



**Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências
Departamento de Morfologia**

Luciana Ramos Sato

Estudo das relações filogenéticas de Trichomycteridae (Teleostei, Siluriformes) com base em evidências cromossômicas e moleculares.

Tese apresentada ao curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Genética, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof^o Dr. Claudio de Oliveira

Botucatu-SP
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Sato, Luciana Ramos.

Estudo das relações filogenéticas de Trichomycteridae (Teleostei, Siluriformes) com base em evidências cromossômicas e moleculares / Luciana Ramos Sato. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu 2007.

Orientador: Cláudio de Oliveira

Assunto CAPES: 20200008

1. Peixe de água doce - Filogenia 2. Peixe - Genética 3. Biologia molecular

CDD 597.15

Palavras-chave: Citogenética; DNA mitocondrial; Filogenia; Siluriformes; Trichomycteridae

“A classificação por descendência não pode ser inventada por biólogos, ela pode apenas ser descoberta”.

(Theodosius Dobzhansky)

Dedico este trabalho,

*Aos meus pais Sato e Irene
e à minha irmã Eliana*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, e em especial:

A Deus por estar sempre presente guiando meus caminhos.

Ao professor Cláudio de Oliveira pela orientação, transmissão de conhecimento e acima de tudo pela paciência durante todos os meus anos em Botucatu.

Aos professores Dr. Fausto Foresti, Dr. César Martins e Dra Adriane Wasko por todos os ensinamentos.

Ao Departamento de Morfologia e seus funcionários, e em especial a D. Terá que sempre arranja um jeito de agradar todo mundo.

A FAPESP por me dar todas as condições de realizar este projeto e concluir mais esta etapa da minha busca por conhecimento.

A todas as pessoas que já passaram pelo Laboratório de Biologia e Genética de Peixes que cresce a cada dia, por todos os anos de trabalho conjunto. Em especial a Cris, Elô, e Renato, por toda ajuda, aprendizado e acima de tudo pela amizade especial.

As amigas de todas as horas durante estes anos: Ana, Fer, Flavinha, Ka e “Kemi” pelas risadas, choros e felicidade compartilhados dentro ou fora da universidade. Amizades assim a gente leva para sempre...

Aos amigos de longe somente fisicamente: Fê, Line, Lu, “Polí”, Ro e Tati por sempre me incentivarem.

Aos amigos que fiz na pós e em especial ao povo do BIOGEN.

Aos amigos da “3rd Floor kitchen”, especialmente: Kathrin, Lydía, Owen e Phil que fizeram minha adaptação em Tóquio muito mais fácil.

Ao Ocean Research Institute da Universidade de Tóquio e aos Dr. Mutsumi Nishida e Dr. Masaki Miya pela oportunidade de estágio e aprendizado científico além de me ensinarem um pouco mais sobre a cultura japonesa.

Ao Sebastien Lavoue e Ryouka Kawahara por todo auxílio e carinho dentro e fora do laboratório durante minha estadia em Tóquio.

E finalmente a minha família que sempre compartilhou comigo meus sonhos e conquistas. Vocês sempre acreditaram em mim e devo a vocês tudo o que sou.

Resumo

Trichomycteridae é uma família de pequenos bagres amplamente distribuídos na América do Sul e Central. Esta família apresenta 218 espécies descritas, distribuídas em 44 gêneros, sendo aproximadamente 100 pertencentes ao gênero *Trichomycterus*. Os Trichomycteridae estão atualmente divididos em oito subfamílias: Copionodontinae, Trichogeninae, Trichomycterinae, Sarcoglanidinae, Glanapteryginae, Tridentinae, Stegophilinae, Vandelliinae. Todas as subfamílias são consideradas monofiléticas, exceto Trichomycterinae. Poucos estudos foram realizados até o momento visando esclarecer as relações entre os grupos constituintes de Trichomycteridae, assim como sobre outros aspectos do grupo, como os dados citogenéticos. Os números diplóides conhecidos variam de $2n=50$ em *Trichomycterus* sp. a provavelmente $2n=64$ em *Vandellia cirrhosa* embora a maioria das espécies tenham $2n=54$. Espécies de *Copionodon* (presente estudo) e *Trichogenes*, considerados os gêneros mais primitivos dentro da família, apresentam $2n=54$ sugerindo que esse é o número ancestral para a família, ocorrendo alguns rearranjos em *Vandellia* e alguns *Trichomycterus*. Os dados moleculares obtidos no presente trabalho mostram que *Ituglanis* aparece como um grupo monofilético e irmão de todos os outros *Trichomycterus*, com exceção de *T. hasemani* que aparece mais relacionada à subfamília Vandelliinae (que se mostrou monofilética em todas as análises). Nas filogenias baseadas em dados moleculares, as subfamílias Sarcoglanidinae e Glanapteryginae não aparecem estritamente relacionadas como na hipótese baseada em dados morfológicos. Com a exclusão de *T. hasemani* e *Scleronema angustirostris*, tanto a subfamília Trichomycterinae, como o gênero *Trichomycterus* seriam grupos monofiléticos, diferente das hipóteses atuais, feitas com base em dados morfológicos.

Abstract

Trichomycteridae is a family of small-sized catfishes which are widely distributed throughout Central and South America. This family has 218 described species, distributed in 44 genera and about 100 species belong to the genus *Trichomycterus*. Trichomycteridae is currently divided into eight subfamilies: Copionodontinae, Trichogeninae, Trichomycterinae, Sarcoglanidinae, Glanapteryginae, Tridentinae, Stegophilinae and Vandelliinae. All of these subfamilies are demonstrably monophyletic, except Trichomycterinae. Only a few studies have been conducted so far trying to solve the relationships among Trichomycteridae as well in other fields like Cytogenetics. The diploid chromosome number ranges from $2n=50$ in *Trichomycterus* sp. to expected $2n=64$ in *Vandellia cirrhosa*, although most species of this family have $2n=54$ chromosomes. Species of *Copionodon* (present study) and *Trichogenes*, considered the most primitive genera in Trichomycteridae, have $2n=54$, suggesting that this may be the ancestral diploid number of the family and that few chromosome changes occurred in *Vandellia* and in some *Trichomycterus*. Molecular data obtained in the present study show that *Ituglanis* is a monophyletic group and sister-group of all *Trichomycterus*, except *T. hasemani* that seems related to the subfamily Vandelliinae (that is monophyletic in all analysis). In the phylogenys based on molecular data Sarcoglanidinae and Glanapteryginae are not related as suggested in the hypotheses based on morphological data. If *T. hasemani* and *Scleronema angustirostris*, are excluded, not only Trichomycterinae, but also, *Trichomycterus* appear as monophyletic groups which differ from currently hypothesis based on morphologic data.

RESUMO

Abstract

1. INTRODUÇÃO	01
1.2 Aspectos Citogenéticos e de DNA mitocondrial.....	04
1.2.1 A família Trichomycteridae.....	10
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS	18
4. MÉTODOS	21
4.1 Métodos citogenéticos.....	21
4.1.1 Estimulação de mitoses.....	21
4.1.2 Preparação de cromossomos mitóticos.....	21
4.1.3 Coloração com Giemsa.....	22
4.1.4 Localização das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs).....	23
4.1.5 Medidas Cromossômicas.....	24
4.1.6 Montagem dos cariótipos.....	24
4.2 Métodos Moleculares.....	24
4.2.1 Isolamento do DNA genômico.....	24
4.2.2 Amplificação e limpeza dos fragmentos.....	25
4.2.3 Reação de Seqüenciamento e limpeza.....	29
4.2.4 Alinhamento das seqüências e análise filogenética.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32

Capítulo 1

Análise citogenética de *Copionodon orthiocarinatus* e seis espécies de *Trichomycterus* (Siluriformes: Trichomycteridae)

—	33
Introduction.....	33
Materials and Methods.....	37
Results and Discussion.....	37

Capítulo 2

Filogenia molecular da família Trichomycteridae (Ostariophysi, Siluriformes) baseada em dados moleculares	42
Introdução.....	42
Material e métodos.....	43
Resultados.....	45
Discussão.....	48

Capítulo 3

Hipótese de relacionamento entre as subfamílias de Trichomycteridae com base em longas seqüências de DNA mitocondrial	54
Introdução.....	54
Material e métodos.....	56
Resultados e Discussão.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. INTRODUÇÃO

O estudo dos peixes neotropicais tem-se expandido consideravelmente nos últimos anos, principalmente após a incorporação de novas técnicas de obtenção e interpretação de dados, entre as quais está o uso da metodologia de análise filogenética proposta inicialmente por Hennig (1966) (Malabarba et al., 1998). Entretanto, o relacionamento dentro de muitos grupos necessita ainda de um melhor esclarecimento.

A fauna de peixes Neotropicais de água doce é bastante diversificada. Na região Neotropical, encontramos 71 famílias, num total de 4.475 espécies consideradas válidas (Reis et al., 2003). Considerando todas informações já disponíveis Reis et al. (2003) sugeriram que nessa região podem existir 6.000 espécies de água doce, sendo que em todo o mundo temos cerca de 13.000 espécies. Schaefer (1998), em um levantamento das tendências históricas de descrição de espécies em Characidae e Loricariidae, calculou que podiam existir cerca de 8.000 espécies de peixes de água doce neotropicais correspondendo a 25% de todas as espécies de peixes do mundo. Este número foi discutido e aceito por Vari e Malabarba (1998) que acrescentam que toda essa diversidade de peixes de água doce neotropicais ocorre em menos de 0,003% da água do planeta.

Siluriformes, dentro de Ostariophysi, é a ordem mais diversificada e bem distribuída, incluindo 3093 espécies, 478 gêneros e 36 famílias (Ferraris, 2007). Entre os Neotropicais, foram descritas 1.648 espécies, compreendidas em 15 famílias (Reis et al., 2003). Devido à contínua descoberta de novos táxons, estes números devem ser significativamente incrementados a fim de se ter um melhor e maior conhecimento do grupo e de suas relações filogenéticas.

Os Siluriformes são peixes que geralmente habitam o fundo dos rios, permanecendo entre as rochas e a vegetação. Possuem formas e tamanhos extremamente variados com hábitos predominantemente

crepusculares e noturnos (Paxton e Eschmeyer, 1995). São caracterizados principalmente por possuírem total ausência de escamas sobre o corpo, presença de barbilhões e freqüentemente um acúleo forte e pungente a frente do primeiro raio das nadadeiras dorsal e peitorais (Burges, 1989), capaz de infringir graves ferimentos e em algumas espécies, injetar um veneno produzido por células glandulares localizadas no tecido epidérmico que cobre estes acúleos (Paxton e Eschmeyer, 1995). O corpo desprovido de escamas pode ser revestido por uma pele espessa, popularmente conhecida como couro, ou então, coberto com placas ósseas, total ou parcialmente; geralmente possuem três pares de barbilhões, provavelmente utilizados para localizar alimentos no fundo e orientar sua natação (Burges, 1989).

A grande maioria dos peixes da ordem Siluriformes habita ambientes de água doce, sendo que apenas duas famílias, Ariidae e Plotosidae são formadas por espécies marinhas. Sua distribuição parece ser limitada pela temperatura, uma vez que a maioria habita as regiões Tropical e Neotropical e poucas são aquelas que alcançam o extremo sul da América do Sul ou o extremo norte da América do Norte (Nelson, 2006), embora *Diplomystes*, o silurídeo considerado mais primitivo, o único a possuir maxilar dentado, ocorra no extremo sul da América do Sul (de Pinna, 1998).

Apesar da importância científica e econômica (como no consumo, na pesca esportiva e aquarofilia) dos Siluriformes o grupo apresenta ainda inúmeros problemas sistemáticos e taxonômicos. A própria classificação das famílias de Siluriformes ainda não é consensual assim, por exemplo, o número de famílias citadas para a ordem é de 36 segundo Ferraris (2007), 34 segundo Nelson (2006), 29 segundo Ferraris (1995) e 33 segundo Eschmeyer (1998). Um estudo recente da sistemática de representantes de todos os principais grupos dessa ordem indicou que algumas famílias formam

agrupamentos polifiléticos enquanto vários grupos tradicionais tiveram seu monofiletismo confirmado (Britto, 2002) (Figura 1).

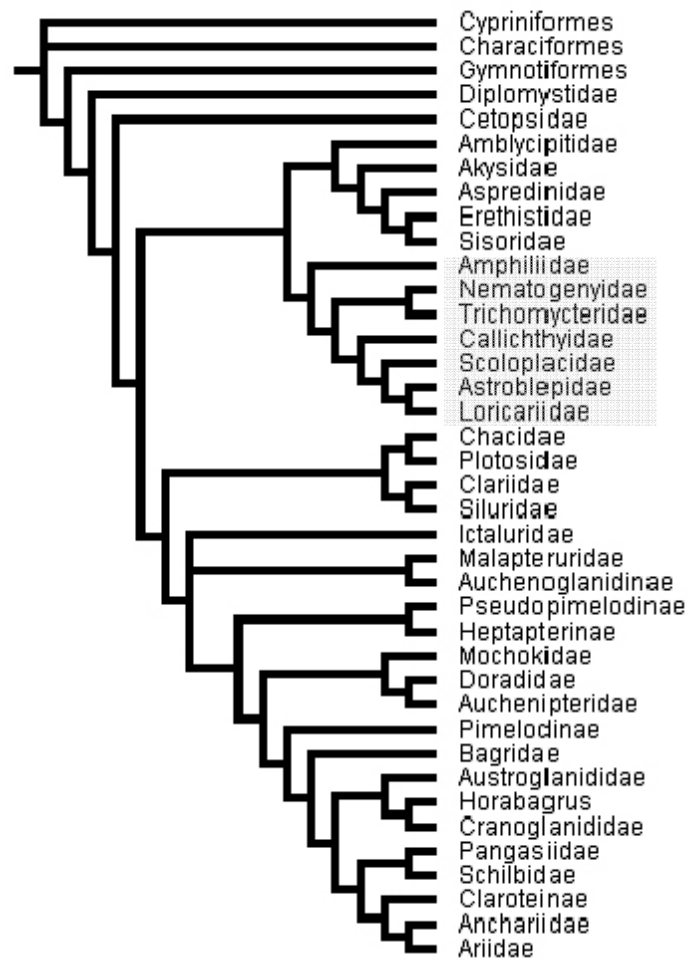


Figura 1. Filogenia proposta por Britto (2002) para a ordem Siluriformes. Em destaque a superfamília Loricarioidea.

