012).

Portanto, o presente estudo sugere que os bagres *Trichomycterus* troglóbios da Serra da Bodoquena possuem diferentes padrões ecológico-populacionais e especializações para o uso do hábitat. Indubitavelmente, esta é apenas a “ponta do *iceberg*” no conhecimento do modo de vida desses animais. Estudos detalhados sobre a dieta e disponibilidade alimentar, reprodução, competição intra- e interespecífica, predação, além das especializações morfológicas e comportamentais devem ser aprofundados para se testar as hipóteses geradas a partir deste trabalho.

5.3. Conservação dos peixes troglóbios *Trichomycterus* na Serra da Bodoquena

CORDEIRO *et al.* (2013 – Anexo II) apresenta uma síntese das principais ameaças que atualmente contribuem para perda e/ou alteração dos habitats subterrâneos na Serra da Bodoquena. Entre elas destaca-se a mineração (principalmente de calcário e ferro), o rebaixamento do lençol freático para construção e controle de minas, o desflorestamento, a agricultura (com uso de fertilizantes e agrotóxicos), a pecuária, o mau uso e contaminação da água subterrânea e o turismo depredatório não regulamentado. Adicionalmente aos casos descritos detalhadamente por CORDEIRO *et al.* (2013), serão apontadas outras questões relevantes à conservação das populações de *Trichomycterus* da região, levantadas posteriormente a essa publicação.

O monitoramento populacional de *Trichomycterus* sp. 1 é um importante avanço na compreensão dos limites ecológicos para o uso turístico da Gruta do Urubu Rei, que se encontra fora do PNSB. Como um sítio elencado entre os *Geopoints* do *Geopark* Bodoquena-Pantanal (BRASIL, 2010), a pressão para a utilização turística da caverna é crescente. É possível que a visitação ocorra ao longo da trilha de tufas calcárias até o paredão da gruta, porém não é recomendado que haja visitação em seu interior, vista a importância da drenagem como um sítio reprodutivo dos bagres troglóbios e a fragilidade da população às alterações ambientais. Apesar do apelo ao uso turístico da Gruta do Urubu Rei, a caverna encontra-se sem proteção efetiva e não há controle sobre a visitação informal e esporádica que ocorre no local.

Apenas uma das quatro populações de *Trichomycterus* sp. 1 está inserida na área de preservação do PNSB, enquanto as outras encontram-se em propriedades particulares. A Gruta do Sr. Valdemar, apesar de estar teoricamente protegida na área do Parque, encontra-se no limite deste com o Assentamento Canaã. A área ainda não foi oficialmente adquirida e

ainda ocorre alguma atividade de criação extensiva de gado nos entornos da caverna. Como um dos fatores limitantes para a atividade é o abastecimento de água do rebanho, os moradores locais tem feito esforços contínuos para instalar uma bomba d'água na caverna. Um sistema de captação já liga a Gruta do Sr. Valdemar até uma propriedade, distante 2 km da caverna. Porém, como o nível da água na gruta fica mais alto esporadicamente, o sistema de captação da água nunca chegou a funcionar.

A mesma situação aplica-se à Mina do Velho, onde o uso da água subterrânea foi feito durante muitos anos para abastimento humano e de animais de criação mas, neste caso, a propriedade está atualmente abandonada. Porém, por serem possivelmente populações-fonte de *Trichomycterus* sp. 1, a Mina do Velho e a Gruta do Sr. Valdemar devem ser foco urgente de ações para conservação.

Algumas pressões antrópicas sobre a fauna de caverna são mais difíceis de medir ao longo do tempo, como as alterações hidrológicas causadas pelo uso inadequado da terra, que pode alterar o ciclo hidrológico normal e aumentar a sedimentação do sistema cárstico (ELLIOT, 2012). O assoreamento de condutos freáticos deve ser considerado atualmente um dos problemas mais graves que afetam indiretamente os sistemas cársticos no interior do PNSB. No caso da Gruta Califórnia, o avanço do assoreamento é claramente notado pelos moradores locais, que relatam as mudanças nas drenagens da região do Distrito de Morraria, a qual inclui a zona de recarga da Urubu Rei, após a mudança da atividade agrícola na região, do plantio de café para a pecuária extensiva.

Grande parte da zona de recarga dos sistemas cársticos que drenam a margem esquerda do Rio Salobra encontra-se fora do PNSB, em áreas de intensas atividades rurais e em um contexto geológico favorável à geração de grandes volumes de sedimento (encontro litológico entre calcário e rochas friáveis). Pode-se, assim, afirmar que os habitats

subterrâneos localizados dentro e fora da área de preservação do parque estão suscetíveis ao assoreamento. Isto inclui toda área de distribuição de *T. dali* e *Trichomycterus* sp. 1.

A situação é ainda mais preocupante diante da tendência das atividades rurais nos entornos do PNSB mudarem para a monocultura de soja, como já é visto nos entornos do município de Bonito, e para a pecuária intensiva nos maiores latifúndios do Distrito de Morraria. Apesar de não ser possível, no momento, quantificar tais impactos do indevido uso do solo sobre as populações de peixes troglóbios, e outros organismos subterrâneos, ações para evitar o avanço do assoreamento sobre o carste são emergenciais.

Por último, cabe ressaltar que as atividades exploratórias em cavernas subaquáticas trouxe um grande avanço científico para a região, como a descoberta dos próprios bagres *Trichomycterus* estudados neste trabalho. Porém, locais como o Buraco das Abelhas, são utilizados com frequência devido ao fácil acesso à entrada da caverna (veículos são estacionados a menos de 50 m do ponto de mergulho). Torna-se difícil assumir um baixo impacto ambiental da atividade de mergulho em cavernas sem o devido monitoramento da população de *Trichomycterus* sp. 2. Assim, é necessário que atividades de treinamento de mergulhadores sejam feitas em locais com o monitoramento contínuo dos peixes troglóbios, até mesmo pelo fato destes serem bons indicadores da qualidade dos ecossistemas subterrâneos onde habitam (BICHUETTE & TRAJANO, 2010; GALÃO & BICHUETTE, 2012).

6. CONCLUSÕES

- Bagres troglóbios do gênero *Trichomycterus* distribuem-se por uma ampla área no Planalto da Serra da Bodoquena, ao longo das cabeceiras cársticas da Bacia do Rio Miranda.
- As espécies troglóbias de *Trichomycterus* provelmente constituem em relictos biogeográficos na Serra da Bodoquena, dada a ausência de representantes do gênero nas ictiocenoses epígeas.
- A Gruta do Urubu Rei abriga uma população aberta e marginal de *Trichomycterus* sp. 1, composta principalmente por juvenis, sendo, possivelmente, um berçário desta espécie.
- A população de *Trichomycterus* sp. 1 da Gruta do Urubu Rei está sujeita a grandes variações na densidade populacional associada às variações na pluviosidade.
- A Mina do Velho e a Gruta do Sr. Valdemar abrigam populações-fonte de *Trichomycterus* sp. 1, com maior proporção de indivíduos potencialmente reprodutivos.
- As maiores densidades populacionais de indivíduos maduros de *Trichomycterus* sp. 1 foram encontradas em ambientes freáticos superficiais, em contado direto ou próximo à superfície, indicando uma preferência por este tipo de hábitat.
- Bagres *Trichomycterus dali* possivelmente preferem e são especializados em habitar o meio freático mais profundo do que *Trichomycterus* sp. 1.
- Os bagres *Trichomycterus* troglóbios da Serra da Bodoquena estão sujeitos a pressões antrópicas consideráveis, como o assoreamento de condutos subterrâneos, rebaixamento e contaminação do lençol freático e o turismo não-controlado, portanto podem ser considerados, no mínimo, vulneráveis.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F. F. M. 1965. Geologia da Serra da Bodoquena (Mato Grosso) Brasil. *Boletim da Divisão de Geologia e Mineralogia*, DNPM, Rio de Janeiro, v. 219, p.1-96.
- BASKIN, J. N. 1973. *Structure and relationships of the Trichomycteridae*. 389p. Unpublished Ph.D. Dissertation, City University of New York, New York.
- BARR, T. C. 1968. Cave ecology and evolution of troglobites. *Evolutionary Biology*, v.2, p.35-102.
- BARRIGA, J. P.; BATTINI, M. A. 2009. Ecological significances of ontogenetic shifts in the stream-dwelling catfish, *Hatcheria macraei* (Siluriformes, Trichomycteridae), in a Patagonian river. *Ecology of Fresh Water Fish*; v.18, n.3, p.395-405.
- BEGON, M. 1979. *Animal populations; Animal marking; Mathematical models*. University Park Press. 97 p.
- BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. 2007. *Ecology: From Individuals to Ecosystems*, 4^aed. Blackwell Publishing Ltd. 738 p.
- BICHUETTE, M. E.; TRAJANO, E. 2010. Conservation of Subterranean Fishes. In: TRAJANO, E. BICHUETTE, M. E.; KAPOOR, B. G. (Org.). *Biology of Subterranean Fishes*, 1ed. Enfield: Science Publishers, v.1, p.65-80.
- BICHUETTE, M. E.; RIZZATO P. P. 2012. A new species of cave catfish from Brazil, *Trichomycterus rubbioli* sp. n., from Serra do Ramalho karstic area, São Francisco River basin, Bahia State (Siluriformes: Trichomycteridae). *Zootaxa*, v.3480, p.48-66.
- BICHUETE, M. E.; TRAJANO, E. 2004. Three new subterranean species of *Ituglanis* from Central Brazil (Siluriformes: Trichomycteridae). *Ichthyological Explorations of Freshwaters*, Cornol, v.15, n.3, p.243-256.
- BICHUETTE, M. E.; TRAJANO, E. 2008. *Ituglanis mambai*, a new subterranean catfish from a karst area of Central Brazil, rio Tocantins basin (Siluriformes: Trichomycteridae). *Neotropical Ichthyology*, v. 6, p. 9-15.
- BICHUETTE, M. E.; RIZZATO, P. P.; CAMARGO, A. L.; BRANDI, R.; SENNA-HORTA, L. 2013. Um novo bagrinho troglóbio brasileiro: A notável Serra do Ramalho, sudoeste da Bahia. *O Carste*, v.25, n.1, p.58-59.
- BORGHEZAN, R. 2013. *Ecologia populacional e comportamento de peixes subterrâneos, Rhamdia sp. e Ancistrus sp., da área cárstica da Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul (Siluriformes: Heptapteridae, Loricariidae)*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da USP, 134 p.

BRASIL. 2000. Decreto s/nº, de 21 de setembro de 2000, que cria Parque Nacional da Serra da Bodoquena, no Estado de Mato Grosso do Sul.

CAVALLARO, M. 2005. *Variação Longitudinal das Ictiocenoses de Poções em um Córrego da Serra da Bodoquena - MS*. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS.

CASATTI, L.; ROMERO, R. M.; TERESA, F. B.; SABINO, J.; LANGEANI, F. 2010. Fish community structure along a conservation gradient in Bodoquena Plateau streams, central West of Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensis*, vol. 22, no. 1, p. 50-59,

CAMARGO, R. R.; LOURENÇÃO, M.L. 2009. Levantamento espeleológico da Serra da Bodoquena. Sociedade Brasileira de Espeleologia. Congresso Brasileiro de Espeleologia, Ouro Preto (MG), 07-10 de junho de 2007, p.53-60.

CAMPANHA, G. A. C.; BOGGIANI, P. C.; SALLUN FILHO, W.; SÁ, F. R.; ZUQUIM, M. P. S.; PIACENTINI, T. 2011 . A Faixa de Dobramento Paraguai na Serra da Bodoquena e Depressão do Rio Miranda, Mato Grosso do Sul. *Geologia USP, Série Científica*, v. 11, p. 79-96.

CHRISTIANSEN, K.A. 2012. Troglomorphism. In: CULVER, D. C.; WHITE, W. B. (Org.). *Encyclopedia of Caves*, 2nd ed., Chennai: Academic Press. p. 517-527,

CORDEIRO, L. M.; BORGHEZAN, R.; TRAJANO (no prelo). Subterranean biodiversity in the Serra da Bodoquena karst area, Paraguay River basin, Mato Grosso do Sul, Southwestern Brazil. *Biota Neotropica*.