1.2 Aspectos Citogenéticos e de DNA mitocondrial

Os estudos citogenéticos em peixes têm levado à caracterização do número cromossômico e do cariótipo de muitas espécies e levantado uma considerável soma de informações relativas à presença e distribuição da heterocromatina constitutiva e das regiões organizadoras de nucléolos (NORs). Além das técnicas citadas serem fundamentais para a caracterização citogenética básica de qualquer organismo, uma grande parte das informações obtidas através de seu emprego tem sido analisada sob uma abordagem evolutiva. Além disso, nos últimos anos a citogenética de peixes tem se expandido significativamente, principalmente a partir da aplicação de técnicas de bandamento que, embora utilizadas como rotina nas pesquisas de citogenética humana e de mamíferos, apresentavam dificuldades de adaptação aos cromossomos de peixes. A introdução dessas técnicas, como os bandamentos C e G, o uso de fluorocromos e a incorporação de análogos de bases do DNA no ciclo celular, ao estudo dos cromossomos dos peixes tem fornecido importantes resultados na comparação entre espécies próximas (Sola et al., 1981; Almeida-Toledo et al., 1988), na visualização de estados iniciais de diferenciação de cromossomos sexuais (Phillips e Ihssen, 1985) e na identificação do padrão de replicação dos cromossomos (Delany e Bloom, 1984).

Dos primeiros estudos citogenéticos até o presente, foram analisados os cromossomos de cerca de 2.800 espécies de peixes em todo o mundo (Klinkhardt et al., 1995), o que representa algo em torno de 10% das espécies que se supõe existir. Os resultados mostram que o número diplóide varia de $2n=12$ cromossomos em um Gonostomatidae, *Gonostoma bathyphylum* (Post, 1974 citado em Klinkhardt et al., 1995) a $2n=446$ cromossomos em um Cyprinidae, *Diptychus dipogon* (Jianxun et al., 1991). Os cromossomos dos peixes apresentam em geral entre 1 e 6 μm de comprimento total, o

que é um tamanho bastante reduzido se comparado aos cromossomos de outros grupos de vertebrados.

O estudo citogenético de peixes neotropicais tem apresentado também uma considerável expansão nos últimos anos. Na primeira revisão sobre os dados citogenéticos de peixes neotropicais feita por Almeida-Toledo (1978), estão incluídos os números haplóides e/ou diplóides de 252 formas de água doce das divisões primárias e secundárias da América do Sul e Central. Em uma revisão feita em 1988 por Oliveira e colaboradores, foram listados os números haplóides e/ou diplóides de 421 espécies, distribuídas em 141 gêneros e 32 famílias. Até o presente são conhecidos os números diplóides de 921 espécies (113% a mais que em 1988), 252 gêneros (74% a mais que em 1988) e 44 famílias (33% a mais que em 1988) (Oliveira et al., 2007). Os números diplóides variam de $2n=20$ para *Pterolebias longipinnis* a $2n=134$ para *Corydoras aeneus*. Há, no entanto uma grande discrepância quanto à natureza dos dados disponíveis para cada grupo; assim, por exemplo, para o gênero *Hyphessobrycon* são conhecidos os números haplóides e/ou diplóides de 34 espécies, porém apenas 4 tiveram seu cariótipo descrito, enquanto para o gênero *Leporinus* são conhecidos os números haplóides e/ou diplóides de 25 espécies, sendo que apenas para 4 não há dados a respeito da estrutura cariotípica. Cromossomos sexuais são conhecidos para 40 espécies e/ou populações locais, englobando 23 relatos de heterogametia feminina (57,5%) e 17 relatos de heterogametia masculina (42,5%). Cromossomos supranumerários foram encontrados em 29 espécies. É conhecido o conteúdo de DNA nuclear para 106 espécies, sendo que o mesmo varia de $1,04 \pm 0,09$ pg em *Corydoras cf. simulatus* ($2n=62$) a 248.0 pg/nucleus in *Lepidosiren paradoxa* ($2n=38$) (Carvalho et al., 1998).

Dados sobre o emprego de técnicas de bandamento, como a banda G e a banda R, o uso de fluorocromos base-específicos e o uso de endonucleases de restrição são ainda restritos, porém

promissores. Aparentemente os fatores limitantes para o sucesso dessas técnicas são a dificuldade na obtenção de boas preparações cromossômicas e a presença de grande número de cromossomos relativamente pequenos na maioria desses organismos (Gold et al., 1990), e uma reduzida quantidade de DNA nuclear. Além disso, a composição dos cromossomos dos peixes aparentemente difere, em alguns aspectos, da verificada nos mamíferos, principalmente no que se refere a presença de regiões ricas em AT e CG, impedindo o sucesso da aplicação dessas técnicas em todas as espécies desse grupo (Oliveira et al., 1999; Oliveira et al., 2002).

Do ponto de vista taxonômico o estudo citogenético tem-se revelado de grande valia uma vez que diversos grupos, identificados apenas com base em estudos morfológicos, mostram-se formados por diversas unidades, possivelmente isoladas geneticamente. Como exemplo pode-se citar as espécies identificadas como *Gymnotus carapo*, onde em cinco amostras estudadas encontrou-se uma variação no número diplóide de $2n=42$ e $2n=48$ na bacia Amazônica, $2n=52$ e $2n=54$ na bacia do Alto Paraná e $2n=54$ na bacia do Leste (Foresti et al., 1984). Um outro estudo desenvolvido em 11 populações nos estados de São Paulo e Paraná mostrou a presença de cinco citótipos com uma variação no número diplóide de $2n=40$ a $2n=54$ (Fernandes-Matioli, 1996). Uma grande variação cariotípica foi encontrada também em *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Giuliano-Caetano, 1986), onde exemplares coletados no rio Negro (Manaus, AM) apresentavam $2n=48$ e exemplares do vale do rio Doce (MG) e lagoa Juturnaíba (RJ) apresentavam $2n=52$ (NF=96) e $2n=52$ (NF=95), respectivamente. Esses resultados sugerem que em *H. unitaeniatus*, uma espécie que apresenta ampla distribuição geográfica, um grau de diferenciação subespecífica ou mesmo específica já teria ocorrido, o que estaria refletido nas variações cromossômicas observadas, de tal forma que o gênero *Hoplerythrinus* não seria monotípico como correntemente se admite (Giuliano-

Caetano, 1986). Além desses, outros inúmeros exemplos já foram descritos.

Mais recentemente vários grupos de pesquisa têm voltado sua atenção para o uso de novas técnicas de análise, para a caracterização de espécies e populações e também para identificação do padrão de relacionamento entre grupos de organismos. Entre essas novas técnicas a mais amplamente empregada envolve a análise de seqüências de DNA. Ainda que até o momento o número de estudos de seqüências de DNA realizados com peixes seja bastante pequeno em relação a extensão do grupo, os resultados já obtidos são bastante promissores (Stock et al., 1991; Kocher e Stepien, 1997). Assim, no conjunto de trabalhos publicados no livro editado por Kocher e Stepien (1997) pode-se observar o amplo e versátil emprego das análises moleculares na elaboração de hipóteses de relacionamento em diversos níveis taxonômicos variando de populações locais até grandes grupos de peixes.

Entre os genes mais comumente seqüenciados estão os genes mitocondriais. O tamanho do genoma mitocondrial (mtDNA) é bastante variável, apresentando valores em torno de 16 quilobases (kb) nos vertebrados até 570 kb em algumas espécies de plantas (Lewin, 1994). Estudos extensivos realizados com o genoma mitocondrial humano mostraram que o mesmo é constituído por 16.569 pares de base, sendo que nesse genoma encontram-se os genes 12S e 16S do rRNA, 22 genes de tRNA, as subunidades I, II e III do citocromo *c*, a subunidade 6 da ATPase, o citocromo *b* e genes para seis subunidades da NADH. Essa mesma constituição foi também encontrada em outros mamíferos, em *Xenopus laevis* (Lewin, 1994) e em várias espécies de peixes (Zardoya e Meyer, 1997; Miya et al., 2003) (Figura 3).

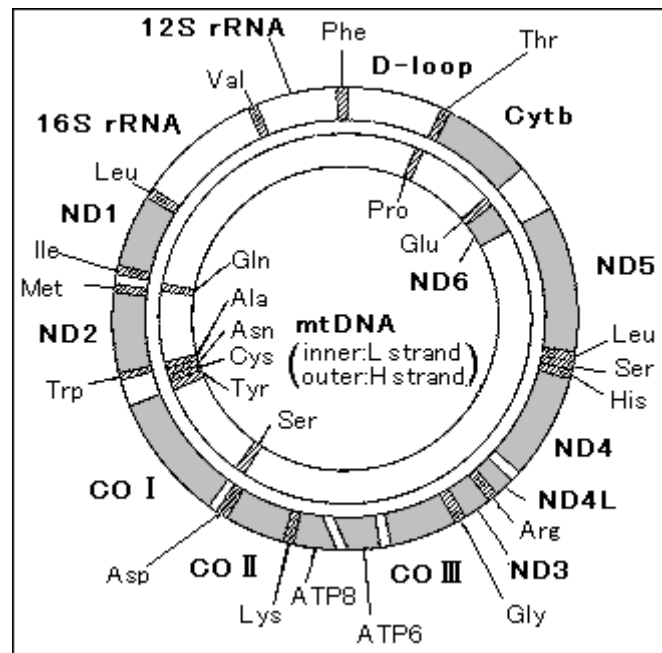


Figura 3: DNA mitocondrial e os genes que o compõem.

O interesse no estudo do mtDNA está baseado no fato de que esse genoma apresenta uma série de particularidades importantes como sua herança na maioria materna e sua presença nos organismos em número haplóide, o que impede (ou torna muito raros) os eventos de recombinação. Além disso, considerando que as condições nas organelas são diferentes daquelas encontradas no núcleo das células, as taxas de evolução dos genes em cada compartimento celular são independentes. Por exemplo, a taxa em que o mtDNA humano acumula mutações foi estimada em 2-4% por milhão de anos, o que representa uma taxa mais que dez vezes superior aquela observada para a globina, um gene nuclear (Lewin, 1994).

A possibilidade de utilização de seqüências de mtDNA para construção de filogenias torna possível não só uma melhor interpretação da história evolutiva das espécies em si, como também permite a análise simultânea dos padrões evolutivos seguidos por outros caracteres, que por sua vez apresentam menor possibilidade de interpretação filogenética. Um exemplo desse tipo de utilização de

dados de mtDNA está no trabalho de Alves-Gomes et al. (1995), onde a filogenia dos peixes da ordem Gymnotiformes foi reconstruída, tendo como base dados de mtDNA (parte das subunidades 12S e 16S do rRNA), assim como dados de morfologia e eletrofisiologia. No trabalho citado os dados moleculares serviram para elaboração de uma nova hipótese filogenética, que se mostrou mais congruente com a possível evolução morfológica e fisiológica dos peixes desse grupo, permitindo inclusive aos autores a proposição da criação de uma nova família para essa ordem. Murphy e Collier (1997) apresentaram uma filogenia, com base em fragmentos do citocromo *b*, e dos genes para 12S rRNA e 16S rRNA, para as famílias Aplocheiloidei (África) e Rivulidae (América do Sul), que compreende várias espécies conhecidas como "peixes anuais". A distribuição de espécies anuais nessa filogenia sugere que o anualismo surgiu no início da diferenciação desse grupo e parece ter sido perdido várias vezes nos gêneros que atualmente habitam ambientes aquáticos permanentes (Murphy e Collier, 1997).

A elaboração de filogenias moleculares permite também testar hipóteses de relacionamento construídas com base em outros caracteres como os caracteres morfológicos. Assim, por exemplo, com base em dados de mtDNA, uma filogenia molecular foi elaborada para os peixes da família Callichthyidae (Shimabukuro-Dias et al. 2004). A comparação das filogenias dentro das subfamílias de Callichthyidae eram diferentes em vários aspectos daquelas baseadas previamente em dados morfológicos. No trabalho, os autores compraram dados citogenéticos, moleculares e morfológicos previamente descritos e encontraram diferenças entre eles. Assim, há a necessidade de construção de várias hipóteses filogenéticas, baseadas em diferentes conjuntos de caracteres, antes de se procurar interpretar a história evolutiva de um táxon ou de uma região.

1.2.1 A família Trichomycteridae

Dentro da ordem Siluriformes a superfamília Loricarioidea é considerada um grupo monofilético, cujo relacionamento é considerado bem determinado (de Pinna, 1998). Fazem parte da superfamília Loricarioidea as famílias Loricariidae, Astroblepidae, Scoloplacidae, Callichthyidae, Trichomycteridae e Nematogenyidae (Schaefer, 1991) (Figura 1). Enquanto as famílias Astroblepidae, Scoloplacidae e Nematogenyidae são monotípicas ou formadas por um número pequeno de espécies as famílias Loricariidae, Callichthyidae e Trichomycteridae apresentam um grande número de espécies e estão divididas em várias subfamílias (Nelson, 2006).

As espécies da superfamília Loricarioidea estão distribuídas na América do Sul e na América Central, ocorrendo numa grande variedade de habitats, incluindo corredeiras em riachos a 3.000 metros de altitude até ambientes lênticos como em lagos. A grande maioria das espécies são peixes primários de água doce, ou seja, não toleram ambientes salobros e marinhos (Nelson, 2006). Apesar dos membros da superfamília Loricarioidea terem ampla distribuição, muitas espécies são características por formarem populações restritas a pequenas áreas. Isto provavelmente faz com que esta família apresente uma das maiores diversidade de formas de todos os peixes do mundo.

A família Trichomycteridae, com cerca de 200 espécies conhecidas e numerosas formas ainda não descritas, está dividida em oito subfamílias: Copionodontinae, Glanapteryginae, Sarcoglanidinae, Stegophilinae (incluindo Pareiodontinae), Trichogeninae, Trichomycterinae, Tridentinae e Vandelliinae, de acordo com de Pinna (1998). Uma hipótese de relacionamento entre essas famílias foi apresentada e discutida por de Pinna (1998) (Figura 2). Nessa hipótese os gêneros *Scleronema* e *Ituglanis* não são assinalados para nenhuma subfamília conhecida e as subfamílias Copionodontinae e

Trichogeninae formam uma tricotomia com os demais membros da família Trichomycteridae.

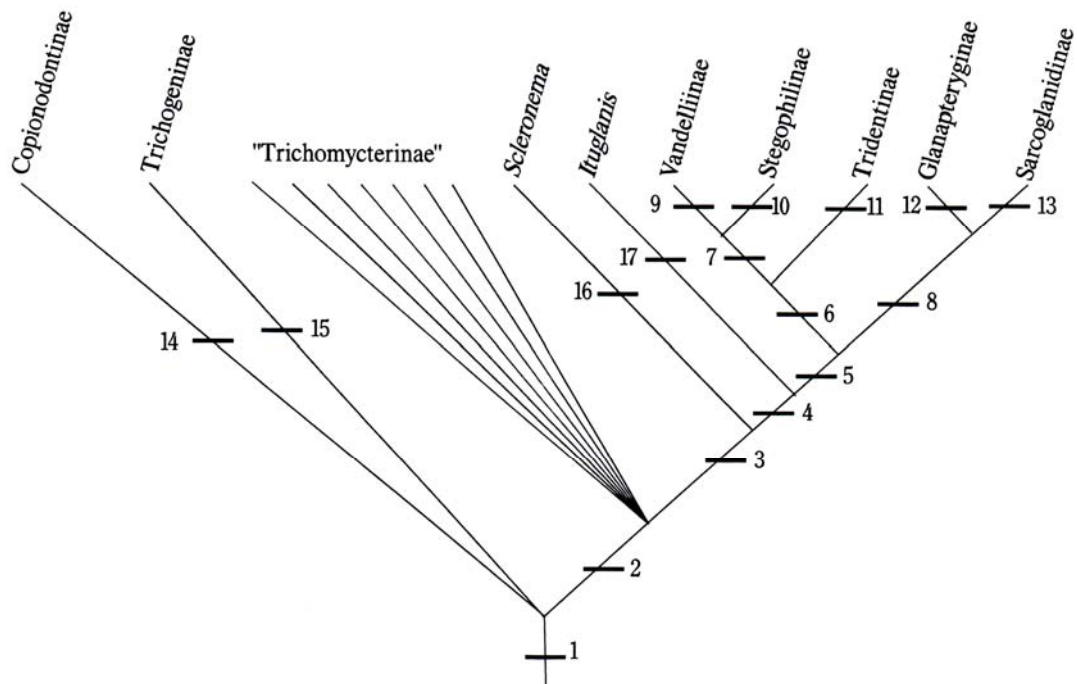


Figura 2. Filogenia proposta por de Pinna (1998) para a família Trichomycteridae. Os números indicam a ocorrência de sinapomorfias para diferentes clados. Note-se que nenhuma sinapomorfia foi identificada para o clado "Trichomycterinae".

Recentemente Wosiacki (2002) estudando 205 caracteres morfológicos de 74 espécies de Trichomycteridae encontrou quatro árvores igualmente parcimoniosas para a família que quando resumidas em um cladograma de consenso estrito resultou na identificação de 70 clados (Figura 3). Para uma correta organização das espécies, frente aos resultados obtidos, Wosiacki (2002), propõe a criação de 14 novos gêneros e 14 novas subfamílias. No estudo citado foi confirmado o polifiletismo de Trichomycterinae, já apontado por outros autores, como de Pinna (1998).



Figura 3: Cladograma de consenso estrito para os grupos de Trichomycteridae proposto por Wosiacki, 2002.

Atualmente estão disponíveis dados citogenéticos para 21 espécies de Trichomycteridae (Tabela 1). Os números diplóides variam de $2n=50$ em *Trichomycterus* sp. a $2n=64$ esperados em *Vandellia cirrhosa*. Os cariótipos são formados basicamente por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Todas as espécies analisadas apresentam apenas 1 par de cromossomos com NORs (Tabela 1).

Estudos citogenéticos em espécies do gênero *Trichomycterus* têm mostrado que, apesar do fato de que muitas espécies desse gênero sejam encontradas usualmente isoladas nas cabeceiras de pequenos rios e riachos, muitas espécies apresentam o mesmo número diplóide e uma macro-estrutura cariotípica conservada (Tabela 1). Todas as espécies cisandinas de *Trichomycterus* estudadas apresentam $2n=54$ cromossomos (Tabela 1). Mesmo nas espécies amplamente distribuídas, como *T. auroguttatus* (Sato et al., 2004) e *T. spegazzini* (Gonzo et al., 2000), cariótipos diferentes não foram encontrados nas diversas populações estudadas. Embora esta pareça ser uma regra geral, a presença de $2n=56$ cromossomos em *T. diabolus* (Torres et al. 2004) e *Trichomycterus* sp.2 (Kantek et al., 2006) parecem ser uma exceção.

Por outro lado, quando as espécies transandinas de *Trichomycterus* são analisadas é possível observar que todas apresentam cariótipos distintos. Assim, *T. areolatus* apresenta $2n=56$, *T. chiltoni* $2n=52$, *T. laucaensis* $2n=58$ e $2n=62$ e *Trichomycterus* sp. $2n=50$ (Arratia and Veloso, 1980; Arratia e Campos, 1997). O estudo filogenético realizado por Wosiacki (2002) mostrou que as espécies transandinas *T. areolatus* e *T. chiltoni* pertencem a um novo clado não nomeado, composto por essas espécies e por *Bullockia maldonadoi* ($2n=60$) e *Hatcheria macraei* ($2n=52$). Assim, a variabilidade cariotípica presentemente assinalada para o gênero

Trichomycterus é provavelmente uma característica cariotípica do clado não nomeado de Wosiacki (2002).

A espécie mais primitiva de Trichomycteridae cariotipada até o momento, *Trichogenes longipinnis* (Lima e Galetti Jr., 1990), apresenta $2n=54$ cromossomos e é encontrada em riachos costeiros do Sudeste do Brasil. Uma vez que o mesmo número diplóide é encontrado nas espécies cisandinas de *Trichomycterus* pode-se propor que essas espécies apresentem um número diplóide primitivo. No presente, as razões para a conservação desse número diplóide não podem ser explicadas (Sato et al., 2004). Estudos adicionais são necessários para se tentar elucidar essa questão e outras questões relacionadas à evolução cromossômica desse grupo.

Tabela 1: Dados citogenéticos disponíveis para a família Trichomycteridae.

Espécies	Localidade	n	2n	3n	Cariótipo	Referência
Dados disponíveis para a Família						
<i>Bullockia maldonadoi</i>			60		30M,SM	Arratia e Veloso (1980)
			60		46M,SM+14ST,T	Arratia e Campos (1997)
<i>Hatcheria macraei</i>			52		52M, SM,ST	Arratia e Veloso (1980)
<i>Hatcheria</i> sp.			52		30M,SM+22ST,T	Arratia e Campos (1997)
<i>Trichogenes longipinnis</i>	Ubatuba, São Paulo, Brasil		54		36M+12SM+6ST	Lima e Galetti Jr. (1990)
<i>Trichomycterus areolatus</i>			56		56M,SM	Arratia e Veloso (1980)
	Província de Osorno, 10ª região, Chile		54-56		44M+8SM+2ST	Colihueque et al. (2006)
<i>Trichomycterus auroguttatus</i>	Desterro de Melo, Santa Bárbara do Tugúrio, Caranaíba/Capela Nova, Minas Gerais, Brasil		54		42M+10SM+2ST	Sato et. al. (2004)
<i>Trichomycterus chiltoni</i>			52		44M,SM+8ST,T	Arratia e Campos (1997)
<i>Trichomycterus davisi</i>	Três Barras, Paraná, Brasil		54		40M+12SM+2ST	Borin e Martins-Santos (1999)
			54-56		40M+12SM+2ST	Borin e Martins-Santos (2000)
				81	60M+18SM+3ST	Borin et.al. (2002)
	Lapa, Paraná, Brasil		54		42M+10SM+2ST	Sato et. al. (2004)
<i>Trichomycterus diabolus</i>	Botucatu, São Paulo, Brasil		56		42M+12SM+2ST	Torres et. al. (2004)
<i>Trichomycterus florensis</i>	Santa Rita de Jacutinga, Minas Gerais, Brasil		54		42M+10SM+2ST	Sato et. al. (2004)
<i>Trichomycterus</i> sp. aff. <i>T. itatiayae</i>	Castrolândia, Paraná, Brasil		54		42M+10SM+2ST	Sato et. al. (2004)
<i>Trichomycterus laucaensis</i>			56-62		62M,SM,ST	Arratia e Veloso (1980)
			58		42M,SM+16ST,T	Arratia e Campos (1997)
<i>Trichomycterus paolence</i>	Botucatu, São Paulo, Brasil		54		44M+8SM+2ST	Torres et. al. (1998)
	Bofete, São Paulo, Brasil		54		40M+14SM	Torres et. al. (1998)
	Itatinga, São Paulo, Brasil		54		46M+6SM+2ST	Torres et. al. (1998)
	Itatinga, São Paulo, Brasil		54-57		46M+6SM+2ST	Torres et. al. (2002)
<i>Trichomycterus reinhardtii</i>	Barbacena, Minas Gerais, Brasil		54		42M+10SM+2ST	Sato et.al. (2004)
<i>Trichomycterus spegazzini</i>	Calchaquí, Argentina		54		42M+12M	Gonzo et. al. (2000)

<i>Trichomycterus stawiarski</i>	Três Barras, Paraná, Brasil	54	42M+8SM+4ST	Borin e Martins-Santos (1999)
<i>Trichomycterus</i> sp.		50	44M,SM+6ST	Arratia e Campos (1997)
<i>Trichomycterus</i> sp.	Três Barras, Paraná, Brasil	54	42M+10SM+2ST	Borin e Martins-Santos (1999)
<i>Trichomycterus</i> sp.1	Capitólio, Minas Gerais, Brasil	54	34M+18SM+2ST	Kantek et al. (2006)
<i>Trichomycterus</i> sp.2	Capitólio, Minas Gerais, Brasil	56	12M+30SM+14ST	Kantek et al. (2006)
<i>Vandellia cirrhosa</i>		32		Scheel (1973)
Dados apresentados na tese				
<i>Copionodon orthiocarinatus</i>	Mucugê, Bahia, Brasil	54	24M+18SM+12ST	Presente estudo
<i>Trichomycterus nigricans</i>	Jaraguá do Sul, Santa Catarina, Brasil	54	28M+14SM+12ST	Presente estudo
<i>Trichomycterus ihenringi</i>	Botucatu, São Paulo, Brasil	54	42M+10SM+2ST	Presente estudo
<i>Trichomycterus</i> sp.	Desterro de Melo, Minas Gerais, Brasil	54	42M+10SM+2ST	Presente estudo
<i>Trichomycterus</i> sp.	Caranaíba/Capela Nova, Minas Gerais, Brasil	54	42M+10SM+2ST	Presente estudo
<i>Trichomycterus</i> sp.1	Santa Bárbara do Tugúrio, Minas Gerais, Brasil	54	42M+10SM+2ST	Presente estudo
<i>Trichomycterus</i> sp.2	Santa Bárbara do Tugúrio, Minas Gerais, Brasil	54	42M+10SM+2ST	Presente estudo

2. OBJETIVOS

O presente trabalho se insere em um programa geral de estudo da superfamília Loricarioidea, em desenvolvimento no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, cujo objetivo principal é procurar ampliar o conhecimento sobre a diversidade e os padrões de relacionamento dentro desse grupo.

Tendo como hipóteses iniciais de trabalho as filogenias propostas por de Pinna (1998) e Wosiacki (2002) para a família Trichomycteridae, pretendeu-se:

1. Realizar a análise cariotípica de exemplares coletados e mantidos vivos, a fim de identificar suas particularidades cromossômicas e avaliar a ocorrência de variabilidade entre populações e/ou espécies.
2. Seqüenciar segmentos do DNA mitocondrial de representantes de subfamílias já descritas de Trichomycteridae e de alguns grupos externos significativos, com o propósito de obter dados suficientes para testar as hipóteses atualmente disponíveis de relacionamento entre as espécies.
3. Elaborar novas hipóteses de relacionamento inter-genéricos e inter-específicos para a família Trichomycteridae.

3. MATERIAIS

Para as análises citogenéticas foram utilizados exemplares de duas subfamílias: *Trichomycterus iheringi*, *T. nigricans*, *Trichomycterus* sp. (de Desterro de Melo-MG), *Trichomycterus* sp. (da divisa de Caranaíba e Capela Nova-MG), *Trichomycterus* sp.1 e *Trichomycterus* sp.2 (de Santa Bárbara do Tugúrio-MG) todas pertencente à subfamília Trichomycterinae e *Copionodon orthiocarinatus* pertencente à subfamília Copionodontinae. Sua posição taxonômica, localidade de coleta e o lote dos exemplares analisados são mostrados na Tabela 2.

Para as análises moleculares, foram utilizadas 31 espécies representando as subfamílias de Trichomycteridae com exceção de Tridentinae. Suas localidades de coleta e posição taxonômica estão relacionados na Tabela 3.

Após serem utilizados, os peixes foram enviados ao Museu de Zoologia da USP (MZUSP) para identificação das espécies pelo Dr. Mário C. C. de Pinna. Após a identificação, os peixes foram depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil. Alguns exemplares foram depositados na Coleção de Peixes do Museu de Zoologia da USP, São Paulo, São Paulo, Brasil.

Tabela 2. Espécies da família Trichomycteridae utilizadas nas análises citogenéticas.

Sufamília	Lote	Localidade	Latitude/Longitude
Copionodontinae			
<i>Copionodon orthiocarinatus</i>	1964	Mucugê, Bahia, Brasil	S 12°57'02.2" W 41°16'37.1"
Trichomycterinae			
<i>Trichomycterus nigricans</i>		Jaraguá do Sul, Santa Catarina, Brasil	
<i>Trichomycterus iheringi</i>	1296	Botucatu, São Paulo, Brasil	S 22°56'08" W 48°19'15"
<i>Trichomycterus</i> sp.	1013	Desterro de Melo, Minas Gerais, Brasil	S 21°08.947' W 43°23.973'
<i>Trichomycterus</i> sp.	1018	Caranaíba/Capela Nova, Minas Gerais, Brasil	S 20°58.171' W 43°42.331'
<i>Trichomycterus</i> sp.1	1011	Santa Bárbara do Tugúrio, Minas Gerais, Brasil	S 21°14.796' W 43°34.124'
<i>Trichomycterus</i> sp.2	1012	Santa Bárbara do Tugúrio, Minas Gerais, Brasil	S 21°14.796' W 43°34.124'

Tabela 3. Espécies da família Trichomycteridae utilizadas nas análises moleculares.