CORDEIRO, L. M.; BORGHEZAN, R.; TRAJANO, E. 2013. Distribuição, riqueza e conservação dos peixes troglóbios da Serra da Bodoquena, MS (Teleostei: Siluriformes). *Revista da Biologia*, v.10, n.2, p. 21-27,

COSTA JR, E. P. D. 1998. *Levantamento faunístico das cavernas inundadas da Serra da Bodoquena, região de Bonito, MS*. Iniciação - Instituto de Biociências da USP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

COSTA Jr., E. 2004. Fish from the Underwater Caves of Bodoquena Plateau, Mato Grosso do Sul, Southwestern Brazil. *DIR Lifestyle & Underwater Adventure Magazine*, v.5, p.8-12.

COSTA-TERRA, L. C.; SABINO, J. 2007. Composição da ictiofauna de dois riachos, um impactado e outro conservado, da bacia do rio Formoso, Município de Bonito, Mato Grosso do Sul. *Ensaio e Ciência*, Campo Grande, v. 11, p.49-58.

CULVER, D. C. 1982. *Cave Life: Evolution and Ecology*. Massachusetts and London: Harvard University Press. Cambridge, 189p.

DATOVO, A.; BOCKMANN, F. A. 2010. Dorsolateral head muscles of the catfish families Nematogenyidae and Trichomycteridae (Siluriformes: Loricarioidei): comparative anatomy and phylogenetic analysis. *Neotropical Ichthyology*, v. 8, p. 193-246.

ELLIOT, W. R. 2012. Protecting Caves and Cave Life. In: WHITE, W.B.; CULVER, D.C. (Org.). *Encyclopedia of Caves*. 2ed. Chennai: Academic Press, p.624-633.

FERNÁNDEZ, L.; BICHUETTE, M. E. 2002. A new cave dwelling species of *Ituglanis* from the São Domingos karst, central Brazil (Siluriformes: Trichomycteridae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, v.13, n.3, p.273-278.

FORD, D.; WILLIAMS, P. 2007. *Karst hydrogeology and geomorphology*. John Wiley & Sons Ltd, 2ed, 579p.

FROEHLICH, O. 2003. Padrões de variação da riqueza de espécies e composição de comunidades de peixes em poções de um riacho da Serra da Bodoquena, MS. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS.

FROEHLICH, O. 2010. Ictiofauna de um córrego na Serra da Bodoquena: Estrutura, Variações Longitudinal e Temporal e Efeitos sobre Comunidades Bentônicas. Tese de doutorado. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS. 92p.

GALLÃO, J. E.; BICHUETTE, M. E. 2012. Lista de fauna ameaçada de extinção e os entraves para a inclusão de espécies: O exemplo dos peixes troglóbios brasileiros. *Natureza e Conservação*, v.10, n.1, p.83-87.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, v.4, n.1, 9p. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

HÜPPOP, K. 2000. How do cave animals cope with the food scarcity in caves? In H. Wilkens, D. C. Culver, & W. F. Humphreys (eds). *Subterranean ecosystems*, Amsterdam: Elsevier, p.189-210.

JUBERTHIE, C. 2000. Diversity of karstic and pseudokarstic hypogen habitats in the world. In: WILKENS, H.; CULVER, D.C.; HUMPHREYS, W. S. (Orgs). *Ecosystems of the World*, Amsterdam: Elsevier, v.30, p. 17-39, 2000.

MORACCHIOLI, N. 2002. Estudo dos Spelaeogriphacea brasileiros, crustáceos Peracarida subterrâneos. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

PALMER, A. N. 2007. *Cave Geology*. Dayton, Ohio: Cave Books, 288p.

PARZEFALL, J.; TRAJANO, E. 2010. Behavioral patterns in Subterranean Fishes. In: TRAJANO, E., BICHUETTE, M.E.; KAPOOR, B. G. (Org.). *Biology of Subterranean Fishes*, 1ed. Enfield: Science Publishers, p.81-114.

de PINNA, M. C. C. 1989. A new sarcoglanidine catfish, phylogeny of its subfamily, and an appraisal of the phyletic status of the Trichomycterinae. *American Museum Novitates*, v.2950, p.1-39.

de PINNA, M. C. C. 1998. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. In: MALABARBA, L. R.;

REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S.; LUCENA, C. A. S. (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Edipucrs, p.279-330.

POULSON, T. L. 1963. Cave adaptation in amblyopsid fishes. *American Midland Naturalist*, v.70, p.257-290.

PROUDLOVE, G. S. 2010. Biodiversity and distribution of the subterranean fishes of the world. Pp. 41-63. In: TRAJANO, E.; BICHUETTE, M. E.; KAPOOR, B. G. (eds.). *Biology of Subterranean Fishes*. Enfield, Science Publishers, 480p.

PROUDLOVE, G.S. 2001. The conservation status of hypogean fishes. In: ROMERO, A. 1ed. *The biology of hypogean fishes*. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, pp. 201-213.

RIZZATO, P. P.; COSTA-JUNIOR, E.; TRAJANO, E.; BICHUETTE, M. E. 2011. *Trichomycterus dali*: a new highly troglomorphic catfish (Siluriformes: Trichomycteridae), from Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Central Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v.9, p.477-491.

SABINO, J.; TRAJANO, E. 1997. A new species of blind armoured catfish, genus *Ancistrus*, from caves of Bodoquena region, Mato Grosso do Sul, southeastern Brazil (Siluriformes, Loricariidae, Ancistrinae). *Revue Française de Aquariologie*, França, v.24, n.3-4, p.73-78.

SALLUN-FILHO, W.; KARMANN, I.; BOGGIANI, P. C. 2004. Paisagens cársticas da Serra da Bodoquena, MS. In: MANTESSO, V. N.; BARTORELLI, A.; CARNEIRO, C. D. R.; BRITO NEVES, B. B. (Org.). *Geologia do continente Sul-Americano: Evolução da Obra de Fernando Flavio Marques de Almeida*. 1aed. São Paulo: BECA, p.425-433.

SALLUN-FILHO, W. 2005. *Geomorfologia e geoespeleologia do carste da Serra da Bodoquena, MS*. Tese (Doutorado), Instituto de Geociências – USP. 212p.

SALLUN FILHO, W. ; KARMANN, I. ; BOGGIANI, P. C. ; PETRI, S. ; CRISTALLI, P. S. ; UTIDA, G. 2009. A deposição de tufas quaternárias no estado de Mato Grosso do Sul: proposta de definição da formação Serra da Bodoquena. *Geologia USP. Série Científica*, v. 9, p. 47-60.

SALLUN FILHO, W.; KARMANN, I. 2007. Geomorphological map of the Serra da Bodoquena karst, west-central Brazil. *Journal of maps*, p.282-295.

SALLUN FILHO, W.; KARMANN, I. 2012. Províncias cársticas e cavernas no Brasil. In: HASSUI, Y.; CARNEIRO, C. D. R.; ALMEIDA, F. F. M.; BARTORELLI, A. (Org.). *Geologia do Brasil*. São Paulo: Beca, p. 629-641.

SCREMIN-DIAS, E.; POTT, V. J.; SOUZA, P. R.; HORA, R. C. 1999. *Nos Jardins Submersos da Bodoquena: Guia para Identificação das Plantas Aquáticas de Bonito e Região de Bonito/MS*. Editora da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 160p.

SILVA, W. R.; GIARETTA, A. A. 2009. On the natural history of *Leptodactylus sypfax* with comments on the evolution of reproductive features in the *L. pentadactylus* species group (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Natural History*, v.43, p.191-203.

TRAJANO, E. 1991. Population ecology of *Pimelodella kronei*, troglobitic catfish from southeastern Brazil (Siluriformes, Pimelodidae). *Environmental Biology of Fishes*, v.49, n.3, p.757-769.

TRAJANO, E. 1997. Population ecology of *Trichomycterus itacarambiensis*, a cave catfish from eastern Brazil (Siluriformes: Trichomycteridae). *Environmental Biology of Fishes*, v.50, p.357-369.

TRAJANO, E. 2012. Ecological classification of subterranean organisms. In: WHITE, W. B.; CULVER, D. C. (Org.). *Encyclopedia of Caves*. 2ed. Chennai: Academic Press, p.275-277.

TRAJANO, E. 2000. Cave faunas in the Atlantic tropical rain forest: composition, ecology and conservation. *Biotropica*, v.32, n.4b, p.882-893.

TRAJANO, E. 2001. Ecology of subterranean fishes: an overview. *Environmental Biology of Fishes*, v.62, n.1-3, p.133-160.

TRAJANO, E.; BICHUETTE, M. E. 2007. Population ecology of cave armoured catfish, *Ancistrus cryptophthalmus* Reis, 1987, from Central Brazil (Siluriformes: Loricariidae). *Ecology of Freshwater Fish*, v.16, p.105-115.

TRAJANO, E.; BICHUETTE, M. E. 2010. Subterranean fishes of Brasil. In: TRAJANO, E.; BICHUETTE; KAPOOR B. G. (Eds.) *Biology of subterranean fishes*, 1ed. Enfield: Science Publishers, p.331-335.

TRAJANO, E.; SECUTTI, S.; BICHUETTE, M. E. 2009. Population decline in a Brazilian cave catfish, *Trichomycterus itacarambiensis* Trajano & Pinna, 1986 (Siluriformes): reduced flashflood as a probable cause. *Speleobiology Notes*, v.1, p.24-27.

WATSON, J.; HAMILTON-SMITH, E.; GILLIESON, D.; KIERNAN, K. 1997. *Guidelines for Cave and Karst Protection*. Internacional Union for Conservation of Nature, 63p.

WILLINK, P. W.; FROEHLICH, O.; ALLISON, A. M.; OYAKAWA, O.; CATELLA, A.; CHERNOFF, B.; LIMA, F. C. T.; PIZA, M. T.; ORTEGA, H.; BARRIGA, R. 2000. Fishes of the rios Negro, Negrinho, Taboco, Aquidauana, Taquari, and Miranda, Pantanal, Brasil: Diversity, Distribution, Critical Habitats and Value. In: Willink, P. W.; Chernoff, B.; Alonso, L. E.; Montambault, J. R.; Lourival, R. (Org.). A Biological Assessment of the Aquatic Exosystems of the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. *RAP Bulletin of Biological Assessment*. Washington: Conservation International, v.18, p. 63-81.

TOBLER, M., SCHLUPP, I. and PLATH, M. (2007), Predation of a cave fish (*Poecilia mexicana*, Poeciliidae) by a giant water-bug (*Belostoma*, Belostomatidae) in a Mexican sulphur cave. *Ecological Entomology*, v.32, p.492-495.

ZAR, J. H. 2010. *Biostatistical analyses*. Prentice Hall Inc, 5ed, 921p.

**Filogeografia de bagres subterrâneos do gênero *Trichomycterus* na
área cárstica da Serra da Bodoquena: congruência entre forma e
marcadores do mtDNA
(Siluriformes: Trichomycteridae)**

RESUMO

Entre as populações troglóbias de bagres *Trichomycterus* na Serra da Bodoquena, foram identificadas três linhagens divergentes através do uso de duas técnicas complementares e independentes, a análise de sequências de nucleotídeos do DNA mitocondrial e a morfometria geométrica. As genealogias obtidas para os genes COI, Cit b e 16S foram concordantes, apresentando o mesmo padrão de distribuição geográfica. A divergência genética não está correlacionada com a distância geográfica, sendo melhor explicada pela presença dos haplogrupos. Foi detectado um alto grau de isolamento populacional e baixa variação genética intrapopulacional. Este resultado pode ser explicado pela compartimentação do hábitat, devido ao predomínio de bacias poligonais ao longo do Planalto da Bodoquena, limitando o fluxo gênico entre as populações. Na Gruta Morro do Jericó foi detectada a ocorrência sintópica dos haplogrupos I e II, o que explica o alto valor de divergência nesta localidade. Possivelmente, essa é uma zona secundária de contato entre *T. dali* e *T.sp. 1*. A presença de fluxo de água subterrânea com rotas profundas no Setor sul, pode explicar o menor grau de divergência genética e morfológica entre *T. dali* e *Trichomycterus sp. 2*. A forma corporal indica diferentes graus de especialização, possivelmente associados às diferentes condições ambientais entre os sistemas cársticos da área de estudo. A presença da linhagem mais troglomórfica ao sul da Serra da Bodoquena, região onde ocorrem cavernas atualmente alagadas depois de uma fase vadosa, sugere que o isolamento das linhagens troglóbias de *Trichomycterus* esteja associado ao soerguimento relativo, resultante da subsidência da Bacia do Pantanal e responsável pela geomorfologia atual da região. É hipotetizado que o isolamento dos *Trichomycterus* no subterrâneo tenha ocorrido na segunda metade do Terciário, quando o soerguimento relativo do Planalto da Bodoquena foi acelerado.

Palavras-chave: genes, forma, sistemas cársticos, divergência genética, *Trichomycterus*.