Espécie	Localidade	Município/ Estado
Subfamília Copionodontinae		
<i>Copionodon pecten</i>	Rio Piabas	Mucugê-BA
<i>Copionodon orthiocarinatus</i>		
Subfamília Glanapteryginae		
<i>Listrura pinguabae</i>	Afl. Rio da Fazenda	Ubatuba-SP
Subfamília Sarcoglanidinae		
<i>Stauroglanis gouldingi</i>	Rio Preto da Eva	Rio Preto da Eva-AM
Subfamília Stegophilinae		
<i>Henonemus punctatus</i>	Rio Acre	Rio Branco-AC
<i>Homodiaetus passarellii</i>	Rio Macacu	Itaboraí-RJ
<i>Pareiodon microps</i>	Rio Solimões	Manaus-AM
<i>Pseudostegophilus</i> sp.	Rio Graças	Barra do Garça-MT
Subfamília Vandelliinae		
<i>Paravandellia oxyptera</i>	Pantanal	Brasil
<i>Vandellia cirrhosa</i>	Rio Acre	Rio Branco-AC
<i>Vandellia sanguinea</i>	Rio Tacutu	Bonfim-RR
<i>Vandellia</i> sp.	Rio Graças	Barra do Garça-MT

Subfamília Trichogeninae

Trichogenes longipinnis Cachoeira do Amor Ubatuba-SP

Subfamília Trichomycterinae

Bullockia maldonadoi Rio La Laja Monte Aguila/VIII Region-Chile

Ituglanis amazonicus Córrego Fundo Barra do Garça-MT

Ituglanis sp. Córrego em direção a Piquete Itiquira-MT

Scleronema angustirostris Arroio dos Corrientes Pelotas-RS

Trichomycterus areolatus Rio Rehue/ Rio Biobio IXRegion/Quechereguas Traiguén- Chile

Trichomycterus auroguttatus Rio Xopotó Desterro de Melo-MG

Trichomycterus auroguttatus Rio Piranga Caranaíba e Capela Nova (divisa)-MG

Trichomycterus davisi Rio dos Patos Lapa-PR

Trichomycterus florensis Rio Corisco Parati-RJ

Trichomycterus hasemani Rio Quitauaú Boa Vista-RR

Trichomycterus iheringi Ribeirão Alambari Botucatu-SP

Trichomycterus aff. *T. itatiayae* Rio da Onça Castrolândia -PR

Trichomycterus nigricans Rio Itapucu Jaraguá do Sul-SC

Trichomycterus paolence Córrego da Quinta Itatinga-SP

Trichomycterus punctatus Rio Jequetepeque Magdalena/Cajamarca-Peru

Trichomycterus reinhardti Córrego do Sapateiro Barbacena-MG

Trichomycterus reinhardti Córrego Içara Capitólio-MG

Trichomycterus striatus Rio Llano Sucio Sta Rita Arriba/Colón-Panamá

Trichomycterus sp. Córrego Canta Galo Ipeuna-SP

Trichomycterus sp. Rio Marumbi Morretes-PR

4. MÉTODOS

4.1 Métodos citogenéticos

4.1.1 Estimulação de mitoses

Para obtenção de um maior número de mitoses, foi utilizada uma técnica de estimulação celular através da injeção de uma solução de fermento biológico, descrita inicialmente por Cole e Leavens (1971) para anfíbios e répteis, utilizada por Lee e Elder (1980) para pequenos mamíferos e por Oliveira et al. (1988) para peixes. O procedimento utilizado foi o seguinte:

- 1.** Preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção: 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada.
- 2.** Incubar a solução em banho-maria (40°C) por cerca de 20 minutos.
- 3.** Injetar a solução dorso-lateralmente no peixe na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal.
- 4.** Deixar o animal em aquário bem aerado por 48 ou 72 horas.

4.1.2 Preparação de cromossomos mitóticos

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos mitóticos foi a descrita por Foresti et al. (1993) que consiste em:

1. Injetar, intraperitonealmente, uma solução de colchicina 0,05 % na proporção de 1 ml para cada 100 g de peso do animal. Deixá-lo nadando livremente por 50 minutos.
2. Sacrificar o animal, retirando rins e brânquias.
3. Colocar os tecidos retirados em placa de Petri contendo cerca de 6 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M).
4. Dissociar o material, procurando obter uma suspensão de células. Para tal, primeiro deve-se dissociar o material com pinças de ponta fina e, depois, homogeneizar com auxílio de uma pipeta Pasteur.
5. Retirar a suspensão celular da placa de Petri e colocá-la em um tubo de centrífuga. Deixar o tubo no interior de uma estufa a 37°C por 20 minutos.
6. Retirar a suspensão celular da estufa, colocar 7 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente). Agitar levemente a mistura. Deixar em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente.
7. Adicionar mais cerca de 6 ml de fixador e novamente agitar a mistura. Levar à centrífuga (1000 ± 100 rpm) por 10 minutos.
8. Retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 6 ml de fixador. Centrifugar por 7 minutos a 1000 ± 100 rpm.
9. Repetir o item 8 por duas ou três vezes.
10. Pingar o material em lâminas colocadas sobre um suporte, no interior de um banho-maria a 60°C.

4.1.3 Coloração com Giemsa

Para coloração com Giemsa utilizou-se o seguinte procedimento:

1. Hidrolisar o material em HCl 1 N a 60°C por cerca de 3 minutos.

2. Corar com uma solução de Giemsa a 5 % em tampão fosfato (pH=6,7) por 10 minutos.

4.1.4 Localização das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs)

O procedimento utilizado seguiu a técnica descrita originalmente por Howell e Black (1981).

São utilizadas duas soluções:

Solução A: solução coloidal reveladora: 1 g de gelatina muito bem dissolvida em 50 ml de água deionizada. Acrescenta-se 0,5 ml de ácido fórmico.

Solução B: solução de Nitrato de Prata: 1 g de AgNO_3 dissolvida em 2 ml de água deionizada.

Essas soluções, depois de preparadas, devem ser mantidas em frascos escuros, a 4°C.

O procedimento para a coloração das NORs foi o seguinte:

- 1.** Hidrolisar o material por 3 minutos em HCl 1 N a 60°C.
- 2.** Secar as lâminas. Pingar uma gota da solução A e duas gotas da solução B sobre o material na lâmina: cobrir com lamínula.
- 3.** Deixar as lâminas sobre um suporte, no interior de um banho-maria a 60°C. Em alguns minutos (aproximadamente 3 minutos) a mistura das soluções se torna marrom dourada. Lava-se a lâmina em água deionizada e deixa-se secar.
- 4.** Corar com Giemsa na proporção de 1:30 em tampão fosfato (pH=6,7) por 30 segundos.

4.1.5 Medidas cromossômicas

Os cromossomos tiveram sua morfologia estabelecida de acordo com a relação de braços (RB), segundo as proporções propostas por Levan et al. (1964), e foram classificados em: metacêntricos (RB de 1,00 a 1,70), submetacêntricos (RB de 1,71 a 3,00), subtelocêntrico (RB de 3,01 a 7,00) e acrocêntricos (RB maior que 7,00).

4.1.6 Montagem dos cariótipos

Feitas as medidas cromossômicas e estabelecido o número de cromossomos metacêntricos (M), submetacêntricos (SM), subtelocêntricos (ST) e acrocêntricos (A), os cromossomos foram arranjados segundo o tipo (M, SM, ST e A) e em ordem decrescente de tamanho.

4.2 Métodos Moleculares

4.2.1 Isolamento do DNA genômico

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de diferentes tecidos, utilizando-se o protocolo descrito em (Aljanabi e Martinez, 1997).

- 1.** Colocar em um tubo de microcentrífuga (1,5 ml): 290 µl de tampão de extração (descrito abaixo), 10 µl de proteinase K (10 mg/ml) e um pedaço de tecido (equivalente a um grão de arroz).

2. Colocar em banho-maria a 55°C por 2-3 horas.
3. Adicionar 100 µl de NaCl 5 M e inverter o tubo de microcentrífuga vagarosamente para misturar o material.
4. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente.
5. Remover 300 µl de sobrenadante e transferir para um novo tubo de microcentrífuga (1,5 ml).
6. Adicionar 600 µl de etanol 100 % gelado.
7. Deixar no freezer -70°C por 20 minutos.
8. Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos a 4°C.
9. Remover o sobrenadante.
10. Secar a 37°C por 30 minutos ou até ficar completamente seco.
11. Adicionar 200 µl de água milli-Q autoclavada.
12. Deixar hidratando a temperatura ambiente por 24 horas.
13. Aliquotar 150 µl para guardar no freezer -20° (solução estoque) e o restante manter na geladeira 4°C (solução de uso).

Tampão de extração (1 litro):

30 mM Tris-HCl

10 mM EDTA

1 % SDS

4.2.2 Amplificação e limpeza dos fragmentos

Foram utilizadas diferentes metodologias para amplificar o genoma mitocondrial. Uma amplificação para longos fragmentos (long PCR) e uma para segmentos específicos do genoma mitocondrial (short PCR e amplificação para genes específicos). Os primers utilizados (Tabela 4) foram utilizados em diferentes combinações dependendo do resultado desejado.

Tabela 4. Primers utilizados nas reações de amplificação.

Especificação	Seqüência do primer 5'-3'
H885-12S	TAACCGCGGYGGCTGGCACGA
H1065-12S	GGCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTGT
H1358-12S	CGCCTGTTTACCAAAAACAT
H2010-VAL	CCAATTTGCATGGATGTCTTCTCGG
H2590-16S	ACAAGTGATTGCGCTACCTT
H2990-16SH	TGCACCATTRGGATGTCCTGATCCAACATC
H3084-16S	AGATAGAAACTGACCTGGAT
H4129-ND1	CGGAABC GG GGTAKGARGC
H5334-ND2M	CGKAGRTAGAAGTAKAGGCT
H6855-COI	AGTCAGCTGAAKACTTTTAC
H7271-COI	GTGGTGGGCTCATACAATAAA
H7892-CO2	TCGTAGCTTCAGTATCATTG
H8131-CO2	CCTAGTTGTGAGGGATGTGCC
H8420-CO2	TCATTGATGTCCTATRGCTTT
H10019-GLY	CAAGACKGKGTGATTGGAAG
H10677-ND4	AGGGCWAGGCCKGCGCTWGCTTC
H11534-ND4	GCKAGGAYAATAAAKGGGTA
H12293-LEU	TTGCACCAAGAGTTTTTGGTTCCTAAGACC
H13396-ND5M	CCTATTTTKCGGATGTCYTG
H14718-GLU	TTTTTGTAGTTGAATWACAACGGT
H15560-CB	TAGGCRAATAGGAARTATCA
H15913-THR	CCGGTSTTCGGMTTACAAGACCG
H16500-CR	GCCCTGAAATAGGAACCAGA
L941-PHE	AAATCAAAGCATAACACTGAAGATG
L1083-12S	ACAAACTGGGATTAGATAC
L2508-16S	CTCGGCAAACATAAGCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC
L2510-16S	CGCCTGTTTACCAAAAACAT
L2949-16s	AGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATC
L3074-16S	CGATTAAGTCCTACGTGATCTGAGTTCAG
L3686-ND1	TGAGCMTCWAATTCMAAATA
L5261-ND2	CWGGTTTTCRTRCCWAAATGA
L5698-ASN	AGGCCTCGATCCTACAAAGKTTTAGTTAAC
L6730-COI	TATATAGGAATRGTMGTAGC
L7103-COI	CTGATTCTTTGGGCACCCAGAAG
L7467-SER	GAGAAAGGRAGGAATTGAACC
L8329-LYS	AGCGTTGGCCTTTTAAGC
L8598-ATP	TCCTGARRCTGACCATG
L9500-CO3	CACACVCCHCCYGTCCAAAA
L10267-ND3	TTTGAYCTAGAAATYGC
L11424-ND4	TGACTTCCWAAAGCCCATGTAGA
L12321-LEU	GGTCTTAGGAACCAAAAACCTTGGTGCAA
L12329-LEU	CTCTTGGTGCAAMTCCAAGT
L13280-ND5	CAACTWGGKCTAATAATAGT
L14504-ND6	GCCAAWGCTGCWGAATAMGCAAA
L14736-GLU	AACCACCGTTGTTATTCAACTA
L15172-CB	TGAGGACAAATATCNTTYTGAGG
L15927-THR	AGAGCGTCGGTCTTGTAACKCG
L16517-CR	CATCTGGTTCCTATTTTCAGG

Long PCR:

Para amplificar o genoma mitocondrial foram utilizados de 4 a 8 pares de primers combinados para gerar fragmentos que abrangessem toda a extensão do DNA mitocondrial.

Foram realizadas reações de PCR com um volume final de 20 µl, contendo: 7,0 µl de água destilada, 4,0 µl de dNTP (4mM), 2,0 µl de 10x "PCR Buffer" (Takara), 2,0 µl de MgCl₂, 1,0 µl de cada primer, 3,0 de amostra de DNA (cerca de 200 ng) e 0,25 µl de *LATaq* (Takara).

A reação de PCR seguiu os seguintes parâmetros: uma denaturação inicial de 94° C por 1 minuto seguida por outra a 98° C por 10 segundos, anelamento dos primers e extensão combinados a 68° C por 16 minutos. O ciclo a partir da segunda denaturação foi repetido por 30 vezes e ainda possuiu uma extensão final a 72° C por 10 minutos. A reação foi realizada num termociclador 96-Well GeneAmp®PCR System 9700 da Applied Biosystem.

Short PCR:

Para amplificar segmentos curtos do genoma mitocondrial foram utilizadas diversas combinações dos primers listados na tabela 4. As reações possuíam um volume final de 14,25 µl, contendo: 8,4375 µl de água destilada, 1,25 µl de dNTP (4mM), 1,5 µl de "PCR Buffer" (Takara), 1,0 µl de cada primer, 1,0 µl de *ExTaq* (Takara) e 1,0 µl de amostra de Long PCR.

A reação seguiu os seguintes parâmetros: uma denaturação inicial a 94° C por 2 minutos seguida por uma denaturação a 96° C por 15 segundos, hibridação dos primers a 53° C por 15 segundos e extensão a 72° C por 90 segundos. A partir da segunda denaturação, o ciclo foi repetido 30 vezes. A reação foi realizada no mesmo equipamento utilizado no Long PCR.

Amplificação de genes específicos:

Para amplificar as regiões do DNA mitocondrial estudadas, foram realizadas reações de PCR com um volume final de 25 µl, contendo: 15,7 µl de água destilada estéril, 1,5 µl de dNTP (8 mM), 2,5 µl de 10x "PCR Buffer" (Biotools), 0,8 µl de cada primer (10 µM), 0,5 µl de MgCl₂, 0,2 µl de *Taq* Polimerase (1 u) (Biotools DNA Polimerase) e 3,0 µl de amostra de DNA (cerca de 200 ng).

A reação de PCR seguiu os seguintes parâmetros: uma de denaturação inicial a 95°C por 1 minuto, hibridação a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Esse ciclo foi repetido 30 vezes e o passo final incluiu uma extensão final por 2 minutos a 72°C. A reação de PCR foi realizada num termociclador MJ Research, INC, modelo PTC-100™ Programmable Thermal Controller.

Limpeza dos fragmentos amplificados:

Os produtos foram aplicados em um gel de agarose 1%, posteriormente corados com uma solução de brometo de etídio (0,5 µl/ml) e visualizados em um transluminador de luz ultravioleta, verificando a qualidade e tamanho dos fragmentos amplificados.

Os produtos da reação de PCR foram purificados segundo o protocolo: PEG precipitation of PCR products, utilizado por Travis Glenn (disponível no endereço: http://www.uga.edu/srel/DNA_Lab/PEG_Precip'00.rtf).

A quantificação foi realizada através da comparação do produto de PCR em gel de agarose 1% com o do *ladder* "Low DNA Mass" que possui massa molecular conhecida.

Limpeza de produtos de PCR utilizando PEG –polietileno glicol- (reação de 25µl)

1. Adicionar 25 µl de PEG 20%-NaCl 2,5 M ao produto de PCR amplificado.
2. Misturar com a pipeta várias vezes.
3. Colocar a 37°C em estufa ou termociclador por 15 minutos.
4. Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente.
5. Sugar o sobrenadante.
6. Adicionar 63 µl de álcool etílico 80% gelado e esperar 2 minutos.
7. Centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente.
8. Sugar o sobrenadante.
9. Adicionar 63 µl de álcool etílico 80% gelado e esperar 2 minutos.
10. Centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente.
11. Sugar o sobrenadante.
12. Secar em estufa a 37°C por cerca de 10 minutos.
13. Eluir em TE adicionando 12,5 µl e aguardar pelo menos 30 minutos antes de utilizar o produto limpo.

4.2.3 Reação de Seqüenciamento e limpeza

Os produtos purificados (5 µl) foram utilizados como molde para as reações de seqüenciamento (9 µl) usando o kit da Amershan Bioscience, DYEnamic Terminator (2 µl de buffer tampão e 2 µl de pré-mix), junto com 2 µl de um dos primers (3 µM) utilizados na reação de PCR.

A reação de seqüenciamento seguiu os seguintes parâmetros: um ciclo inicial a 95°C por 2 minutos e 20 ciclos com 95°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 2 minutos. A reação foi realizada no mesmo termociclador utilizado na reação de amplificação.

As seqüências foram determinadas num seqüenciador automático ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Perking-Elmer).

Limpeza dos fragmentos marcados:

1. Adicionar 1,0 µl de acetato de sódio/EDTA 0,8 M a cada tudo.
2. Adicionar 80 µl de etanol 95% para cada reação e misturar bem utilizando o vórtex.
3. Centrifugar à temperatura ambiente por 15 minutos a 14000 rpm
4. Remover o sobrenadante por aspiração.
5. Adicionar 150 µl de etanol 70%.
6. Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm
7. Remover o sobrenadante por aspiração
8. Deixar secar no escuro a 37°C por 1 hora.

4.2.4 Alinhamento das seqüências e análise filogenética

As seqüências foram alinhadas usando o programa ClustalW (Thompson et. al., 1997) implementado no programa DAMBE versão 4.0.65 (Xia e Xie, 2001) e BIOEDIT (Hall, 1999).

A variação e o padrão de substituição de nucleotídeos e a distância genética foram examinadas utilizando-se o programa MEGA 3.0 (Kumar et al., 2004). As análises filogenéticas baseadas em máxima parcimônia (MP) foram realizadas com o Programa PAUP* versão beta 4.0b10 (Swofford, 2002).

As filogenias obtidas foram testadas utilizando o método de *bootstrap* (Felsenstein, 1985). As análises de máxima verossimilhança foram realizadas com o programa PhyML 2.4.4 (Guindon et al., 2005).

As árvores de consenso foram produzidas com o programa TreeExplorer implementado no programa MEGA 3.0 (Kumar et al.,

2004). As análises filogenéticas dos dados moleculares seguiram as recomendações de Swofford et al. (1996) e Nei e Kumar (2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos nas análises citogenética e moleculares resultaram em três artigos científicos que estão apresentados na forma de capítulos.

Capítulo 1- Análise citogenética de *Copionodon orthiocarinatus* e seis espécies de *Trichomycterus* (Siluriformes, Trichomycteridae). Este artigo será submetido à revista *Genetics and Molecular Biology*, tendo sido escrito de acordo com as normas da mesma.

Capítulo 2- Filogenia molecular da família Trichomycteridae (Ostariophysi, Siluriformes).

Capítulo 3- Hipótese de relacionamento entre as subfamílias de Trichomycteridae com base em longas seqüências de DNA mitocondrial.

Capítulo 1

Análise citogenética de *Copionodon orthiocarinatus* e seis espécies de *Trichomycterus* (Siluriformes: Trichomycteridae)

Cytogenetic analysis of *Copionodon orthiocarinatus* and six *Trichomycterus* species (Siluriformes: Trichomycteridae)

Introduction

Trichomycteridae is a family known as pencil or parasitic catfishes. They are small-sized catfish which are widely distributed throughout Southern Central America and South America (Wosiacki, 2002). This family has 218 described species, distributed between 44 genera. (FishBase, 09/05/2007: www.fishbase.org). Trichomycteridae is currently divided into eight subfamilies: Copionodontinae, Trichogeninae, Trichomycterinae, Sarcoglanidinae, Glanapteryginae, Tridentinae, Stegophilinae, Vandelliinae, and Pareiodontinae. The latter is included in Stegophilinae by some authors (e.g., Baskin, 1973).

All of those subfamilies are demonstrably monophyletic, except for the Trichomycterinae. The majority of species are comprised in the genus *Trichomycterus* that includes about 100 species (de Pinna and Wosiacki, 2003). However, according to Mário C. C. de Pinna (personal communication) a large number of new species are yet to be described in this genus. The Trichomycterinae is the largest and most complex of subfamilies. The only attempt so far at resolving relationships among Trichomycterinae in details was Wosiacki (2002). As expected, the members of the family are arranged in a highly asymmetrical topology, forming a succession of sister groups to the Tridentinae, Sarcoglanidinae, Vandelliinae, Glanapteryginae, Stegophilinae clade,

above the Trichogeninae/Copionodontinae level (de Pinna and Wosiacki 2003).

The Copionodontinae is a relatively recent discovery. The subfamily, its two genera (*Copionodon* and *Glaphyropoma*) and three species (*C. orthiocarinatus*, *C. pecten* and *G. rodriguesi*) were described as new in a single publication (de Pinna, 1992). Since then, only a fourth species was described: *C. lianae* (Campanario & de Pinna, 2000). All Copionodontinae come from the Mucujê River basin, part of the Paraguaçu River drainage, Brazil, which opens directly into the Atlantic Ocean.

This subfamily is of special interest in a number of aspects. It is hypothesized as the sister group to all other trichomycterids. In contrast to most other trichomycterids, copionodontines (or at least *Copionodon pecten*, which has been observed in the nature and in aquaria) lack cryptic behavior, and swim continuously over the substrate. Even during evasive action, they do not attempt to hide under rocks (de Pinna and Wosiacki, 2003).

Only a few cytogenetic studies of the family Trichomycteridae have been conducted, in spite of the large number of species and the wide distribution of this family (Table 1). The diploid chromosome number ranges from $2n=50$ in a *Trichomycterus* species to expected $2n=64$ ($n=32$) in *Vandellia cirrhosa* (Table 1), although most species of this family have $2n=54$ chromosomes (Table 1).

In this paper, we described the karyotypes of one *Copionodon* and six *Trichomycterus* species and discussed the evolution of chromosomes in the family Trichomycteridae.

Table 1: Cytogenetic data available for Trichomycteridae.

Species	Locality (Municipality/State)	n	2n	3n	Karyotype	Reference
Data from studies conducted by other workers						
<i>Bullockia maldonadoi</i>			50 to 53		30M,SM	Arratia and Veloso (1980)
<i>Hatcheria macraei</i>			60		46M,SM+14ST,T	Arratia and Campos (1997)
			52		52M, SM,ST	Arratia and Veloso (1980)
<i>Trichogenes longipinnis</i>	Ubatuba, São Paulo, Brazil		52		30M,SM+22ST,T	Arratia and Campos (1997)
<i>Trichomycterus areolatus</i>			54		36M+12SM+6ST	Lima and Galetti Jr. (1990)
			56		56M,SM	Arratia and Campos (1997))
<i>Trichomycterus auroguttatus</i>	Province of Osorno, 10 th Region, Chile		54to56		44M+8SM+2ST	Colihueque et al. (2006)
	Desterro de Melo, Santa Bárbara do Tugúrio, Caranaíba/Capela Nova, Minas Gerais, Brazil		54		42M+10SM+2ST	Sato et al. (2004)
<i>Trichomycterus chiltoni</i>			52		44M,SM+8ST,T	Arratia and Campos (1997)
<i>Trichomycterus davisi</i>	Três Barras, Paraná, Brazil		54		40M+12SM+2ST	Borin and Martins-Santos (1999)
			54 to 56		40M+12SM+2ST	Borin and Martins-Santos (2000)
				81	60M+18SM+3ST	Borin et al. (2002)
<i>Trichomycterus diabolus</i>	Lapa, Paraná, Brazil		54		42M+10SM+2ST	Sato et al. (2004)
<i>Trichomycterus florensis</i>	Botucatu, São Paulo, Brazil		56		42M+12SM+2ST	Torres et al. (2004)
	Santa Rita de Jacutinga, Minas Gerais, Brazil		54		42M+10SM+2ST	Sato et al. (2004)
<i>Trichomycterus</i> sp. aff. <i>T. itatiayae</i>	Castrolândia, Paraná, Brazil		54		42M+10SM+2ST	Sato et al. (2004)
<i>Trichomycterus laucaensis</i>			56 to 62		62M,SM,ST	Arratia and Veloso (1980)
			58		42M,SM+16ST,T	Arratia and Campos (1997)
<i>Trichomycterus paolence</i>	Botucatu, São Paulo, Brazil		54		44M+8SM+2ST	Torres et al. (1998)
	Bofete, São Paulo, Brazil		54		40M+14SM	Torres et al. (1998)
	Itatinga, São Paulo, Brazil		54		46M+6SM+2ST	Torres et al. (1998)
	Itatinga, São Paulo, Brazil		54 to 57		46M+6SM+2ST	Torres et al. (2002)
<i>Trichomycterus reinhardti</i>	Barbacena, Minas Gerais, Brazil		54		42M+10SM+2ST	Sato et al. (2004)
<i>Trichomycterus spegazzini</i>	Calchaquí, Arenales and Mojotoro rivers,		54		42M+12M	Gonzo et al. (2000)

<i>Trichomycterus stawiarski</i>	Argentina Três Barras, Paraná, Brazil	54	42M+8SM+4ST	Borin and Martins-Santos (1999)
<i>Trichomycterus</i> sp.		50	44M,SM+6ST,T	Arratia and Campos (1997)
<i>Trichomycterus</i> sp.	Três Barras, Paraná, Brazil	54	42M+10SM+2ST	Borin and Martins-Santos (1999)
<i>Trichomycterus</i> sp.1	Capitólio, Minas Gerais, Brazil	54	34M+18SM+2ST	Kantek et al. (2006)
<i>Trichomycterus</i> sp.2	Capitólio, Minas Gerais, Brazil	56	12M+30SM+14ST	Kantek et al. (2006)
<i>Vandellia cirrhosa</i>		32		Scheel (1973)
Data from the present study				
<i>Copionodon orthiocarinatus</i>	Mucugê, Bahia, Brazil	54	24M+18SM+12ST	present study
<i>Trichomycterus nigricans</i>	Jaraguá do Sul, Santa Catarina, Brazil	54	28M+14SM+12ST	present study
<i>Trichomycterus iheringi</i>	Botucatu, São Paulo, Brazil	54	42M+10SM+2ST	present study
<i>Trichomycterus</i> sp.	Desterro de Melo, Minas Gerais, Brazil	54	42M+10SM+2ST	present study
<i>Trichomycterus</i> sp.	Caranaíba/Capela Nova, Minas Gerais, Brazil	54	42M+10SM+2ST	present study
<i>Trichomycterus</i> sp.1	Santa Bárbara do Tugúrio, Minas Gerais, Brazil	54	42M+10SM+2ST	present study
<i>Trichomycterus</i> sp.2	Santa Bárbara do Tugúrio, Minas Gerais, Brazil	54	42M+10SM+2ST	present study

Materials and Methods

Six *Copionodon orthiocarinatus* (5 females and 1 unsexed) from Piabas River, Mucugê, Bahia, Brazil, eight *Trichomycterus nigricans* (2 female, 1 male, and 5 unsexed) from Itapucu River, Jaraguá do Sul, Santa Catarina, Brazil, six *Trichomycterus iheringi* (unsexed) from Alambari River, Botucatu, São Paulo Brazil, one *Trichomycterus* sp. from Xopotó River, Desterro de Melo, Minas Gerais, Brazil, 5 *Trichomycterus* sp. from Piranga River, between Caranaíba and Capela Nova, Minas Gerais, Brazil, 3 *Trichomycterus* sp.1 (1 female, 1 unsexed and 1 male) and 3 *Trichomycterus* sp.2 (1 female and 2 unsexed) from Piranga River, Santa Bárbara do Tugúrio, Minas Gerais, Brazil were analyzed. Fishes were identified and kept in the fish collection of Laboratório de Biologia de Peixes (LBP), Instituto de Biociências, Universidade Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Chromosome preparations and staining techniques, including silver-staining for the nucleolus organizer regions (NORs), were carried out according to Foresti et al. (1993). Chromosome morphology was determined based on arm ratio as proposed by Levan et al. (1964) and chromosomes were classified as metacentric (M), submetacentric (SM) or subtelocentric (ST).

Results and Discussion

All species analyzed in the present study exhibited $2n=54$ chromosomes. *Copionodon orthiocarinatus* presented 24 metacentric, 18 submetacentric and 12 subtelocentric chromosomes. *Trichomycterus nigricans* exhibited 28 metacentric, 14 submetacentric and 12 subtelocentric chromosomes. *Trichomycterus iheringi* presented 42 metacentric, 10 submetacentric and 2 subtelocentric chromosomes (Figure 1).

The others *Trichomycterus*: *Trichomycterus* sp. (from Desterro de Melo and Caranaíba/Capela Nova), *Trichomycterus* sp.1 and *Trichomycterus* sp.2 (from Santa Bárbara do Tugúrio) exhibited the same karyotypic formulae, 42 metacentric, 10 submetacentric and 2 subtelocentric chromosomes. Numeric polymorphisms, such as those described for *Trichomycterus paolence* (Torres et al., 2002), *T. davisii* (Borin and Martins-Santos, 2000), and *T. areolatus* (Colihueque et al., 2006) were not detected in the species studied.

Karyotypic analysis of the *C. orthiocarinatus*, *T. iheringi*, *Trichomycterus* sp. (from Caranaíba-Capela Nova), *Trichomycterus* sp.1 and *Trichomycterus* sp.2 showed that the first metacentric pair was considerably larger than the second metacentric (Figures 1 and 2). This characteristic was observed in two cytotypes of *T. paolence* (Torres et al., 1998), *T. reinhardti* and *T. auroguttatus* (Sato et al., 2004)

We identified NORs in a single chromosome pair in two species. The first submetacentric pair in *T. iheringi* on the pericentromeric position of long arm. In *C. orthiocarinatus*, this region was identified in the second subtelocentric pair on the pericentromeric position of the short arm (Figure 1). In all of Trichomycteridae studied until now, no one presented NOR in subtelocentric chromosomes except *C. orthiocarinatus*.