ABSTRACT

Among troglobitic populations of *Trichomycterus* catfishes in Serra Bodoquena karst area, three lineages were identified using two independent and complementary methods, the analysis of nucleotide sequences of mitochondrial DNA and geometric morphometric. The genealogies obtained for COI, Cyt b and 16S were highly concordant and showed the same pattern of geographic distribution. The genetic divergence was not correlated with the geographic distance and was best explained by the presence of haplogroups. A high degree of population isolation was detected, with low intra-population genetic variation. The limited gene flow may be explained due to the partitioning of the habitat by the predominance of polygonal basins along the Bodoquena Plateau. In the Cave Morro do Jericó the syntopy of haplogroups I and II, with a high value of divergence in this locality, indicate the presence of a secondary contact zone between *T. dali* and *Trichomycterus* sp. 1. The presence of deep routes of groundwater flow in the South Sector of the Bodoquena Plateau, may explain the lower degree of genetic and morphological divergence between *T. dali* and *Trichomycterus* sp. 2. The comparisons of body shape indicates different degrees of specialization, possibly related to different environmental conditions among the karst in the region. Highly troglomorphic lineages occur in southern Serra Bodoquena, where the presence of currently flooded caves after a vadose phase, indicates that the isolation of ancient *Trichomycterus* lineages in subterranean habitats is associated with relative uplift of the region. This would be the result of the subsidence of the Pantanal Basin, that is the process responsible for the current geomorphology of the region. We estimated that the underground isolation occurred during the second half of the Tertiary, when the relative uplift of the Bodoquena Plateau was accelerated.

Key words: genes, shape, karst systems, genetic divergence, *Trichomycterus*

1. INTRODUÇÃO

A história de diversificação dos peixes de água doce está intimamente associada à evolução das bacias hidrográficas, pois os habitats aquáticos intracontinentais podem ser conectados, isolados ou fragmentados, segundo a dinâmica geográfica e/ou climática que atua na região (AVISE, 2000; RIBEIRO, 2006). No entanto, quando se trata de ecossistemas subterrâneos, os limites das drenagens superficiais podem não corresponder aos limites hidrológicos reais, pelo menos em escala regional (PALMER, 2007). Isto ocorre em relevos cársticos devido ao típico predomínio de escoamento subterrâneo em sistemas de aquífero de condutos (FORD & WILLIAM, 2007). Consequentemente, a distribuição dos organismos aquáticos e terrestres nestes ambientes geralmente está associada às conexões atuais ou históricas do aquífero que, por sua vez, também está sujeito aos processos que moldam a paisagem (KREJAC, 2005; PALANDAČIĆ, 2011; TRONTELJ, 2007).

Os troglóbios são espécies formadas por populações-fonte que habitam exclusivamente o meio hipógeo (*sensu* TRAJANO, 2012), geralmente apresentando modificações morfológicas, fisiológicas e comportamentais associadas ao modo de vida na ausência permanente de luz, denominadas troglomorfismos, dos quais os mais comuns são a redução, até ausência, das estruturas visuais, da pigmentação melânica, e o maior desenvolvimento de outras estruturas sensoriais (CHRISTIANSEN, 2012).

Em várias circunstâncias, o ambiente das cavernas oferece desafios aos estudos da sua fauna devido à distância, e dificuldade de acesso e permanência nesse tipo de ambiente, sobretudo quando esta envolve a utilização de técnicas específicas, como as técnicas verticais e o mergulho autônomo. Deste modo, a coleta de um número razoável de espécimes para o estudo taxonômico tradicional, por vezes, não é possível e pode despende um grande esforço, com muita visitas e investimento. Assim, o uso de ferramentas complementares é interessante para otimizar o uso dos espécimes coletados, minimizando o impacto sobre as frágeis populações e comunidades troglóbias por *coleta excessiva* (PROUDLOVE, 2001) e auxiliando a definição das unidades taxonômicas,

particularmente quando linhagens próximas apresentam ligeira disparidade morfológica, tipicamente observada em organismos subterrâneos.

Os ecossistemas subterrâneos, têm sido considerados laboratórios naturais para o estudo da ecologia e evolução por causa da relativa simplicidade de suas comunidades e do isolamento temporal e espacial de sua biota (Poulson & White 1969). Portanto, os troglóbios são bons modelos no estudo micro- e macroevolutivo e tem sido estudados de forma crescente na perspectiva filogeográfica (STRECKER, *et al.*, 2003; 2004; NIEMILLER *et al.*, 2008; 2012; JUAN *et al.*, 2010; COLLI *et al.*, 2009; CHIARI *et al.*, 2012). No Brasil, estudos sobre a fauna subterrânea nesta perspectiva encontram-se em desenvolvimento inicial.

A filogeografia objetiva compreender os processos históricos responsáveis pela distribuição geográfica contemporânea de indivíduos e populações a partir de uma genealogia, usualmente obtida pela análise de sequências de nucleotídeos (AVISE, 2000). A genética molecular, comumente usando marcadores mitocondriais, é uma ferramenta importante para se detectar a presença de populações isoladas, espécies crípticas e suas relações filogenéticas (AVISE, 2004).

O mtDNA é formado por 37 genes e 17.000 pares de bases, com regiões que apresentam diferentes taxas de mutação (AVISE, 2000). Análises de sequências de nucleotídeos com taxas de mutação lentas e rápidas mostram, com eficiência, relações filogenéticas quando os resultados são concordantes (exemplos em AVISE, 2004; AVISE, 2009). O gene mitocondrial codificador citocromo b (cit b) é considerado um excelente marcador usado em filogenias moleculares e filogeografia, por possuir regiões conservadas e variáveis, as quais podem conter sinais filogenéticos em diferentes níveis taxonômicos, principalmente em grupos mais inclusivos (ESPOSTI *et al.*, 1993; FARIAS *et al.*, 2001). O DNA *barcode* (o gene mitocondrial codificador citocromo oxidase I - COI) foi proposto por HEBERT *et al.* (2003) como um método para identificar espécies. Desde então, aproximadamente 2 milhões de exemplares, pertencentes a cerca de 172.000 espécies, incluindo mais de 9.000 peixes, foram catalogados com “código de barras” (ver www.boldsystems.org).

Com o objetivo de testar a eficiência do método para estimar a riqueza de espécies, PEREIRA *et al.* (2013) utilizaram o COI para identificar 254 espécies de peixes da bacia do Alto Rio Paraná, incluindo congêneres de diferentes ordens, famílias e gêneros, demonstrando a relevância do método, com a confirmação de mais de 99% dos táxons investigados.

No entanto, é importante ressaltar que o uso do DNA *barcode* é uma ferramenta e, como tal, deve ser usada em conjunto com outras, como a análise de um maior número de genes, incluindo nucleares quando possível, e o estudo da morfologia abrangendo o maior conjunto possível de caracteres, além de outras fontes de informação com sinal filogenético (por exemplo, fisiologia, comportamento, etc), dentro de um contexto comparativo. O uso de *barcode* não substitui o trabalho do taxonomista (para uma discussão sobre o assunto, ver por exemplo, CARVALHO & CRAIG, 2011).

O conhecimento de padrões filogeográficos, a história da espécie e a avaliação da ação de diferentes forças evolutivas, são bem suportados quando há comparação da variação de padrões geográficos obtidos a partir de marcadores de diferentes tipos (GARNIER *et al.*, 2005; WILEY, 2011; WILSON, 2013). Adquirir evidências destes processos a partir de múltiplos recursos, como através da integração do conjunto de dados genéticos, morfológicos e ecológicos, constitui uma abordagem interessante, que produz muita informação sobre a dinâmica da evolução das espécies (WILEY, 2011; WILSON, 2013). Somado ao fato da análise integrativa oferecer um contexto para se discutir o processo de especiação em determinados sistemas, é também, no caso de espécies raras e de baixas densidades demográficas, um suporte robusto para ações de manejo e conservação (PRIMACK & RODRIGUES, 2001; WILSON, 2013).

A morfologia dos troglóbios quando analisada de forma comparativa, pode trazer evidências a cerca de eventos vicariantes, dando uma idéia do tempo de isolamento no meio subterrâneo, se antigo ou recente (TRAJANO, 2007). Neste caso, as técnicas de morfometria geométrica oferecem um alto poder discriminatório, com análise forma do que outros métodos morfométricos mais tradicionais (TRAJANO *et al.*, 2006).

O uso mais amplo da morfometria geométrica é através da representação de cada espécime em uma posição relativa no espaço morfológico dos *landmarks* (ou marcos anatômicos), que podem ser colocados na posição correspondente em todos os espécimes incluídos na análise (KLINGENBERG, 2011). Um valor relativo à forma é extraído através do procedimento chamado *Procrustes superimposition*, que remove a variação em tamanho, posição e orientação dos dados das coordenadas dos *landmarks*, resultando na variação essencial da morfometria geométrica de um dado organismo ou estrutura (KLINGENBERG, 2011).

Como as características morfológicas de um organismo estão, em grande parte, sob controle poligênico, investigar a concordância entre a diferenciação morfológica e genética fornece uma boa avaliação do valor de divergência entre as diferentes entidades analisadas, incluindo gêneros, espécimes e populações (GARNIER, 2005; PUORTO *et al.*, 2001; WILEY, 2011, BOOKSTEIN, 1991; KLINGENBERG, 2011).

Os bagres da família Trichomycteridae (Siluriformes) estão entre os peixes que tiveram sucesso em habitar o meio subterrâneo na região Neotropical, com 11 espécies troglóbias conhecidas atualmente no Brasil (PROUDLOVE, 2010; TRAJANO & BICHUETTE, 2010; BICHUETTE & RIZZATO, 2012). A espécie nominal *Trichomycterus dali* RIZZATO, COSTA-JUNIOR, TRAJANO & BICHUETTE, 2011 é um bagre troglóbio altamente especializado e amplamente distribuído no carste da Serra da Bodoquena, no Mato Grosso do Sul. Conforme a descrição, essa espécie possui os maiores barbilhões nasais entre os seus congêneres e uma crista adiposa conspicua anterior e posterior à nadadeira dorsal, possivelmente um troglomorfismo que conferia à *T. dali* a capacidade de armazenar maior quantidade de energia na forma de gordura (RIZZATO *et al.*, 2011).

Novas populações de bagres troglomórficos do mesmo gênero, foram confirmadas em levantamentos e prospecções realizados entre abril de 2010 e outubro de 2012 (Capítulo 1). Estas populações, em um total de 11 localidades, estão distribuídas ao longo de mais de 100 km de

extensão do carste contínuo da Serra da Bodoquena, habitando cavernas desenvolvidas no nível freático superficial e no profundo, tendo sido observadas variações da forma corporal entre as populações que indicavam um possível isolamento entre elas, o que motivou o presente estudo.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi analisar as relações filogeográficas entre populações de bagres troglóbios do gênero *Trichomycterus* presentes ao longo do carste da Serra da Bodoquena, tendo como objetivos específicos:

- Identificar quantas possíveis unidades taxonômicas existem entre as populações conhecidas;
- Estudar a descontinuidade genética de três marcadores mitocondriais (citocromo *b*, citocromo oxidase I e 16S) entre amostras das populações de *Trichomycterus*;
- Verificar se a variação da forma corporal, analisada através da morfometria geométrica em vista dorsal e lateral, sugere o isolamento interpopulacional e interespecífico;
- Verificar se existe correlação entre a distância genética, o fluxo gênico e a variação da forma;
- Relacionar a distribuição e o isolamento geográfico das populações com processos atuais e históricos que podem ser responsáveis por modelar os padrões encontrados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

A espécie nominal *Trichomycterus dali* foi descrita a partir de exemplares provenientes de quatro cavernas da área cárstica da Serra da Bodoquena: Saracura (localidade-tipo), Morro do Jericó, Flor da Bodoquena e Buraco das Abelhas. Caracterizada por possuir os maiores barbilhões nasais do gênero, corpo totalmente despigmentado e uma dobra adiposa dorsal conspícua, anterior e posterior à nadadeira dorsal, *T. dali* é considerado um troglóbio altamente especializado.

Outras populações do mesmo gênero foram encontradas e/ou re-localizadas durante levantamentos realizados entre abril de 2010 e outubro de 2012, que ampliaram a distribuição de

populações troglóbias do gênero ao longo das cabeceiras cársticas do Rio Miranda e confirmaram a ocorrência destes bagres para 11 cavernas: Urubu Rei, Toca da Onça e Bebedouro, onde haviam registros anteriores, e as localidades novas, Mina do Velho, Califórnia, Sr. Valdemar e Mina da Sede (ver detalhes Capítulo 1). Algumas populações possuíam intensa variação no grau de pigmentação e certa variação na forma corporal, mais evidente pelos diferentes níveis de desenvolvimento da dobra adiposa dorsal.