Almost all *Trichomycterus* sp. we observed a secondary constriction in one pair of submetacentric chromosome (pair 23 or 24) next to centromeric position on a short arm, as well as, *Trichomycterus reinhardti*, *T. auroguttatus* (Sato et al. 2004) and *T. spegazzini* (Gonzo et al. 2000). Available data show that simple NOR seems to be a characteristic of the group and that during speciation process the nucleolus organizing chromosome seems to have undergone structural rearrangements that allowed its displacement.

A review of the literature indicates that a great number of species of the genus *Trichomycterus* have a diploid number equal to $2n=54$ chromosomes. However, species with a different number have also been observed (Arratia and Veloso, 1980; Torres et al., 2004). In the Trichomycteridae family the number of chromosomes varies from $2n=50$ in *Trichomycterus* sp. to $2n=64$ in *Vandellia cirrhosa* (Table 1). Besides intergeneric and interspecific karyotypic variations observed in the family (Table 1), interpopulation variation in *T. paolence* (Torres et al., 1998), intraindividual polymorphism have been reported in *T. davisii* (Borin and Martins-Santos, 2000) and *T. paolence* (Torres et al., 2002) and a natural triploid in *T. davisii* (Borin et al., 2002) have been observed in the genus *Trichomycterus*.

Until now, all cis-Andean species of *Trichomycterus* karyotyped presented $2n=54$ chromosomes while all the trans-Andean species presented different diploid number (Sato et al. 2004). Thus, the presence of $2n=56$ chromosomes in *T. diabolus* (Torres et al. 2004) and *Trichomycterus* sp.2 (Kantek et al, 2006) is an exception for the general rule.

Furthermore, *Copionodon* is the most primitive genus and shows $2n=54$ chromosomes, as well as, *Trichogenes longipinnis*. According to de Pinna (1998) and Wosiacki (2002), Trichogeninae and Copionodontinae represent a dicotomy beside the others Trichomycteridae (based on morphologic data).

Arratia and Campos (1997) reported to *Netamotogenys* (Nematogenyidae) a karyotype with $2n=94$ chromosomes. This family is the sister group of Trichomycteridae (de Pinna, 1998). Thus, $2n=54$ chromosomes may be the ancestral diploid number for Trichomycteridae and it seems that few changes occurred in *Vandellia* and some *Trichomycterus*.

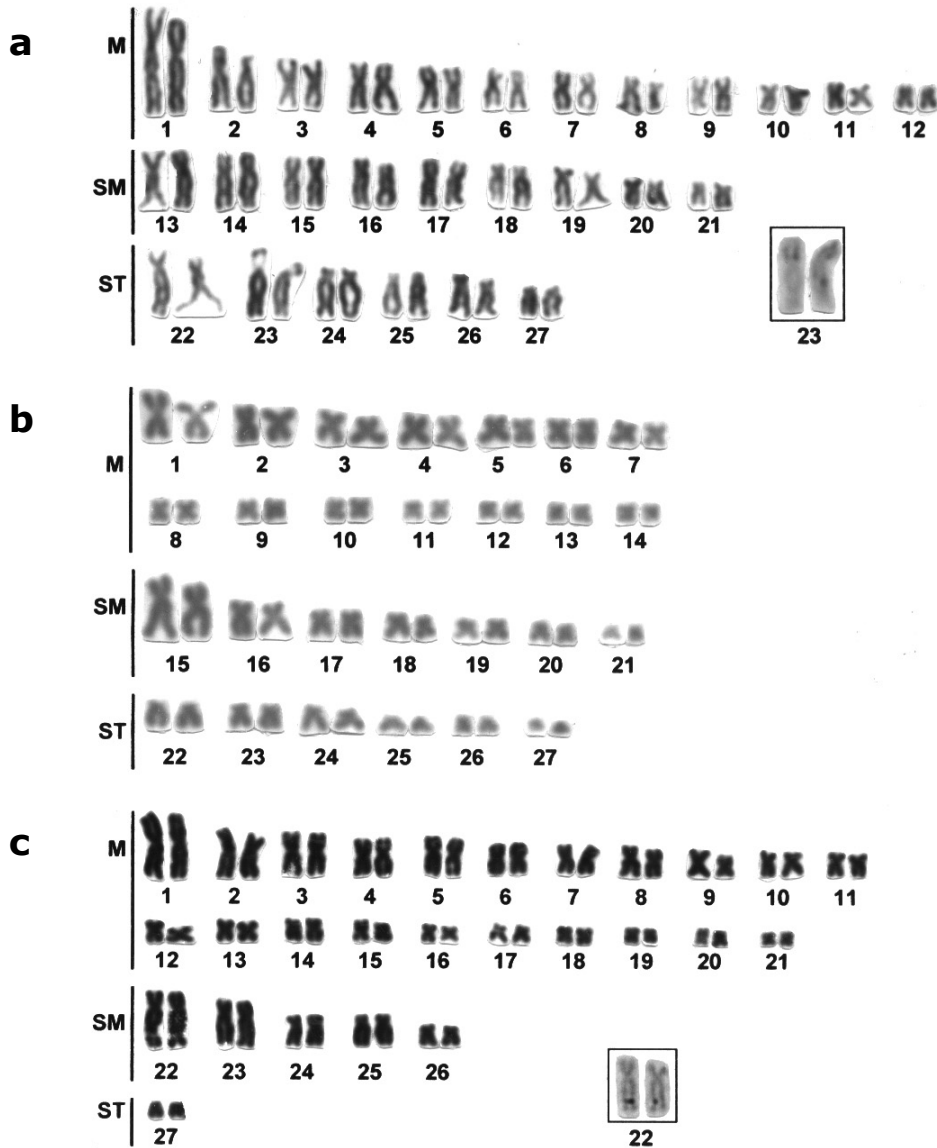


Figure 1: Karyotypes of: a) *Copionodon orthiocarinatus*; b) *Trichomycterus nigricans*; c) *Trichomycterus iheringi*. The NOR-bearing chromosome pairs are shown in the insets.



Figure 2: Karyotypes of: a) *Trichomycterus* sp. from Desterro de Melo; b) *Trichomycterus* sp. from Caranaíba-Capela Nova.

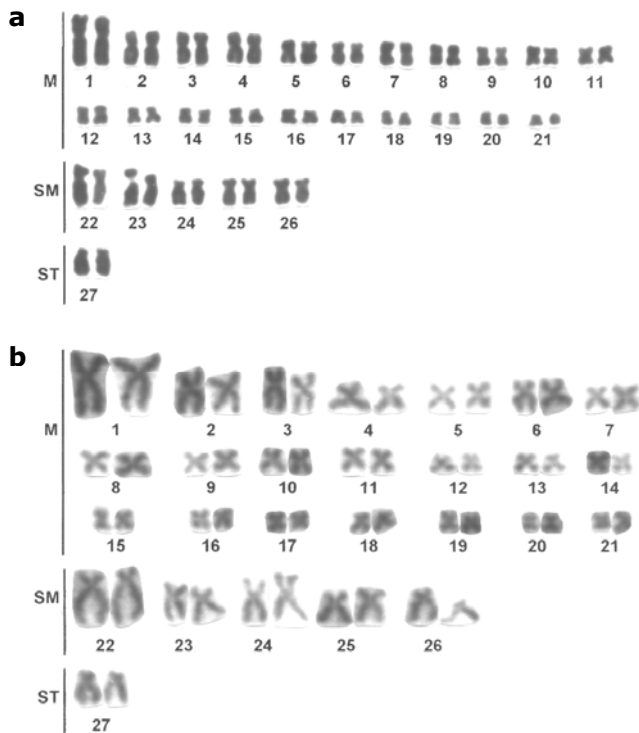


Figure 3: Karyotype of: a) *Trichomycterus* sp.1; b) *Trichomycterus* sp.2 from Santa Bárbara do Tugúrio

Capítulo 2

Filogenia molecular da família Trichomycteridae (Ostariophysi, Siluriformes) baseada em dados moleculares.

Introdução

Trichomycteridae é uma família de pequenos bagres que estão amplamente distribuídos ao longo da América do Sul e Central (Wosiacki, 2002). Esta família apresenta 218 espécies descritas, distribuídas em 44 gêneros. (FishBase, 09/05/2007: www.fishbase.org). Os Trichomycteridae estão atualmente divididos em oito subfamílias: Copionodontinae, Trichogeninae, Trichomycterinae, Sarcoglanidinae, Glanapteryginae, Tridentinae, Stegophilinae, Vandelliinae, e Pareiodontinae. O último está incluso em Stegophilinae por alguns autores (ex., Baskin, 1973, de Pinna, 1998).

Todas as subfamílias são consideradas monofiléticas, exceto Trichomycterinae. A maioria das espécies pertence ao gênero *Trichomycterus* que incluem cerca de 100 espécies (de Pinna and Wosiacki, 2003). Contudo, de acordo com Mário C. C. de Pinna (comunicação pessoal) um grande número de novas espécies ainda não foi descrita dentro do gênero. A subfamília Trichomycterinae é a maior e mais complexa da família. A única tentativa de estabelecer o relacionamento detalhado dentro de Trichomycterinae foi proposta por Wosiacki (2002).

Como esperado, os membros da família estão arranjados em uma topologia assimétrica, formando uma sucessão de grupos irmãos ao clado Tridentinae, Sarcoglanidinae, Vandelliinae, Glanapteryginae e Stegophilinae, sendo grupos basais Trichogeninae/Copionodontinae (de Pinna and Wosiacki 2003).

O objetivo deste trabalho é elaborar uma hipótese filogenética baseada em dados moleculares e comparar com a filogenia proposta por dados morfológicos para estabelecer relações entre as diferentes abordagens.

Material e métodos

Foram analisadas 28 espécies representando 6 das 8 subfamílias de Trichomycteridae (Tabela 2). O DNA foi extraído a partir dos exemplares da coleção de tecidos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da UNESP- Botucatu.

Os primers para amplificar segmentos dos genes mitocondriais da citocromo oxidase I e 12S rRNA, assim como as suas seqüências, estão descritos na Tabela 1 e 2 respectivamente.

Tabela 1: Relação dos primers utilizados.

Gene amplificado	Nome	Seqüência do primer
Citocromo oxidase I	L5698-ASN	5'- AGG CCT CGA TCC TAC AAA GKT TTA GTT AAC -3'
	H7271-COI	5'- GTG GTG GGC TCA TAC AAT AAA -3'
	L7103-COI	5'- CTG ATT CTT TGG GCA CCC AGA AG -3'
	H8131-COII	5'- CCT AGT TGT GAG GGA TGT GCC -3'
	H8420-COII	5'- TCA TTG ATG TCC TAT RGC TTT -3'
12S rRNA	L941-PHE	5'- AAA TCA AAG CAT AAC ACT GAA GAT G -3'
	H2010-VAL	5'- CCA ATT TGC ATG GAT GTC TTC TCG G -3'

*Primers desenhados de acordo com o seu final 3' correspondente ao genoma mitocondrial humano (Anderson et al., 1981). L e H significam cadeias leves e longas respectivamente. Posições com bases mistas são baseadas em seus códons IUB.

Tabela 2: Exemplos utilizados nas análises

Espécie	Localidade	Município/ Estado
Subfamília Copionodontinae		
<i>Copionodon pecten</i>	Rio Piabas	Mucugê-BA
<i>Copionodon orthiocarinatus</i>		
Subfamília Glanapteryginae		
<i>Listrura pinguabae</i>	Afl. Rio da Fazenda	Ubatuba-SP
Subfamília Sarcoglanidinae		
<i>Stauroglanis gouldingi</i>	Rio Preto da Eva	Rio Preto da Eva-AM
Subfamília Stegophilinae		
<i>Henonemus punctatus</i>	Rio Acre	Rio Branco-AC
<i>Pareiodon microps</i>	Rio Solimões	Manaus-AM
<i>Pseudostegophilus</i> sp.	Rio Graças	Barra do Garça-MT
Subfamília Vandelliinae		
<i>Paravandellia oxyptera</i>	Pantanal	Brasil
<i>Vandellia cirrhosa</i>	Rio Acre	Rio Branco-AC
<i>Vandellia sanguinea</i>	Rio Tacutu	Bonfim-RR
<i>Vandellia</i> sp.	Rio Graças	Barra do Garça-MT
Subfamília Trichomycterinae		
<i>Ituglanis amazonicus</i>	Córrego Fundo	Barra do Garça-MT
<i>Ituglanis</i> sp.	Córrego em direção a Piquete	Itiquira-MT
<i>Scleronema angustirostris</i>	Arroio dos Corrientes	Pelotas-RS
<i>Trichomycterus areolatus</i>	Rio Rehue/ Rio Biobio	IXRegion/Quechereguas Traiguén- Chile
<i>Trichomycterus auroguttatus</i>	Rio Xopotó	Desterro de Melo-MG
<i>Trichomycterus auroguttatus</i>	Rio Piranga	Caranaíba e Capela Nova (divisa)-MG
<i>Trichomycterus davisi</i>	Rio dos Patos	Lapa-PR
<i>Trichomycterus florensis</i>	Rio Corisco	Parati-RJ
<i>Trichomycterus hasemani</i>	Rio Quitauá	Boa Vista-RR
<i>Trichomycterus iheringi</i>	Ribeirão Alambari	Botucatu-SP
<i>Trichomycterus</i> aff. <i>T. itatiayae</i>	Rio da Onça	Castrolândia –PR
<i>Trichomycterus nigricans</i>	Rio Itapucu	Jaraguá do Sul-SC
<i>Trichomycterus paolence</i>	Córrego da Quinta	Itatinga-SP
<i>Trichomycterus punctatus</i>	Rio Jequetepeque	Magdalena/Cajamarca-Peru
<i>Trichomycterus reinhardti</i>	Córrego do Sapateiro	Barbacena-MG
<i>Trichomycterus reinhardti</i>	Córrego Içara	Capitólio-MG
<i>Trichomycterus striatus</i>	Rio Llano Sucio	Sta Rita Arriba/Colón- Panamá
<i>Trichomycterus</i> sp.	Córrego Canta Galo	Ipeuna-SP
<i>Trichomycterus</i> sp.	Rio Marumbi	Morretes-PR

A reação de amplificação utilizou: 15,7 µl de água destilada estéril, 1,5 µl de dNTP (8 mM), 2,5 µl de 10x "PCR Buffer" (Biotools), 0,8 µl de cada primer (10 µM), 0,5 µl de MgCl₂, 0,2 µl de *Taq* Polimerase (1 u) (Biotools DNA Polimerase) e 3,0 µl de amostra de DNA (cerca de 200 ng) num volume final de 25,0 µl. A reação de PCR seguiu os seguintes parâmetros: uma de denaturação inicial a 95°C por 1 minuto, hibridação a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Esse ciclo foi repetido 30 vezes e o passo final incluiu uma extensão final por 2 minutos a 72°C.