3.2. Área de estudo

A Serra da Bodoquena é formada por um planalto (Planalto da Bodoquena) e por planícies, predominantemente de rochas carbonáticas do Grupo Corumbá, que se destacam na porção sudeste da Bacia do Pantanal (Figura 1) (SALLUN-FILHO & KARMANN, 2007). Esta área carbonática abriga um importante conjunto de cabeceiras em relevo carstificado, que drena para a Planície do Pantanal através das bacias dos rios Miranda e Apa.

Dois principais compartimentos geomorfológicos foram delimitados por SALLUN-FILHO & KARMANN (2007) no carste da Serra da Bodoquena. O Setor Norte (microbacia do Rio Salobra) possui sistemas fluviais dominantes, epicarste exposto, alto entalhamento das drenagens superficiais e sistemas de circulação cárstica suspensos, ou seja, acima do nível de base regional (no caso, o Rio Salobra), principalmente na região do Planalto da Bodoquena. O Setor Sul possui carste poligonal no Planalto da Bodoquena, amplas planícies cársticas apresentando agradação, aquífero de condutos bem desenvolvido, com rotas de fluxo profundas, sistema fluvial incipiente, com baixo entalhamento de vales e feições vadosas (espeleotemas) de cavernas atualmente abaixo do nível da água (NA). As cavernas localidades estudadas estão listadas na Tabela 1.

Figura 1 - Área de estudo: mapa de localização da área de estudo (imagem SRTM retirada de <http://www.relevobr.cnpemembrapa.br/download/ms/ms.htm>). O retângulo vermelho delimita a região da Serra da Bodoquena.

A evolução geomorfológica regional tem sido relacionada à reativação recente de um conjunto de falhas tectônicas associadas ao lineamento transbrasileiro, na Faixa Paraguai (ASSINE, 2004; CAMPANHA, *et al.* 2006; SALLUN-FILHO & KARMANN, 2007). A tectônica regional, em conjunto com variações climáticas do Quaternário, é apontada como uma das explicações para a presença de espeleotemas vadosos em cavernas atualmente abaixo do nível freático (SALLUN-FILHO, 2005).

Tabela 1 - Lista de localidades estudadas com as coordenadas geográficas (Datum WGS 84), altitude e a *profundidade máxima.

Localidade	Coordenadas	Altitude	Prof. Máx. *	Microhábitats
Urubu Rei	20° 29' 39 S 56° 51' 10 O	315m	~ 1 m	Freático superficial - Riacho em conduto vadoso, com fluxo lento, abastecido por ressurgência freática.
Mina do Velho	20 32' 37 S 56 50' 13 O	458m	> 0,5m	Freático superficial - Estavele (ressurgência com fluxo bidirecional, dependente do nível do lençol)
Saracura	20 53' 57 S 56 47' 41 O	521m	> 65m	Freático profundo - caverna subaquática em conduto vertical, com fluxo lento a médio.
Morro do Jericó	20 46' 19 S 56 44' 56 O	270m	1,5 m	Freático superficial - lago em nível de base.
Buraco das Abelhas	21° 29' 16 S 56° 43' 24 O	425m	> 60m	Freático profundo - Caverna subaquática, com fluxo lento à intenso.
Mina Faz. Flor da Bodoquena	20 47' 23 S 56 49' 41 O	567m	~ 0,5m	Freático superficial - Estavele
Bebedouro	20 48' 07 S 56 49' 09 O	531m	~ 20m	Freático profundo - Fenda vertical submersa aberta em superfície, com fluxo lento.
Califórnia	20 42' 08 S 56 50' 45 S	460m	~ 1m	Freático superficial - Lago em nível de base.
Flor da Bodoquena	20 45' 49 S 56 48' 07 O	535m	~ 1m	Freático superficial - zona de oscilação do lençol freático.
Valdemar	20 43' 38 S 56 48' 24 O	649m	~ 0,5m	Freático superficial - fenda estreita parcialmente submersa em contato com zona vadosa de caverna.

3.3. Coleta e preservação dos exemplares

As coletas foram realizadas entre abril de 2010 e outubro de 2012, utilizando-se redes de mãos e armadilhas do tipo covo, com isca. Os exemplares coletados foram eutanasiados por exposição letal a solução concentrada de anestésico (bensocaína). Uma amostra de tecido do fígado ou músculo foi retirada de exemplares recém-sacrificados e, para espécimes mantidos vivos, foi extraída uma pequena amostra de nadadeira. Os tecidos foram fixados em álcool 100% e mantidos congelados até o processamento para estudo genético.

Para a análise da morfometria, os espécimes foram fixados simetricamente com auxílio de alfinetes sobre um cuba de dissecação e imersos em solução de formol 4 % durante 24 horas, sendo posteriormente lavados e preservados em álcool 70 %.

A Tabela 2 traz o número total de amostras utilizadas para cada marcador mitocondrial e para cada um dos dois conjuntos de imagens (dorsal e lateral) para morfometria geométrica.

Tabela 2 - Lista de cavernas, siglas utilizadas e número de amostras utilizadas nas análises de cada marcador mitocondrial e para a *morfometria geométrica em vista dorsal e lateral, respectivamente.

Caverna	Sigla	16S	COI	CitB	*Morf. geo.
Urubu Rei	GUR	6	5	6	24 / 24
Mina do Velho	MV	10	11	10	20 / 20
Califórnia	GCF	4	4	4	5 / 5
Sr. Valdemar	GSV	15	15	14	16 / 15
Morro do Jericó	MJ	4	4	4	6 / 6
Flor da Bodoquena	GFB	10	10	10	13 / 13
Mina da Sede	MFB	10	10	10	17 / 14
Bebedouro	MRV	7	7	7	20 / 19
Saracura	GS	1	1	1	3 / 3
Buraco das Abelhas	AB	2	2	2	4 / 4
Lapa do Zu	LZ	-	-	-	8/7
Juruva	JU	-	-	-	9/8
Nº total de amostras		69	69	70	145 / 138

3.4. Genética molecular

3.4.1. *Primers* utilizados

A Tabela 3 traz a lista de *primers* utilizados para isolar e amplificar os fragmentos do DNA mitocondrial, citocromo b (cit b), citocromo oxidase I (COI) e 16S, e os utilizados para os marcadores nucleares, Prolactina e RAG2.

Tabela 3 - Lista de genes, *primers* e as respectivas referências originais.

Marcador	Primer	Referência
Cit b (mtDNA)	F= 5' ACCACCGTTGTTATTCAACTACAAGAAC 3' R = 5' CCGACTTCCGGATTACAAGACCG 3'	Sevilla et al. (2007)
COI (mtDNA)	F= 5' TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC 3' R= 5' TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA 3'	Ward et al. (2005)
16S (mtDNA)	F= 5' GCC TCG CCT GTT TAC CAA AAA C 3' R= 5' CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T 3'	Palumbi & Romano (1997)
Prolactina (nDNA)	F = 5' GAC AAR CTK CAC TCB CTC AGC A 3' R =: 5' TGN AGD GAG AGB GTG TGR CAC 3'	UFPA
Rag2 (nDNA)	F= 5' TGy TAT CTC CCA CCT CTG CGyTAC C 3' R= 5' CTk TTT GGk CAG AAG GGk TGG CC 3'	Hardman & Lundberg (2006)

3.4.2 Extração de DNA, amplificação das regiões genômicas e sequenciamento

O DNA total foi extraído utilizando-se o *kit* Dneasy (QIAGEN), de acordo com protocolo do fabricante. Para se verificar a qualidade e quantificar o material obtido, foram realizadas eletroforeses do DNA em gel de agarose (1%) corado com gel *red* e os resultados foram avaliados através da visualização do gel sob luz ultravioleta.

As PCRs foram realizadas para um volume total de 25 µl contendo 4 µl de DNTP (1,25mM), 2,5 µl de solução tampão (10X), 2 µl de MgCl₂ (25 Mm), 0,25 µl de cada iniciador (200 ng/µl), 1 a 1,5 µl de DNA genômico (100 ng/µl), 1U de Taq DNA Polimerase (5U/µl) e água

purificada para completar o volume final de reação. Os produtos da amplificação foram purificados com a enzima ExoSAP-IT (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., UK) de acordo com instruções fabricante e submetido ao sequenciamento pelo método di-desoxi terminal (SANGER *et al.*, 1977) com o kit Big Dye 3.1 (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante, com eletroforeses no ABI 3500 XL (Applied Biosystems).

Todas as etapas do processamento das amostras foram realizadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Instituto de Estudos Costeiros da Universidade Federal do Pará, em Bragança, coordenado pelo Prof. Dr. Janice Muriel-Cunha.

3.4.3. Análise dos dados

As sequências obtidas foram alinhadas nos programas Bioedit (HALL, 1999), DNAsp versão 5.10.01 (LIBRADO & ROZAS, 2009), criando-se bancos de dados no formato de entrada dos programas de análises genéticas. No programa jModeltest 3.06 (POSADA & CRANDALL, 1998) foram selecionados os modelos de evolução TPM2uf+g (TAMURA & NEI, 1993), TrN e K2p para, respectivamente, cit b, COI e 16S. Devido ao aspecto mais conservado do marcador 16S, este foi utilizado somente para a construção da rede de haplótipos.

Através do programa MEGA 5.0 (TAMURA *et al.*, 2007), foi calculada a média de divergência não corrigida (p) para cada população (exceto para a Gruta Saracura por estar representada por uma única amostra) e entre as populações. A árvore de máxima verossimilhança, gerada no PhyML também foi utilizada como modelo para a construção da rede de haplótipos com o programa Haploviewer (SALZBURGER *et al.*, 2011), a fim de se verificar a relação entre os haplótipos nas populações estudadas. Os haplótipos divergentes de cada população foram selecionados utilizando-se o programa DNAsp 5.10 (LIBRADO & ROSAS, 2009) e as análises populacionais foram realizadas através do programa Arlequin 3.5.1.2 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010).

A análise de variância molecular (AMOVA) foi executada para se verificar o particionamento da variação entre as populações. Avaliou-se a diferenciação genética entre os pares de populações utilizando-se o índice de Fixação (F_{ST}) (WRIGTH, 1978) e a significância dos valores gerados foi obtida através de 10000 permutações randômicas. O F_{ST} é um índice de endogamia de uma população que mede a razão entre a deriva genética e o fluxo gênico, a qual influência a estrutura populacional quando se consideram esses processos (TEMPLETON, 2011). Segundo BEEBEE & ROWE (2008), valores de F_{ST} abaixo de 0,2 indicam baixo fluxo gênico e ausência de estruturação populacional; valores próximos ou iguais a um indicam um isolamento populacional forte ou completo e valores intermediários a estes, indicam a presença de fluxo gênico entre as populações.

O teste de Mantel (MANTEL, 1967) foi realizado utilizando-se o programa Genetix 4.05 (BELKHIR *et. al*, 2004) para verificar se haveria associação significativa entre a distância genética e a distância geográfica entre as populações. A matriz com dados de distância genética foi baseada no índice F_{ST} e a distância geográfica foi obtida em quilômetros com auxílio do programa Google Earth (www.earth.google.com.br). Este teste foi realizado somente para *cit b* por ser o marcador mais variável entre as populações investigadas.

3.5. Morfometria geométrica

3.5.1. *Landmarks* utilizados

Preliminarmente, foi observado que a forma corporal variava entre as populações troglóbias de *Trichomycterus*, tanto em vista dorsal, quanto em vista lateral. Algumas populações apresentavam a dobra adiposa dorsal mais saliente, enquanto outras apresentavam esta crista dorsal reduzida, ou até ausente. Em vista dorsal, a variação em relação à posição da nadadeira dorsal foi a mais conspícua. Deste modo, os *landmarks* foram determinados de modo a quantificar tais variações.

Os *landmarks* são pontos anatômicos correspondentes entre as formas de interesse a serem analisadas (BOOKSTEIN, 1991; DRYDEN & MARDIA, 1998) e exprimem, em algum grau, correspondências biológicas (POLLY, 2008). Os *landmarks* podem ser classificados em três tipos (BOOKSTEIN, 1991): tipos I e II correspondem a homologias operacionais e são, respectivamente, o encontro entre três estruturas e as extremidades do corpo de um organismo (SMITH, 1990); os do tipo III são correspondências matemáticas, como curvas e contornos, traçados em referência a um *landmark* do tipo I ou II. Como os diferentes tipos de marcos anatômicos devem exprimir, em algum grau, correspondências biológicas (POLLY, 2008) e, portanto, os três tipos de *landmarks* foram considerados em conjunto nas análises em vista lateral, e somente os dos tipos I e II, na vista dorsal.

Foram selecionados 16 *landmarks* em vista dorsal e 45 *landmarks*, em vista lateral (Figura 2).

Figura 2 - *Landmarks* selecionados para análises morfogeométricas. Acima, em vista dorsal e, abaixo, em vista lateral. Os semi- *landmarks* construídos para capturar a variação da forma das dobras adiposas dorsais, em vista lateral, estão destacados em vermelhos.

Para se testar as variações interpopulacionais na forma foram consideradas inicialmente populações hipotéticas, formadas pelo conjunto de indivíduos de uma caverna. Posteriormente, as

cavernas estudadas foram agrupadas segundo os haplogrupos, determinados pela análise dos marcadores genéticos.

3.5.2. Coleta de dados

Para obtenção das imagens, cada indivíduo foi fixado evitando distorções, e simetricamente alinhado com o auxílio de alfinetes entomológicos em uma cuba de dissecação. As imagens foram tomadas ao lado de uma escala, em vista dorsal e lateral esquerda, com resolução padronizada de 5184 x 3456 pixels, utilizando-se uma câmera Canon T3i, sobre tripé, acoplada a lente macro de 50 mm. Um nível foi utilizado para ajustar o posicionamento da câmera, com a lente em plano paralelo ao do espécime antes da obtenção das imagens. Foram tomadas um total de 251 imagens, sendo 128 em vista dorsal e 123 em vista lateral (Tabela 2).

Um arquivo TPS para cada conjunto de imagens foi construído utilizando-se o programa TPSutil e a digitalização foi feita através do programa TPSDig2 (versão 2.17), ambos disponíveis no site <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>.

3.5.3. Análise de dados

Na ausência de um congênere epígeo na Serra da Bodoquena (ver Capítulo 1), foram utilizados, como grupo externo, espécimes de populações troglófilas de *Trichomycterus brasiliensis* da Lapa do Zu e da Gruta da Juruva, ambas da Bacia do São Francisco, Minas Gerais.

As coordenadas dos *landmarks* foram alinhadas pelo método “General Procrustes Alignment” (GPA). Foi realizada a análise de variáveis canônicas para ambos os conjuntos de imagens (dorsal e lateral), a partir das coordenadas alinhadas, para verificar-se a diferença na forma entre as populações e entre os haplogrupos mais o grupo externo. Nesta última, não foram considerados os *landmarks* que descrevem a superfície da crista adiposa dorsal anterior (*landmarks* 24 a 36) e posterior (*landmarks* 38 a 45), para a comparação em vista lateral.

Para ilustrar as principais diferenças na forma média, par a par, entre os haplogrupos e entre *T. brasiliensis* e cada haplogrupo, foram confeccionados *wireframes* da forma média sobrepostos.

Todas as análises de morfometria geométrica foram feitas através do programa MorphoJ versão 1.05f (KLINGENBERG 2011), disponível no site <http://www.flywings.org.uk>.

Para se testar a correlação entre a variação da forma e a variação genética nas populações troglóbias de *Trichmoycterus*, foi realizado o teste de Mantel utilizando-se o programa Genetix 4.05. Para isso, foi utilizado como medida de variação da forma a distância de Procrustes da forma média entre as cavernas e, para variação genética, os valores do índice F_{ST} e a divergência genética não corrigida (p), ambos para *cit b* e COI. Esta análise foi feita separadamente para marcador e para cada índice molecular, considerando-se cada caverna amostrada para a população hipotética.

4. RESULTADOS

4.1. Análises dos genes mitocondriais *cit b*, COI e 16S

As sequências obtidas para Prolactina não demonstraram variações, sendo este um marcador nuclear muito conservado no grupo estudado. Para RAG2, as sequências não foram amplificadas com sucesso. Assim, foram utilizados, nas análises, os três marcadores mitocondriais, os quais apresentam diferentes taxas de mutação, sendo *cit b* o mais variável, COI, de variação intermediária e, 16S, o mais conservado (AVISE, 2004).

Foram analisados, para os marcadores *cit B*, COI e 16S, respectivamente, 698, 624 e 548 pares de bases, tendo sido observados 51, 43 e 16 sítios polimórficos distribuídos entre 11, oito e seis haplótipos. De modo geral, a divergência p não corrigida dentro de cada população amostrada foi baixa ou nula, com exceção de GSV e MJ (Tabela 4).

O número de haplótipos e a diversidade nucleotídica e haplotípica dentro de cada população constam da Tabela 5. Os maiores valores foram observados novamente para MJ.

Tabela 4 - Valores médios da divergência p não corrigida e o desvio padrão para cada população. *Gruta Saracura foi excluída por estar representada por uma única amostra.

Caverna*	Cit b		COI		16S	
	p	Dp	p	Dp	p	Dp
GUR	0,00000	0,00000	0,00064	0,00066	0,00000	0,00000
MV	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
GCF	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
GSV	0,00241	0,00122	0,00083	0,00080	0,00094	0,00095
MJ	0,02873	0,00466	0,02880	0,00528	0,01215	0,00322
GFB	0,00080	0,00075	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
MFB	0,00077	0,00072	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
MRV	0,00082	0,00056	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
AB	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Geral	0,02966	0,00464	0,02863	0,00511	0,01290	0,00339

A rede de haplótipos mostrou concordância genealógica entre os marcadores estudados (Figura 3). O primeiro e o segundo haplogrupos são formados pelas populações que se distribuem nas cabeceiras do Rio Salobra (MV, GSV, GFC, GUR, MJ, GFB, MFB e MRV), segundo um gradiente norte-sul, com o grupo I (formado por MV, GSV, GFC, GUR e MJ1) distribuído mais ao norte, e o grupo II (formado por MJ2, GFB, MFB, MRV), ao sul (Figura 3).

Muitos *gaps* genéticos (descontinuidades) distinguiram duas linhagens alopátricas (grupo I e grupo III) e duas linhagens que ocorrem em sintopia na caverna MJ (grupo I e grupo II). Os grupos II e III parecem ser mais proximamente relacionados, de acordo com esta análise.

Tabela 5 - Estatística de cada marcador do DNA mitocondrial para as populações locais. Siglas: N, número de haplótipos; h, diversidade haplotípica; π , diversidade nucleotídica. *Por ser mais conservado, para o marcador 16S é mostrado apenas o número de haplótipos dentro de cada população.

Localidades	Marcador	N	h $\pm$ dp	$\pi \pm$ dp
GUR	Cit b	1	0.0000 $\pm$ 0.0000	0.00000 $\pm$ 0.00000
MV		1	0.0000 $\pm$ 0.0000	0.00000 $\pm$ 0.00000
GCF		1	0.0000 $\pm$ 0.0000	0.00000 $\pm$ 0.00000
GSV		3	0.5619 $\pm$ 0.0954	0.00240 $\pm$ 0.00167
MJ		2	0.5000 $\pm$ 0.2652	0.02722 $\pm$ 0.01837
GFB		2	0.5556 $\pm$ 0.0745	0.00080 $\pm$ 0.00080
MFB		2	0.5333 $\pm$ 0.0947	0.00077 $\pm$ 0.00078
MRV		3	0.5238 $\pm$ 0.2086	0.00082 $\pm$ 0.00086
GS		1	0.0000 $\pm$ 0.0000	0.00000 $\pm$ 0.00000
AB		1	0.0000 $\pm$ 0.0000	0.00000 $\pm$ 0.00000
GUR	COI	2	0.4000 $\pm$ 0.2373	0.00064 $\pm$ 0.00081
MV		1	0.0000 $\pm$ 0.0000	0.00000 $\pm$ 0.00000
GCF		1	0.0000 $\pm$ 0.0000	0.00000 $\pm$ 0.00000
GSV		2	0.5143 $\pm$ 0.0690	0.00084 $\pm$ 0.00082
MJ		2	0.5000 $\pm$ 0.2652	0.02724 $\pm$ 0.01845
GFB		1	0.0000 $\pm$ 0.0000	0.00000 $\pm$ 0.00000
MFB		1	0.0000 $\pm$ 0.0000	0.00000 $\pm$ 0.00000
MRV		1	0.0000 $\pm$ 0.0000	0.00000 $\pm$ 0.00000
GS		1	0.0000 $\pm$ 0.0000	0.00000 $\pm$ 0.00000
AB		1	0.0000 $\pm$ 0.0000	0.00000 $\pm$ 0.00000
GUR	16S	1	—	—
MV		1	—	—
GCF		1	—	—
GSV		2	—	—
MJ		2	—	—
GFB		1	—	—
MFB		1	—	—
MRV		1	—	—
GS		1	—	—
AB		1	—	—

A variância total das sequências nucleotídicas de cit b e COI foi significativa entre os grupos de populações ($F/\Phi_{CT} = 0,939$ e $P < 0,01$). Mesmo quando MJ foi considerado um único grupo, a variância dos dados foi similar. A fonte de variação genética não foi significativa entre as populações dentro dos grupos e dentro das populações (Tabela 6).

Os valores de *Fst* obtidos para cit b e COI indicam um alto grau de isolamento entre as populações (Tabela 7). A análise da distância *p* não corrigida indica que duas linhagens muito divergentes ocorrem em sintopia em MJ, com valor de divergência de até 5,4% entre os indivíduos desta localidade (Figura 4). A Tabela 8 traz os valores da distância *p* de cit b e COI entre os pares de populações.

Assim, considerando-se esses resultados, o teste de Mantel foi realizado somente para o marcador mais variável (cit b) e mostrou que a distância genética entre as populações subterrâneas amostradas de *T. dali* não é explicada pela a distância geográfica ($r = 0.186$ e $p > 0,05$). Isto é explicado pela alta divergência genética entre os haplogrupos I e II, que são mais próximos geograficamente entre si, do que em relação ao haplogrupo III (Figura 4).

Figura 3 – Genealogia dos haplótipos baseada na árvore de máxima verossimilhança (ML) para os três marcadores mitocondriais e, abaixo, a distribuição geográfica dos haplogrupos em seção norte-sul da Serra da Bodoquena (ilustração modificada de Sallun Filho 2005). Cada círculo na rede de haplótipos representa sua frequência, proporcional ao tamanho dos círculos; os pontos azuis entre os haplótipos representam amostras não inferidas ou haplótipos extintos; o asterisco indica a localidade do tipo de *T. dali*.

Tabela 6 - Resultados da AMOVA para os haplótipos com os marcadores CitB e COI. Os valores apresentados correspondem, respectivamente, às cada uma das duas sequências, respectivamente.

Fonte de Variação	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação	F/Φ -estatístico	P
Todas as populações				
Entre Grupos (grupo I – MV, GSV, GFC, GUR; grupo II – MJ, GFB, MFB, MRV; grupo III - AB)	14,03 / 16,43	93,05 / 93,67	$F/\Phi_{CT} = 0,93054$ / 0,93672	0,00129 / 0,00079
Entre Populações Dentro dos Grupos	0,54056 / 0,32970	3,59 / 1,88	$F/\Phi_{SC} = 0,51613$ / 0,29690	0,02950 / 0,03149
Dentro das Populações	0,50678 / 0,78079	5,05 / 4,45	$F/\Phi_{ST} = 0,96639$ / 0,95551	0,0000 / 0,00079

Tabela 7 - Índice de Fixação (*Fst*) entre os pares de populações de *Trichomycterus* para Cit B (diagonal superior), e COI, (diagonal inferior). *Valores significativos de *Fst* para $p > 0,05$.

	GUR	MV	GCF	GSV	MJ	GFB	MFB	MRV	AB
GUR		1,00000*	1,00000*	0,52044*	0,74106*	0,99049*	0,99085*	0,99164*	1,00000*
MV	0,93423*		0,00000	0,29412*	0,82113*	0,99279*	0,99306*	0,99409*	1,00000*
GCF	0,87421*	1,00000*		0,16151	0,66071	0,98861*	0,98904*	0,98952*	1,00000
GSV	0,65661*	0,81667*	0,17995		0,81175*	0,96732*	0,96746*	0,96436*	0,96050*
MJ	0,69440*	0,82470*	0,66000	0,83749*		0,30062*	0,29295*	0,19214*	0,35319
GFB	0,99612*	1,00000*	1,00000*	0,99011*	0,44308*		-0,08889	0,12426	0,96324*
MFB	0,99612*	1,00000*	1,00000*	0,99011*	0,44308*	0,00000		0,03504	0,96443*
MRV	0,99496*	1,00000*	1,00000*	0,98864*	0,34705*	0,00000	0,00000		0,96337*
AB	0,98995*	1,00000*	1,00000	0,98486*	0,34928	1,00000*	1,00000*	1,00000*	

Tabela 8 - Distância *p* entre os pares de populações de *Trichomycterus* para Cit B (diagonal superior), e COI, (diagonal inferior). Todos os valores acima de 0,02 estão destacados em negrito.