A reação de seqüenciamento, assim como a limpeza dos fragmentos foi realizada segundo o protocolo do kit utilizado (Amershan Bioscience, DYEnamic Terminator).

As seqüências brutas foram analisadas e foram elaboradas seqüências consenso das diferentes espécies, apresentadas na Tabela 2.

As seqüências foram alinhadas com o programa Dambe 4.2.13 e analisadas com o programa MEGA 3.0. A confiabilidade dos nós internos foi testada pelo método de bootstrap utilizando 1000 réplicas. Para a elaboração das filogenias foram usadas duas metodologias, por máxima parcimônia (pelo PAUP 4.0b) e por Máxima Verossimilhança (método probabilístico com o programa PhyML 2.4.4 (Guindon et al., 2005).

Resultados:

Os resultados foram divididos em dois grupos: filogenia baseada no segmento do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) e filogenia baseada no segmento do gene mitocondrial ribossomal 12S.

Filogenia baseada no gene mitocondrial citocromo oxidase I

Na filogenia elaborada com base no segmento do gene COI foram utilizadas seqüências de treze exemplares de *Trichomycterus*, 2 *Ituglanis*, (Trichomycteridae), 1 *Listrura* (Glanapteryginae), 1 *Stauroglanis* (Sarcoglanidinae), 1 *Pseudostegophilus*, 1 *Henonemus*, 1 *Pareiodon* (Stegophilinae), 3 *Vandellia*, 1 *Paravandellia* (Vandelliinae) e 2 *Copionodon* (Copionodontinae) utilizados como grupo externo.

Os segmentos variaram de 916 pb em *Ituglanis amazonicus*, *T. davisi*, *T. paolence*, *T. nigricans*, *T. aff. itatiayae*, *T. reinhardti* e *T. auroguttatus* a 593 pb em *Paravandellia oxyptera*, as seqüências analisadas são compostas em média por 28,5% de timina, 27,1% de citosina, 24,9% de adenina e 19,5% de guanina. O alinhamento final resultou em uma matriz de 916 pb, sendo que destes 478 são sítios conservados, 438 são variáveis e 320 são sítios informativos do ponto de vista filogenético. A taxa de transição foi de 29 e transversão 22.

Para elaborar hipóteses filogenéticas para este gene, foi empregado o método de máxima parcimônia (MP) (Figura 1) e máxima verossimilhança (ML) (Figura 2). As análises de MP resultaram em uma árvore, com 1423 passos, índice de consistência de 0,48 (IC) e índice de retenção de 0,54 (IR).

Tanto a análise por MP, como a por ML apresentaram resultados semelhantes.

Stauroglanis gouldingi (Sarcoglanidinae) na análise por MP apareceu como grupo irmão de todos os Trichomycteridae com exceção de Copionodontinae. Na análise por ML ele apareceu como grupo irmão de Stegophilinae (Figuras 1 e 2).

Trichomycterus hasemani aparece como grupo irmão das subfamílias Vandelliinae (MP) e Stegophilinae+Vandelliinae+Sarcoglanidinae (ML).

Pareiodon microps apareceu como membro da subfamília Stegophilinae nas duas análises.

Tanto na análise por MP como na por ML, *T. areolatus* é grupo irmão dos *Trichomycterus* cisandinos e este clado tem como grupo irmão *T. striatus*.

Com a exclusão de *T. hasemani*, a subfamília Trichomycterinae forma um grupo monofilético, tendo o gênero *Ituglanis* como grupo basal.

Filogenia baseada no gene mitocondrial rRNA 12 S

Para a elaboração da hipótese filogenética baseada no segmento do gene mitocondrial rRNA 12S, foram utilizadas dezesseis exemplares de *Trichomycterus*, 3 *Ituglanis* e 1 *Scleronema* (Trichomycterinae), 1 *Listrura* (Glanapteryriinae), 2 de *Vandellia* (Vandelliinae), 1 *Henonemus*, 1 *Pseudostegophilus* e 1 *Homodiaetus* (Stegophilinae), 1 *Stauroglanis* (Sarcoglanidinae) e 5 *Copionodon* (Copionodontinae) como grupo externo.

Os segmentos variaram de 601 pb em *T. auroguttatus*, *T. nigricans* e *Ituglanis amazonicus* a 553 pb em *T. paolence* nas seqüências analisadas, sendo compostas em média por 20,2% de timina, 28,6% de citosina, 31,1% de adenina e 20,2% de guanina. O alinhamento final resultou em uma matriz de 604 pb, sendo que destes 316 são sítios conservados, 288 são informativos e 198 são sítios informativos do ponto de vista filogenético. A taxa de transição foi de 15 e transversão de 14.

Para elaborar hipóteses filogenéticas para este gene, foi empregado o método de MP (Figura 3) e ML (Figura 4). As análises por MP resultaram em 52 árvores igualmente parcimoniosas, com 710 passos, IC = 0,54 e IR = 0,63.

Pelas análises por MP e por ML as espécies de Vandelliinae formaram um grupo monofilético ao contrário de Stegophilinae que está

num clado polifilético composto também *S. angustirostris* (Trichomycterinae).

Na análise de MP, os Trichomycterinae também formam um grupo polifilético juntamente com *L. picinguabae* (Glanapteryginae) tendo *Ituglanis* como grupo irmão dos *Trichomycterus* + *L. picinguabae*. O resultado por ML apresentou os Trichomycterinae como um grupo parafilético (com a não inclusão de *Scleronema*), irmão de *L. picinguabae*, sendo esta a grande diferença entre as duas hipóteses filogenéticas.

Discussão

Comparando as árvores baseadas nos dois genes e pelas duas metodologias apresentaram resultados bem semelhantes, confirmando o monofiletismo de algumas subfamílias e gêneros.

A subfamília Vandelliinae é monofilética de acordo com os dois tipos de análises (MP e ML) e os dois genes utilizados, o que vem a corroborar a hipótese de Wosiacki 2002.

Ituglanis, assim como nos dados morfológicos (Wosiacki, 2002) apresenta-se monofilético e na presente análise aparece como grupo irmão de todos os outros *Trichomycterus*, com exceção de *T. hasemani* que apareceu mais relacionado à subfamília Vandelliinae e Stegophilinae assim como nos dados apresentados por Wosiacki (2002).

A espécie *Stauroglanis gouldingi* (Sarcoglanidinae) aparece como grupo irmão dos Stegophilinae (exceto na análise por MP do gene COI), o que difere da filogenia disponível baseada em dados morfológicos (Wosiacki, 2002). Nas filogenias baseadas em dados moleculares, as subfamílias Sarcoglanidinae (*S. gouldingi*) e Glanapteryginae (*L. picinguabae*) não aparecem estritamente relacionadas como na hipótese de Wosiacki (2002).

Na análise com gene 12S rRNA, *T. striatus*, que é uma espécie do Panamá, está estritamente relacionada com as outras espécies transandinas: *T. areolatus* do Chile e *T. punctulatus* do Peru. De acordo com a hipótese de Wosiacki (2002) esta espécie pertenceria a uma nova subfamília monoespecífica e espécie-irmã de um grande grupo mais inclusivo de Trichomycteridae que compõe o "clado 17" do cladograma consenso. As espécies colombianas, peruanas, venezuelanas e do sul da América Central foram também listadas próximas, por Eigenmann (1918), seguindo sua idéia da distribuição geográfica e possível "relacionamento".

Com a exclusão de *T. hasemani* e *Scleronema*, tanto a subfamília Trichomycterinae, assim como o gênero *Trichomycterus* seriam grupos monofiléticos de acordo com os dados moleculares apresentados. O monofiletismo destes dois grupos também não foi verificado nas análises de dados morfológicos (Wosiacki, 2002).

De acordo com Wosiacki(2002), *T. hasemani* e *T. johnsoni* formariam um grupo monofilético, irmão de Tridentinae, Stegophilinae e Vandelliinae e estariam alocados numa nova subfamília e gênero o que é sustentado na análise do COI por MP e ML.

Como o gênero *Trichomycterus* representa quase metade dos indivíduos da família, uma análise mais detalhada dentro do gênero é necessária para um melhor entendimento de suas relações.

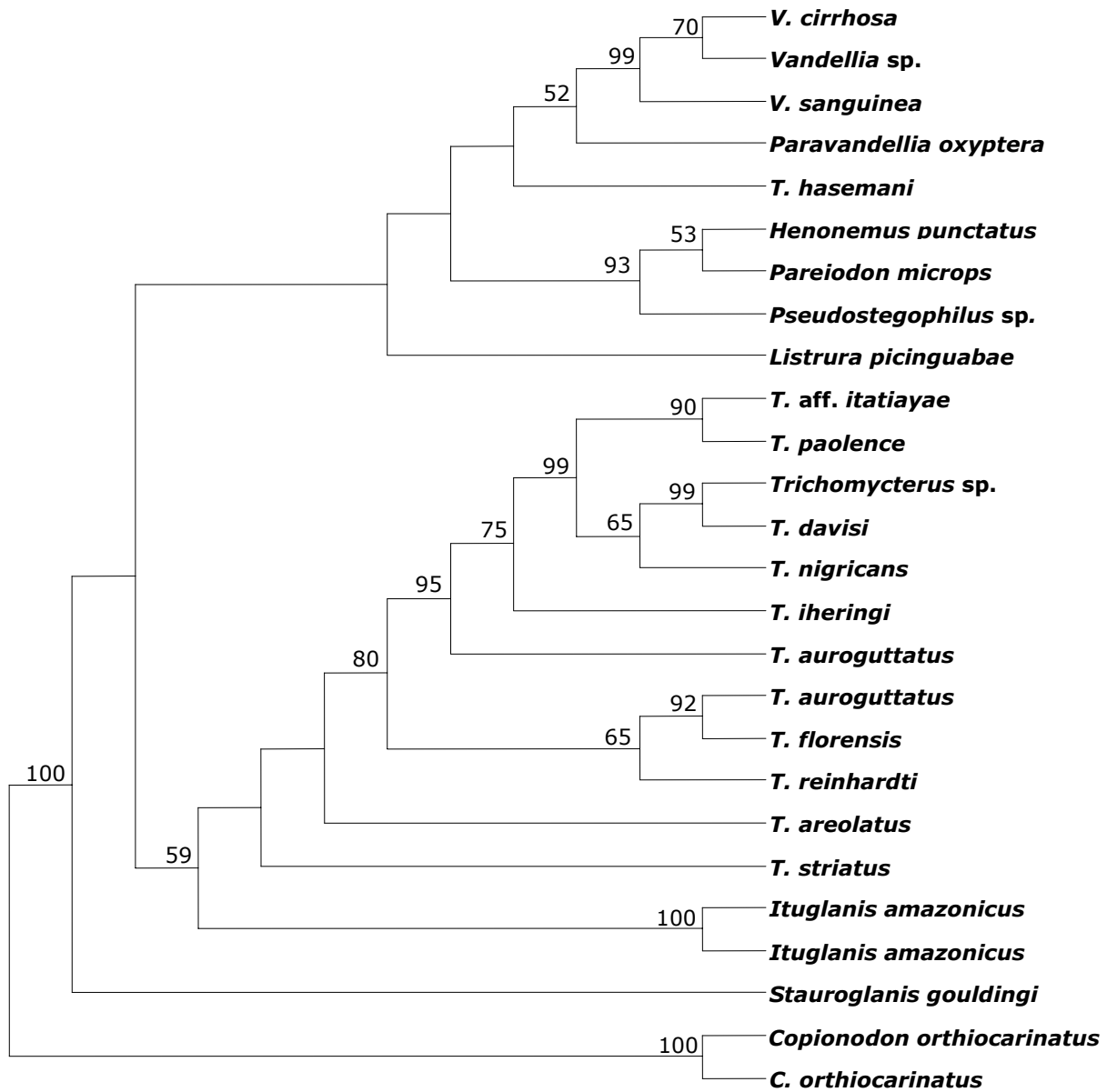


Figura 1: Filogenia baseada no gene COI para a família Trichomycteridae pelo método de máxima parcimônia. Os valores nos nós correspondem aos valores de bootstrap obtidos na análise de 1000 réplicas.

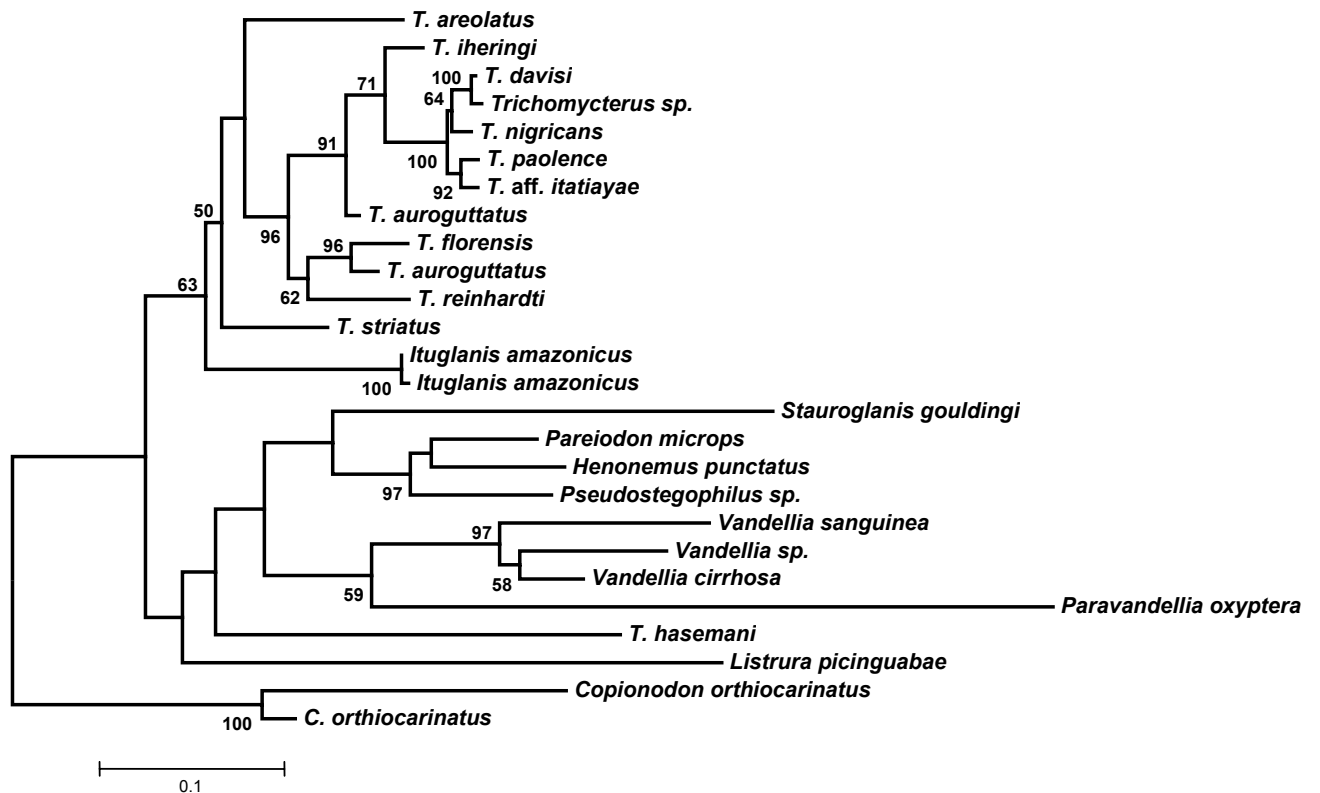


Figura 2: Filogenia baseada no gene COI para a família Trichomycteridae pelo método de Máxima Verossimilhança. Os valores nos nós correspondem aos valores de bootstrap obtidos na análise de 100 réplicas.