	GUR	MV	GCF	GSV	MJ	GFB	MFB	MRV	GS	AB
GUR		0,001	0,001	0,003	0,044	0,056	0,056	0,056	0,057	0,059
MV	0,003		0,000	0,002	0,042	0,055	0,055	0,055	0,056	0,057
GCF	0,003	0,003		0,002	0,042	0,055	0,055	0,055	0,056	0,057
GSV	0,002	0,003	0,001		0,044	0,057	0,057	0,057	0,058	0,059
MJ	0,043	0,043	0,042	0,042		0,016	0,016	0,015	0,016	0,030
GFB	0,054	0,054	0,054	0,053	0,018		0,001	0,001	0,002	0,020
MFB	0,054	0,054	0,054	0,053	0,018	0,000		0,001	0,002	0,019
MRV	0,054	0,054	0,054	0,053	0,018	0,000	0,000		0,002	0,019
GS	0,054	0,054	0,054	0,053	0,018	0,000	0,000	0,000		0,020
AB	0,054	0,054	0,054	0,053	0,030	0,023	0,023	0,023	0,023

Figura 4 - Mapa da distribuição das rochas carbonáticas da Serra da Bodoquena e a direção da hidrografia, com a as localidades amostradas e a indicação dos haplogrupos com cores equivalentes à figura 3.

4.2. Morfometria geométrica

As Figuras 5 e 6 trazem o resultado da análise de variáveis canônicas para as diferenças entre os haplogrupos e *T. brasiliensis*, em vista dorsal e lateral, respectivamente. Para esta análise, a diferença foi significativa para ambos os conjuntos de imagens (Tabelas 9).

Tabela 9 - Distância da Mahalanobis (diagonal inferior) e os valores de significância(diagonal superior) para 1000 permutações para identificar a diferença na forma entre os haplogros I, II, III e *T. brasiliensis* em vista dorsal e lateral.

DORSAL	<i>T. brasiliensis</i>	I	II	III
<i>T. brasiliensis</i>		<0,0001	<0,0001	<0,0001
I	3,755		<0,0001	<0,0001
II	4,746	2,8913		0,0001
III	5,2386	4,7985	3,6021	
LATERAL				
<i>T. brasiliensis</i>		<.0001	<.0001	<.0001
I	11,8667		<.0001	<.0001
II	12,9312	4,5073		<.0001
III	13,8678	7,1478	5,5099	

Entre as populações, o agrupamento pela análise de variáveis canônicas em vista dorsal e lateral são mostrados nas Figuras 7 e 8, respectivamente. As Tabelas 10 e 11 traz os resultados desta análise, em ambos conjuntos de imagens.

Os *wireframes* são mostrados nas Figuras 9 e 10 para as diferenças da forma entre os haplogrupos em vista dorsal e lateral, respectivamente. A diferença da forma entre os troglóbios e o grupo externo *T. brasiliensis* são mostrados nas figuras 11 e 12.

Tabela 10 - Distância da Mahalanobis (diagonal inferior) e os valores de significância(diagonal superior) para 1000 permutações para identificar a diferença na forma entre as populações em vista dorsal.

	AB	GFB	GCF	GS	GSV	MFB	MJ	MRV	MV	TO	UR
AB		0,0001	0,0064	0,0627	0,0003	<0,0001	0,0539	0,0001	<0,0001	0,0812	<0,0001
GFB	5,2374		0,0007	0,0735	<0,0001	0,0085	0,2323	0,0369	<0,0001	0,1795	<0,0001
GCF	7,5186	3,6333		0,0089	0,0016	<0,0001	0,0138	<0,0001	<0,0001	0,2476	<0,0001
GS	4,5153	3,5574	6,1247		0,0001	0,0016	0,0724	0,036	<0,0001	<,0001	<0,0001
GSV	7,5745	3,4808	2,8795	5,3976		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0559	<0,0001
MFB	5,6517	1,8872	4,5456	3,5038	3,7465		0,0002	0,0054	<0,0001	0,0516	<0,0001
MJ	4,0428	2,3992	4,054	4,1134	4,9213	3,578		0,0063	<0,0001	0,5065	<0,0001
MRV	4,7199	1,7301	4,2692	2,8321	4,0124	1,6059	2,5783		<0,0001	0,0326	<0,0001
MV	6,5953	4,1055	4,0465	5,8182	2,8754	4,1843	4,7355	4,1813		0,0263	<0,0001
TO	6,3054	4,4351	5,9205	6,3377	6,3276	5,3388	4,8096	5,245	7,168		0,2969
UR	4,929	3,4785	4,3945	5,5007	4,529	4,3675	3,428	3,9522	3,9571	4,4872	

Tabela 11 - Distância da Mahalanobis (diagonal inferior) e os valores de significância(diagonal superior) para 1000 permutações para identificar a diferença na forma entre as populações em vista lateral.

	AB	GCF	GFB	GS	GSV	MFB	MJ	MRV	MV	TO	UR
AB		0,0056	0,0007	0,0025	0,0001	0,0001	0,0026	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001
GCF	19,4912		<0,0001	0,0025	<0,0001	<0,0001	0,0013	<0,0001	<0,0001	0,1589	<0,0001
GFB	19,2566	16,4605		0,0003	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0042	<0,0001
GS	20,3141	22,9948	19,1659		0,0003	<0,0001	0,0035	0,0001	0,0004	0,0847	<0,0001
GSV	15,8206	13,2931	13,7589	18,8948		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0641	<0,0001
MFB	16,7354	16,7263	13,7699	18,7063	11,9372		<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0103	<0,0001
MJ	18,9045	14,7297	14,0685	19,9295	13,3539	13,9563		<0,0001	<0,0001	0,0746	<0,0001
MRV	14,6096	14,6923	11,4758	18,9973	10,7327	10,046	13,913		<0,0001	0,0454	<0,0001
MV	17,9593	13,5432	15,0278	20,4773	10,6148	12,4317	14,6803	12,0899		0,0161	<0,0001
TO	25,5006	26,8905	26,2291	27,1514	23,8846	24,0728	23,0017	21,9514	25,8124		0,0274
UR	15,8907	12,8296	14,0166	19,4713	9,004	11,9205	11,9023	12,9051	12,2886	23,0831

Figura 5 - Distribuição das amostras dos haplogrupos e de *Trichomycterus brasiliensis* ao longo dos dois primeiros eixos canônicos da análise de variáveis canônicas baseado nas deformações parciais em vista dorsal.

Figura 6 - Distribuição das amostras dos haplogrupos e de *Trichomycterus brasiliensis* ao longo dos dois primeiros eixos canônicos da análise de variáveis canônicas baseado nas deformações parciais em vista lateral.

Figura 7 - Distribuição das amostras entre as populações de *Trichomycterus* spp. ao longo dos dois primeiros eixos canônicos da análise de variáveis canônicas baseado nas deformações parciais em vista dorsal.

Figura 8 - Distribuição das amostras entre as populações de *Trichomycterus* spp. ao longo dos dois primeiros eixos canônicos da análise de variáveis canônicas baseado nas deformações parciais em vista lateral.

Figura 9 - Variação da forma média em vista dorsal entre os três haplogrupos. O primeiro grupo entre os pares combinados, indicado à esquerda, está representado pelos *wireframes* em cinza e, o segundo, em preto.

Figura 10 - Variação da forma média em vista dorsal entre os três haplogrupos e *T. brasiliensis*. O primeiro grupo entre os pares combinados, indicado à esquerda, está representado pelos wireframes em cinza e, o segundo, em preto.

Figura 11 - Variação da forma média vista lateral entre os três haplogrupos. O primeiro grupo entre os pares combinados, indicado à esquerda, está representado pelos *wireframes* em cinza e, o segundo, em preto.

Figura 12 - Variação da forma média em vista lateral entre os três haplogrupos e *T. brasiliensis*. O primeiro grupo entre os pares combinados, indicado à esquerda, está representado pelos *wireframes* em cinza e, o segundo, em preto.

4.3. Correlação entre genes e forma

O teste de Mantel mostrou que a variação da forma em vista dorsal foi significativa tanto para o grau de isolamento (*Fst*), quanto para a divergência genética interpopulacional. Em vista lateral, os resultados sugerem que a forma não é correlacionada ao isolamento genético, indicando que a distribuição dos *landmarks* é mais plástica para este conjunto de imagem (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores de r (coeficiente de Pearson) e de significância ($p < 0,05$) de correlação das matrizes de distância de Procrustes *versus* índice de *Fst* e divergência genética obtidos no teste de Mantel.

		Cit b		COI	
Fst	Lateral	r=0,309	p=0,094	r=0,313	p=0,067
	Dorsal	r=0,655	p < 0,001	r=0,701	p < 0,001
Divergência	Lateral	r=0,588	p=0,020	r=0,563	p=0,023
	Dorsal	r=0,738	p=0,002	r=0,749	p=0,002

4.4. Considerações taxonômicas

Dado que os resultados apresentados confirmam a presença de três linhagens subterrâneas divergentes geneticamente e significativamente distintas na análise da forma, buscou-se levantar caracteres taxonômicos que pudessem diagnosticar as três linhagens morfologicamente em espécies distintas. Conforme à concordância observada entre os genes estudados, cada haplogrupo passa a ser chamado neste trabalho de: I - *Trichomycterus* sp. 1; II - *Trichomycterus dali*; III - *Trichomycterus* sp. 2. A descrição formal das espécies está em andamento, assim, são apresentadas sucintamente as seguintes considerações taxonômicas (Tabela 13).

Trichomycterus dali RIZZATO *et al.* 2011 é diagnosticado por um caráter único no gênero, a presença de dobras adiposas conspícuas, em forma de crista, passando por toda a região dorsal do corpo e, também, pela ausência dos olhos, não visíveis externamente, e da pigmentação cutânea, barbilhões muito longos, especialmente o nasal e o maxilar, contagem de raios da nadadeira peitoral atingindo I, 9 e uma fontanela cranial única com uma constrição conspícua no ponto de encontro do

supraoccipital e dos dois ossos frontais. Esta espécie corresponderia as populações das grutas Saracura, Bebedouro, Mina da Sede, Flor da Bodoquena e Morro do Jericó.

Trichomycterus sp. 1, corresponde à populações das grutas do Urubu Rei, Mina do Velho, Sr. Valdemar, Califórnia e Toca da Onça. Diferencia-se de *T. dali* e de *Trichomycterus* sp. 2 pela presença da fontanela craniana reduzida ao parieto-supraoccipital, pela posição mais posterior da nadadeira dorsal e formato do corpo cilíndrico nos adultos.

Trichomycterus sp. 2 diferencia-se de *Trichomycterus* sp. 1 e *T. dali* pelo formato pela forma da fontanela cranial mais alongada, pelo maior número odontódeos interoperculares e pela ausência de pigmentação melânicas.

Tabela 13 - Síntese das considerações taxonômicas sobre *Trichomycterus dali* Rizzato *et al.* 2011, realizadas com base nos resultados deste trabalho.

Espécime	Dados de localidade e coleta	Considerações Taxônomicas
MZUSP 106630, Holótipo	Brasil, Mato Grosso do Sul, Bonito, gruta Saracura (21° 29' 14.6"S 56° 43' 22.7"O). 15 Jan 2006, 1 ind., CP=78,9 mm, em álcool.	<i>status</i> mantido
MZUSP 106631, Parátipo	Jardim, Buraco das Abelhas, (21°29'18.24"S 56°43'28.6"O), 18 Abr 1998, 1 ind., 62,4 mm, diafanizado	Deve ser retirado de <i>Trichomycterus dali</i> e realocado em uma nova espécie (<i>Trichomycterus</i> sp.2)
MZUSP 106632, Parátipo	Jardim, Buraco das Abelhas, 18 Abr 1998, 1 ind., CP=49 mm, em álcool.	Deve ser retirado de <i>Trichomycterus dali</i> e realocado em uma nova espécie
MZUSP 81056, Parátipo	Jardim, Buraco das Abelhas, 19 Abr 1998, 1 ind., CP=100,8 mm, em álcool.	Deve ser retirado de <i>Trichomycterus dali</i> e realocado em uma nova espécie (<i>Trichomycterus</i> sp.2)
MZUSP 106633, Parátipo	Bodoquena, Morro do Jericó (20°46'21.51"S 56°44'58.73"O), 01 Jul 2008, 1 ind., CP=47,4 mm. em álcool.	Localidade de sintopia, necessário exame cuidadoso para assinalar a espécie correta.
MZUSP 106634, Parátipo	Bodoquena, Morro do Jericó, 01 Jul 2008, 1 ind., CP=21,6, em álcool.	Localidade de sintopia, necessário exame cuidadoso para assinalar a espécie correta.
MZUSP 106635, Parátipo	Bonito, Saracura, 09 Jul 2006, 1 ind., CP=48,2 mm., em álcool.	<i>status</i> mantido
MZUSP 109770, Parátipo	Jardim, Buraco das Abelhas, sem data, 1 ind., CP=72,5 mm, diafanizado.	Deve ser retirado de <i>Trichomycterus dali</i> e realocado em uma nova espécie (<i>Trichomycterus</i> sp.2)

5. DISCUSSÃO

A determinação de espécies troglóbias pode ser particularmente difícil devido à frequente presença de homoplasias associadas às pressões seletivas do ambiente subterrâneo, denominados troglomorfismos (*sensu* CHRISTIENSEN, 2012). No presente estudo, foi confirmada a presença de três espécies troglóbias de *Trichomycterus* distribuídas no carste da Serra da Bodoquena. Os dados levantados reafirmam a importância desta área região como uma área de alta diversidade da fauna subterrânea Neotropical.

Com a ascendente utilização do DNA *barcode*, PEREIRA *et al.* (2013) testou o valor de eurístico de divergência igual ou superior à 2%, amplamente utilizados como referência para considerar espécies congêneres distintas, e mostrou que o método foi eficiente quando aplicado à diversos grupos de peixes Neotropicais. Os valores de divergência genética para COI corroboram a presença de três espécies.

Os dados genéticos e as análises de morfometria geométrica identificaram a presença de três linhagens claramente divergentes entre as populações troglóbias de *Trichomycterus* no carste da Serra da Bodoquena. Os valores de *Fst* revelavam que o fluxo gênico entre as populações é baixo, ou quase ausente, com padrões concordantes nos três marcadores analisados. REIS *et al.* (2006) conseguiram distinguir, com base na análise da forma corpórea, quatro populações de *Ancistrus cryptophthalmus*, sugerindo a diferenciação independente das populações. As análises de variação da forma para as populações estudadas, tanto em vista lateral quanto em vista dorsal, evidenciaram um padrão concordante com as análises dos marcadores genéticos mitocondriais.

No que concerne à diversificada ictiofauna neotropical, estudos têm mostrado que a distribuição de algumas espécies de cabeceiras foi moldada, em parte, pela atuação de tectônica recente e sucessivas transgressões marinhas ocorridas apartir do Cretáceo Superior (ALBERT & REIS, 2011; LIMA & RIBEIRO, 2011; RIBEIRO, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2013). Pela sua proximidade com o Pantanal e por representar uma de suas bordas elevadas, diversos autores já

chamaram a atenção para a existência de movimentações tectônicas recentes na Serra da Bodoquena (ALMEIDA, 1965; ASSINE, 2004; SALLUN-FILHO, 2004).

Na Serra da Bodoquena, um mosaico de caracteres morfológicos é observado entre diferentes espécies de peixes e invertebrados subterrâneos. No caso dos bagres, as populações distribuídas ao sul apresentam perda total dos olhos e da pigmentação melânica enquanto que, na porção média do planalto, ocorrem populações com pigmentação melânica variável (*Trichomycterus* sp. 1 e *T. dali*, respectivamente). *Ancistrus formoso* SABINO & TRAJANO, 1997 ocorre, também, na porção média do planalto, apresentando olhos reduzidos e ausência de pigmentação melânica. *Rhamdia* sp. e *Ancistrus* sp., que ocorrem sintopicamente na porção norte da mesma área cárstica, apresentam mosaicos morfológicos, com indivíduos portando diferentes tamanhos de olhos e graus de pigmentação (CORDEIRO *et al.* 2013). Este padrão sugere hipoteticamente que *T. dali* e *A. formoso* sejam os troglóbios mais antigos e que *Rhamdia* sp. e *Ancistrus* sp. sejam os mais recentes, isolados ao norte posteriormente.

A alta descontinuidade populacional e os padrões filogeográficos encontrados sugere uma associação do isolamento populacional com os padrões hidrológicos dos compartimentos geomorfológicos identificados por SALLUN-FILHO (2005).

Segundo SALLUN-FILHO (2005), a principal evidência geomorfológica da existência de tectônica recente na Serra da Bodoquena é a presença da superfície de calcários do Planalto da Bodoquena soerguida em relação ao embasamento granito-gnáissico a oeste e aos dolomitos a leste, em parte demarcada por escarpas de erosão remontante. O setor norte (Área Rio Salobra) possui feições fluviais mais marcantes em relação às cársticas e com rios entalhados (*canyons*), enquanto o setor sul tem feições cársticas mais frequentes e poucas feições fluviais, compondo duas bacias hidrográficas distintas. Esta morfologia distinta é atribuída a gradientes hidráulicos maiores no setor norte e menores no setor sul. Visto que são formadas pela mesma rocha (calcário), com estruturas similares, o setor norte é mais entalhado devido a um maior soerguimento tectônico relativo, pois o bloco em subsidência, neste caso, é o próprio Pantanal.

Um exemplo deste entalhamento acentuado do setor norte é a Gruta Urubu Rei, localizada na vertente sul do Córrego Serra, que é uma nascente cárstica perene do tipo vaclusiana suspensa à cerca de 150 m acima do nível do rio. Através de um perfil norte-sul da Serra da Bodoquena, os índices de razão fundo/altura de vale (KELLER & PINTER, 1996) e gradiente hidráulico foram calculados para os rios Perdido e Salobra, evidenciando um maior entalhamento e um maior gradiente hidráulico na porção norte. O Rio Salobra apresenta-se entalhado e com alto gradiente no seu alto médio curso, até atingir o nível de base regional no seu baixo curso, onde se torna um rio amplo e de baixo gradiente, formando uma planície aluvial (SALLUN-FILHO, 2005). Neste ponto, os afluentes do Rio Salobra atingem o seu maior grau de entalhamento, como o Córrego Serra.

Especiação simpátrica é um evento relativamente rara na natureza (BARRACLOUGH & VOGLER, 2000), portanto é mais que a ocorrência simpátrica detectada na Gruta Morro do Jericó atual seja resultado de um contato secundário após um período de isolamento entre as linhagens.

O processo de desenvolvimento de uma única espécie pode ser descrito como heterocrônico em relação ao mesmo processo na outra espécie, considerado o estado basal ou ancestral, que opera com diferentes aparecimentos e/ou os tempos de compensação e/ou a velocidades diferentes (GOULD, 1977). Se a taxa de crescimento é aumentado e o tempo entre o início e fim do desenvolvimento é diminuída proporcionalmente, ambas espécies comparadas podem acabar com o mesmo tamanho. As espécies com exposições mais rápidas de aceleração do crescimento são pedomórficas, e as espécies com exposições mais lentas no desenvolvimento exibem neotenia.

A neotenia (manutenção de caracteres juvenis em adultos pelo retardamento do desenvolvimento somático) é um troglomorismo recorrente, principalmente em urodelos, como no caso clássico e melhor estudado da salamandra cavernícola, *Proteus anguinus* (CULVER *et al.*, 1982; GOULD, 1977). Neotenia explicaria, também, a manutenção da crista adiposa em *T. dali* (sensu Rizzato *et al.* 2011). Interpreta-se que esse tipo de mudança no desenvolvimento somático como uma adaptação relacionada principalmente à retenção de energia do dispendioso processo de metamorfose em um ambiente extremo marcado pela escassez alimentar (HUPPOP, 2005;

CULVER, 1982). A longevidade, geralmente maior dos troglóbios do que de seus ancestrais epígeos, e a menor competição interespecífica no ambiente subterrâneo também poderiam resultar na seleção de formas neotênicas através de pequenas mudanças nos genes do desenvolvimento, gerando modificações na habilidade de encontrar alimento (HUPPOP, 2005; CULVER, 1982; HOWARTH & HOCH, 2005).

6. CONCLUSÕES

- Os resultados das análises baseadas em morfometria geométrica e sequencias de DNAm foram concordantes.
- Foram identificados três linhagens divergentes de bagres troglóbios do gênero *Trichomycterus* na área cárstica da Serra da Bodoquena, correspondendo à espécies distintas.
- A espécie *T. dali* deve ser redescrita, de modo a excluir a população do Buraco das Abelhas e incluir as populações da Gruta do Bebedouro e da Mina da Sede.
- A distância geográfica não explica a distância genética e a variação na forma, indicando que eventos históricos, e não a dispersão, sejam responsáveis pela divergência entre os haplogrupos ,possivelmente associada à neotectonica recente que atua na região.
- Este trabalho apresenta uma contribuição do sentido de avaliar o poder discriminatório de duas diferentes metodologias para identificar o isolamento entre populações de peixes troglóbios
- *Trichomycterus* sp. 1 constitui a linhagem mais divergente de *T. dali* + *Trichomycterus* sp. 2.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, J. S.; REIS, R. E. 2011. Introduction to Neotropical Freshwaters. In: Albert, J. S.; Reis R.E. (Eds.). *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. Berkeley. University of California Press, p.3-19.
- ALMEIDA, F. F. M. 1965. Geologia da Serra da Bodoquena (Mato Grosso), Brasil. *Boletim da Divisão de Geologia e Mineralogia*, DNPM, Rio de Janeiro, v. 219, p. 1-96.
- AVISE, J. C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge: Harvard University Press, 447p.
- AVISE, J. C. 2004. *Molecular Markers*, Natural History and Evolution. USA: Chapman and Hall, 511p.
- AVISE, J. C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, v.36, p.3-15.
- ASSINE, M. L. 2004. A bacia sedimentar do Pantanal Mato-Grossense. In: MANTESSO-NETO, V.; BARTORELLI, A.; CARNEIRO, C. D. R.; BRITO-NEVES, B. B. (Eds.). *Geologia do Continente Sul-Americano: Evolução da Obra de Fernando Flávio Marques de Almeida*. São Paulo. Editora Beca, p.61-74.
- BARR, T. C. JR.; HOLSINGER, J. R. 1985. Speciation in cave faunas. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.16, p.313-337.
- BARRCLOG, T. G. & VOGLER, A. P. 2000. Detecting the Geographical Pattern of Speciation from Species-Level Phylogenies. *The American Naturalist* vol. 155, no. 4
- BASKIN, J. N. 1973. *Structure and relationship of the Trichomycteridae*. 389p. Dissertation (Doctoral) - City University of New York, New York.
- BEEBEE, T.; ROWE, G. 2008. *An Introduction to Molecular Ecology*. 2 ed. Oxford University Press, 416 pag.
- BELKHIR K.; BORSA, P.; CHIKHI, L.; RAUFASTE, N.; BONHOME, F. 2004. GENETIX 4.03, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. Laboratoire genome et populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- BICHUETTE, M. E.; RIZZATO P. P. 2012. A new species of cave catfish from Brazil, *Trichomycterus rubbioli* sp.n., from Serra do Ramalho karstic area, São Francisco River basin, Bahia State (Siluriformes: Trichomycteridae). *Zootaxa*, v. 3480, p.48-66.
- BOOKSTEIN, F. L. 1991. Morphometric Tools for Landmark Data. *Geometry and Biology*, New York: Cambridge University Press. 435p.
- CAMPANHA, G. A. C.; BOGGIANI, P. C.; SALLUN FILHO, W.; SÁ, F. R.; ZUQUIM, M. P. S.; PIACENTINI, T. 2011 . A Faixa de Dobramento Paraguai na Serra da Bodoquena e Depressão do Rio Miranda, Mato Grosso do Sul. *Geologia USP, Série Científica*, v. 11, p. 79-96.
- CARVALHO, M. R.; CRAIG, M (Org.). 2011. *Morphological and Molecular Approaches to the Phylogeny of Fishes: Integration or Conflict?* Auckland: Mapress, v.2946. 142p

- CHRISTIANSEN, K.A. 2012. Troglomorphism. In: CULVER, D. C.; WHITE, W. B. (Org.). *Encyclopedia of Caves*, 2nd ed., Chennai: Academic Press. p. 517-527.
- CHIARI, Y.; VAN DER MEIJDEN, A.; MUCEDDA, M.; LOURENÇO, J.M.; HOCHKIRCH, A. 2012. Phylogeography of Sardinian Cave Salamanders (Genus *Hydromantes*) Is Mainly Determined by Geomorphology. PLoS ONE, v.7, n.3, e32332. doi:10.1371/journal.pone.0032332.
- COLLI, L.; PAGLIANTI, A.; BERTI, R.; GANDOLFI, G.; TAGLIAVINI, J. 2009. Molecular phylogeny of the blind cavefish *Phreatichthys andruzzii* and *Garra barreimiae*.
- CORDEIRO, L. M.; BORGHEZAN, R.; TRAJANO, E. 2013. Distribuição, riqueza e conservação dos peixes troglóbios da Serra da Bodoquena, MS (Teleostei: Siluriformes). *Revista da Biologia*, v.10, n.2, p. 21-27.
- CULVER, D. C.; PIPAN, T.; SCHNEIDER, K. D. 2009. Vicariance, dispersal and scale in the aquatic subterranean fauna of karst regions. *Freshwater Biology*, v.54, p. 918-929.
- CULVER, D. C. 1982. *Cave Life: Evolution and Ecology*. Cambridge, M A: Harvard University Press, 189p.
- DRYDEN, I. L.; MARDIA K.V. 1998. *Statistical Shape Analysis*. Wiley, Chichester of. 347p.
- ESPOSTI, DM; DE VRIES, S.; CRIMI, M.; GHELLI, A.; PATARNELLO, T.; MEYER, A. 1993. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochim Biophys Acta*, v.11, n.43, p.243-271.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, v.10, p.564-567.
- FARIAS, I.; ORTI, G.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H.; MEYER, A. 2001. The Cytochrome b Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. *Journal of Molecular Evolution*. v.53, p.89-103.
- FORD, D.; WILLIAMS, P. 2007. *Karst hydrogeology and geomorphology*. John Wiley & Sons Ltd, 579p.
- GARNIER, S.; MAGNIEZ-JANNIN, F.; RASPLUS J. Y.; ALIBERT, P. 2005. When morphometry meets genetics: inferring the phylogeography of *Carabus solieri* using Fourier analyses of pronotum and male genitalia. *Journal of Evolutionary Biology* v.18, p.269-280.
- Gould, S. J. 1977. *Ontogeny and phylogeny*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 501p.
- HALL, T.A. 1999. BioEdit: a userfriendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v.41, p.95-98.
- HOWARTH, F.G. & HOCH, H. 2012. Adaptative shifts. In: WHITE, W.B.; CULVER, D.C. (Org.). *Encyclopedia of Caves*. 2ed. Chennai: Academic Press, p. 9-17.
- HÜPPOP, K. 2000. How do cave animals cope with the food scarcity in caves? In H. Wilkens, D. C. Culver, & W. F. Humphreys (eds). *Subterranean ecosystems*, Amsterdam: Elsevier, p.189-210.

- KAVALCO, K. F.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. 2007. Molecular genetics of blind mexican tetra and commentts on the karyotypic characteristics of the genus *Astyanax* (Teleostei: Characidae). *Zebrafish*, v.4, p.103-111.
- KLINGENBERG, C. P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, v.11, p.353-357.
- KREJAC, K. 2005. *Stygobite phylogenetics as a tool for determining aquiferevolution*. (Doctoral Thesis)-University of Texas, Austin, 115p.
- JUAN, C.; GUZIK, M. T.; JAUME, D.; COOPER, S. J B. 2010. Evolution in caves: Darwin's 'wrecks of ancient life' in the molecular era. *Molecular Ecology*, v.19, p.3865-3880.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, v.25, p.1451-1452.
- LIMA, F. C. T. & A. C. RIBEIRO. 2011. Continental-scale tectonic controls of biogeography and ecology. Pp. 145-164. In: Albert, J. S. & R. E. Reis (Eds.). *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. Berkeley. University of California Press.
- MANTEL N (1967) The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Res*, v.27, p. 209-220.
- NIEMILLER, L M; FITZPATRICK B. M. and MILLER B. T.2008.Recent divergence with gene flow in Tennessee cave salamanders (Plethodontidae: *Gyrinophilus*) inferred from gene genealogies *Molecular Ecology* (2008) 17, 2258–2275
- NIEMILLER, M. L.; NEAR, T. J.; FITZPATRICK, B. M. 2012. Delimiting species using multilocus data: diagnosing cryptic diversity in the southern cavefish, *Typhlichthys subterraneus* (Teleostei: Amblyopsidae). *Evolution*, v. 66-3, p. 846-866.
- PALMER, A. N. 2007. *Cave Geology*. Dayton, Ohio: Cave Books, 288p.
- PALANDAČIĆ, A.; BONACCI, O.; SNOJ, A. 2011. Molecular data as a possible tool for tracing groundwater flow in karst environment: example of *Delminichthys adspersus* in Dinaric karst system. *Ecohydrology*. doi: 10.1002/eco.269.
- PEREIRA, L. H. G.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics* (Online), v. 14:20, <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/14/20>.
- POLLY, P. D. 2008. Adaptive Zones and the Pinniped Ankle: A 3D Quantitative Analysis of Carnivoran Tarsal Evolution. In: Sargis, E.; Dagosto, M. (Eds.) *Mammalian Evolutionary Morphology: A Tribute to Frederick S. Szalay*. Springer: Dordrecht, The Netherlands, p.165-194.
- POSADA, D. 2008. ModelTest v0.1.1: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol*. In press.
- POULSON, T. L.; WHITE, W. B. 1969. The cave environment. *Science*, 165(3897), p.971-981.
- PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, R. 2001. *Biologia da conservação*. Editora Planta, Londrina. 328p.

- PROUDLOVE, G.S. 2001. The conservation status of hypogean fishes. In: ROMERO, A. 1ed. *The biology of hypogean fishes*. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, pp. 201-213.
- PUORTO, G.; DA GRAÇA SALOMÃO, M.; THEAKSTON, R. D. G.; THORPE, R. S.; WARRELL, D. A.; WÜSTER, W. 2001. Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: Phylogeography of lancehead pitvipers in the Brazilian Atlantic forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *J. Evol. Biol.* v.14, p.527-538.
- PROUDLOVE, G. S. 2010. Biodiversity and distribution of subterranean fishes of the world. In: TRAJANO, E; BICHUETTE; KAPOOR B. G. (Eds.) *Biology of subterranean fishes*, 1ed. Enfield: Science Publishers, p. 65-80.
- REIS, R. E.; TRAJANO, E.; HINGST-ZAHER, E. 2006. Shape variation insurface and cave populations of the armoured catfishes *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the São Domingos karst area, upper Tocantins River, Brazil. *Journal of Fish Biology*, v.68, p.414-429.
- RIBEIRO, A. C. 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, v.4,n.2, p.225-246.
- RIBEIRO, *et al.* 2013. Distributions and phylogeographic data of rheophilic freshwater fishes provide evidences on the geographic extension of a central-brazilian amazonian palaeoplateau in the area of the present day Pantanal Wetland. *Neotropical Ichthyology*, v.11, n.2, p.319-326.
- RIZZATO, P. P.; COSTA-JUNIOR, E.; TRAJANO, E.; BICHUETTE, M. E. 2011. *Trichomycterus dali*: a new highly troglomorphic catfish (Siluriformes: Trichomycteridae), from Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Central Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v.9, p.477-491.
- SABINO, J.; TRAJANO, E. 1997. A new species of blind armoured catfish, genus *Ancistrus*, from caves of Bodoquena region, Mato Grosso do Sul, southeastern Brazil (Siluriformes, Loricariidae, Ancistrinae). *Revue Française de Aquariologie*, França, v.24, n.3-4, p.73-78.
- SALLUN-FILHO, W. 2005. *Geomorfologia e geoespeleologia do carste da Serra da Bodoquena*, MS. Tese (Doutorado), Instituto de Geociências – USP. 212p.
- SALLUN FILHO, W.; KARMANN, I.; BOGGIANI, P. C. 2004. Paisagens cársticas da Serra da Bodoquena, MS. In: MANTESSO, V. N.; BARTORELLI, A.; CARNEIRO, C. D. R.; BRITO NEVES, B. B. (Org.). *Geologia do continente Sul-Americano: Evolução da Obra de Fernando Flavio Marques de Almeida*. 1ed.São Paulo: BECA, p.425-433.
- SALLUN FILHO, W.; KARMANN, I. 2007. Geomorphological map of the Serra da Bodoquena karst, west-central Brazil. *Journal of maps*, p.282-295.
- SALLUN FILHO, W.; KARMANN, I. Províncias cársticas e cavernas no Brasil. 2012. In: HASSUI, Y.; CARNEIRO, C. D. R.; ALMEIDA, F. F. M.; BARTORELLI, A. (Org.). *Geologia do Brasil*. São Paulo: Beca, p. 629-641.
- SALZBURGER, W.; EWING, G.B.; VON HAESELER, A. 2011. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology*, v.20, p.1952-1963.

- SANGER, F.; NICHLEN, S.; COULSON, A.R. 1977. DNA Sequencing with Chain-Termination Inhibitors. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, v.74, p.5463-5468.
- SANTOS, S.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. 2003. Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. *Genetics and Mol Biol*, v.26, p.151-161.
- SAZIMA, I.; POMBAL-JR, J.P. 1986. Um albino de *Rhamdella minuta*, com notas sobre comportamento (Osteichthyes, Pimelodidae). *Revista Brasileira de Biologia*, v.46, n.2, p.377-381.
- SBORDONI, V.; ALLEGRUCCI, G.; CESARONI, D. 2012. Population structure. In: WHITE, W.B.; CULVER, D.C. (Org.). *Encyclopedia of Caves*. 2ed. Chennai: Academic Press, p.608-618.
- SEVILLA et al., 2007 Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome *b* and nuclear rhodopsin genes *Molecular Ecology*
- SMITH, G.R. 1990. Homology in morphometrics and phylogenetics. In: F.J. ROHLF AND F.L. BOOKSTEIN (eds.), *Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop*. Spec. Publ. 2, The University of Michigan Museum of Zoology, Ann Arbor, p. 326-338
- STRECKER, U.; BERNATCHEZ, L.; WILKENS, H. 2003. Genetic divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Molecular Ecology*, v.12, p.699 – 710.
- TAMURA K, N. M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, v.10, n.3, p. 512–526.
- TAMURA K, P. D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI M, K. S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.*, v.28, p.2731-2739.
- TEMPLETON, A. R. 2011. *Genética de Populações e Teoria Microevolutiva*. 1. Ed. Sociedade Brasileira de Genética. 705p.
- TRAJANO, E. 2001. Ecology of subterranean fishes: an overview. *Environmental Biology of Fishes*, v.62, p.133-160.
- TRAJANO, E. The challenge of estimating the age of subterranean lineages: examples from Brazil. *Acta Carsologica*, v. 36, p. 191-198, 2007.
- TRAJANO, E.; BICHUETTE, M. E. 2010. Subterranean fishes of Brasil. In: TRAJANO, E; BICHUETTE; KAPOOR B. G. (Eds.) *Biology of subterranean fishes*, 1ed. Enfield: Science Publishers, p.331-335.
- TRAJANO, E. 2012. Ecological classification of subterranean organisms. In: WHITE, W.B.; CULVER, D.C. (Org.). *Encyclopedia of Caves*. 2ed. Chennai: Academic Press, p. 275-277.
- WARD et al. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. v.360, 1847-1857.

- WILEY, E. O.; LIEBERMAN, B. S. 2011. Species and Speciation. In: WILEY, E. O.; LIEBERMAN, *Phylogenetics: Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*, Second Edition, John Wiley & Sons 432p.
- WILKENS, H. 1988. Evolution and genetics of epigean and cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). Support for the neutral mutation theory. In: HECHT, M. K.; WALLACE, B. (Eds.). *Evolutionary biology*, New York: Plenum Publishing Corporation, p.271-367.
- WILSON, L. A. B. 2013. Geographic variation in the greater Japanese shrew-mole, *Urotrichus talpoides*: Combining morphological and chromosomal patterns. *Mammalian Biology*, v.78, p.267-275.
- WRIGHT, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*, Variability Within and Among Natural Populations. V.5, University of Chicago Press. 590 p.
- ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; v.7, n.1-2, p.203-14.

Anexo I

Artigo aceito para publicação na revista Biota Neotropica

Anexo II

Artigo publicado na Revista da Biologia