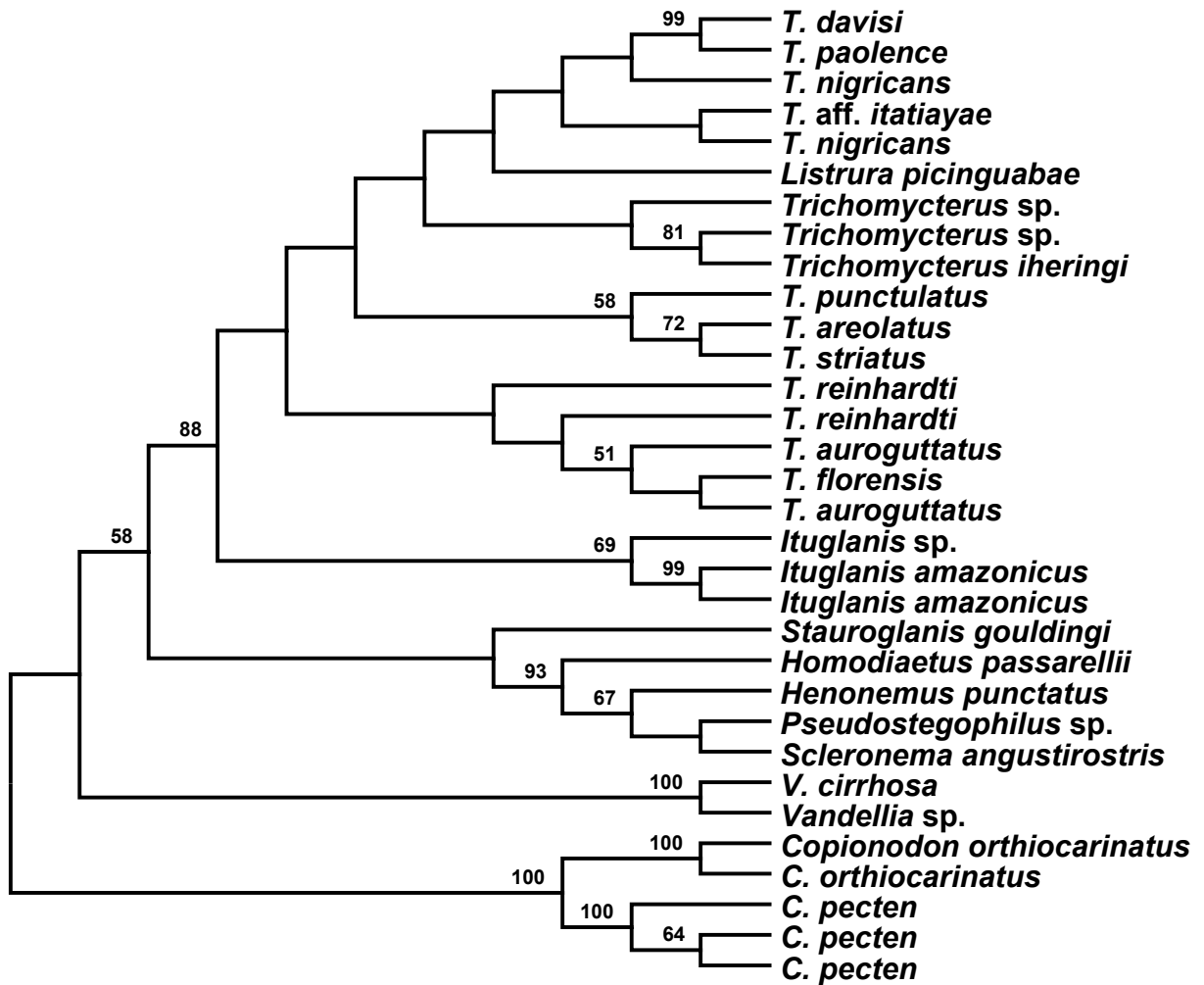


Figura 3: Filogenia baseada no gene 12S rRNA para a família Trichomycteridae pelo método de máxima parcimônia. Os valores nos nós correspondem aos valores de bootstrap obtidos na análise de 1000 réplicas.

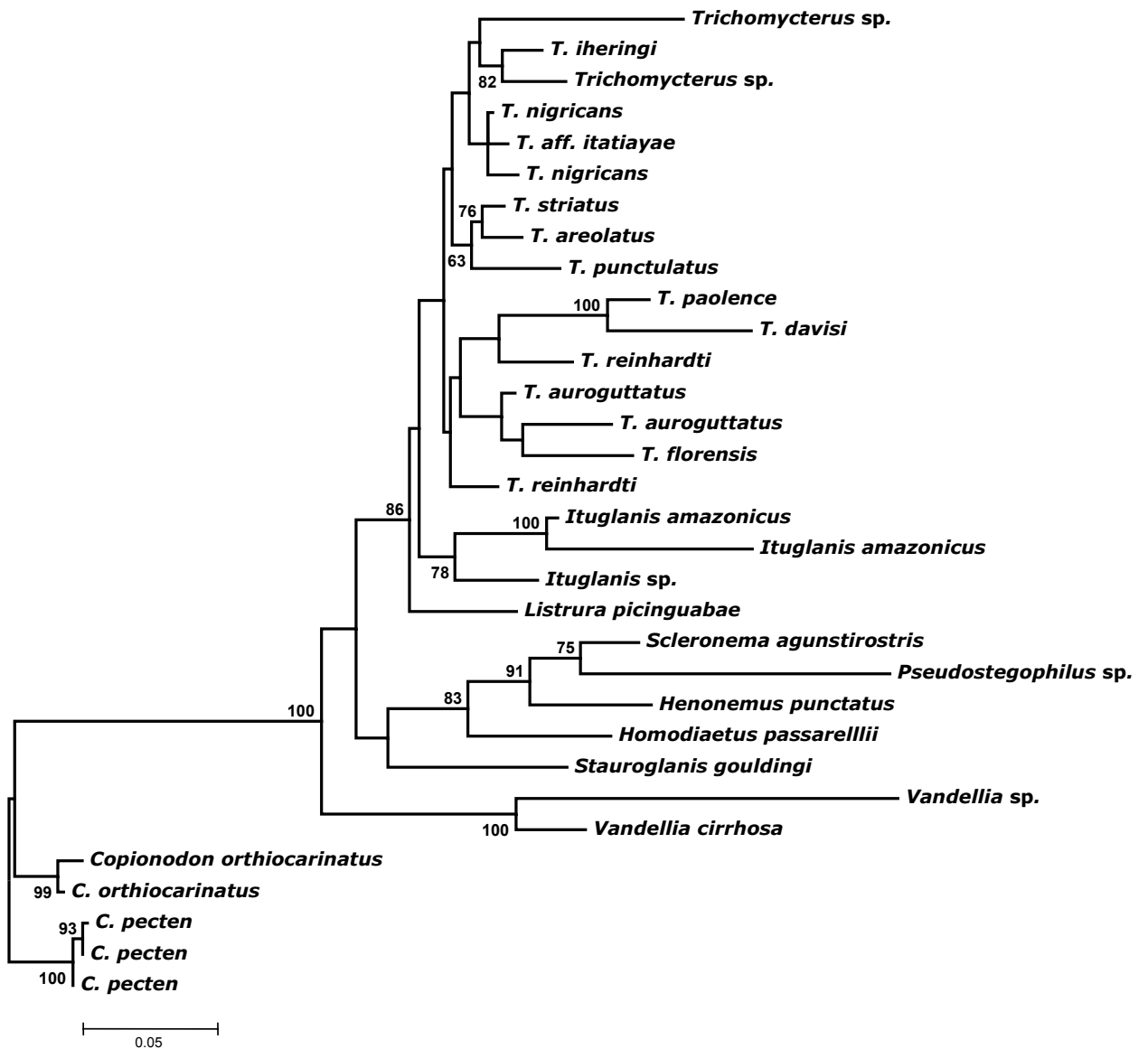


Figura 4: Filogenia baseada no gene 12S rRNA para a família Trichomycteridae pelo método de Máxima Verossimilhança. Os valores nos nós correspondem aos valores de bootstrap obtidos na análise de 100 réplicas.

Capítulo 3.

Hipótese de relacionamento entre as subfamílias de Trichomycteridae com base em longas seqüências de DNA mitocondrial

Introdução

Recentemente, vários grupos de pesquisa têm voltado sua atenção para o uso de seqüências de DNA para elucidação das relações filogenéticas entre grupos de organismos. Os resultados mais satisfatórios têm sido aqueles obtidos com a análise de seqüências completas do DNA mitocondrial (Miya et al., 2000; Miya et al., 2001; Miya et al., 2003; Ishiguro et al., 2003; Saitoh et al., 2003; Inoue et al., 2003a; Inoue et al., 2003b; Inoue et al., 2004; Lavoué et al., 2005, Saitoh et al.2006). Por outro lado, no conjunto de trabalhos publicados no livro editado por Kocher e Stepien (1997), pode-se observar o versátil emprego das análises moleculares na elaboração de hipóteses de relacionamento em diversos níveis taxonômicos, variando de populações locais até o grupo dos peixes como um todo.

Desde a publicação da seqüência completa do genoma mitocondrial (mitogenoma) humano (Anderson et al., 1981), tais seqüências tem sido determinadas para muitos vertebrados (744 espécies em maio de 2007; National Center for Biotechnology Information[NCBI]:www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ORGANELLES/7742.html). A maior parte destes vertebrados compartilham uma ordem idêntica dos genes, embora exceções tenham sido encontradas em vertebrados superiores, tal como em anfíbios (Macey et al., 1997; Sumida et al., 2001; Yoneyama, 1987), répteis (Kumazawa e Nishida, 1995; Macey et al., 1997; Quinn e Mindell, 1996), aves (Bensch e Harlid, 2000; Desjardins e Morais, 1990, 1991; Mindell et al., 1998), marsupiais (Janke et al., 1994; Pääbo et al.,1991) e peixes (Inoue et

al.,2001, 2003; Lee e Kocher,1995; Mabuchi et al.,2004; Miya e Nishida, 1999; Miya et al., 2001, 2003, 2005).

O tamanho do genoma mitocondrial (mtDNA) é bastante variável, apresentando valores em torno de 16 quilobases (kb) nos vertebrados até 570 kb em algumas espécies de plantas (Lewin, 1994). Estudos extensivos realizados com o genoma mitocondrial humano mostraram que o mesmo é constituído por 16.569 pares de base, sendo que nesse genoma encontram-se os genes 12S e 16S do rRNA, 22 genes de tRNA, as subunidades I, II e III do citocromo *c*, a subunidade 6 da ATPase, o citocromo *b* e genes para seis subunidades da NADH. Essa mesma constituição foi também encontrada em outros mamíferos, em *Xenopus laevis* (Lewin, 1994) e em várias espécies de peixes (Zardoya e Meyer, 1997; Inoue et al., 2001; Miya et al., 2003).

O interesse no estudo do mtDNA está baseado no fato de que esse genoma apresenta uma série de particularidades importantes como sua herança na maioria materna e sua presença nos organismos em número haplóide, o que impede (ou torna muito raros) os eventos de recombinação. Além disso, considerando que as condições nas organelas são diferentes daquelas encontradas no núcleo das células, as taxas de evolução dos genes em cada compartimento celular são independentes. Por exemplo, a taxa em que o mtDNA humano acumula mutações foi estimada em 2-4% por milhão de anos, o que representa uma taxa mais que dez vezes superior àquela observada para a globina, um gene nuclear (Lewin, 1994).

A família Trichomycteridae, com cerca de 200 espécies conhecidas e numerosas formas ainda não descritas, está dividida em oito subfamílias: Copionodontinae, Glanapteryginae, Sarcoglanidinae, Stegophilinae (incluindo Pareiodontinae), Trichogeninae, Trichomycterinae, Tridentinae e Vandelliinae, de acordo com de Pinna (1998).

Recentemente Wosiacki (2002) estudando 205 caracteres morfológicos de 74 espécies de Trichomycteridae propõe a criação de 14 novos gêneros e 14 novas subfamílias para uma correta organização das espécies. No estudo citado foi confirmado o polifiletismo de Trichomycterinae, já apontado por outros autores, como de Pinna (1998).

Dados moleculares poderão auxiliar um melhor entendimento das relações entre as subfamílias de Trichomycteridae e a destas com outros grupos da super família Loricarioidea, assim como testar hipóteses de relacionamento construídas com base em outros caracteres como os caracteres morfológicos.

Materiais e Métodos

Foram utilizadas 14 espécies da família Trichomycteridae, as espécies e seus respectivos locais de coleta estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Exemplares utilizados e locais coletados

Espécie	Localidade	Município/ Estado
Subfamília Copionodontinae		
<i>Copionodon pecten</i>	Rio Piabas	Mucugê-BA
<i>Copionodon orthiocarinatus</i>		
Subfamília Glanapteryginae		
<i>Listrura picinguabae</i>	Afl. Rio da Fazenda	Ubatuba-SP
Subfamília Sarcoglanidinae		
<i>Stauroglanis gouldingi</i>	Rio Preto da Eva	Rio Preto da Eva-AM
Subfamília Stegophilinae		
<i>Homodiaetus passarellii</i>	Rio Macacu	Itaboraí-RJ
Subfamília Vandelliinae		
<i>Paravandellia oxyptera</i>	Pantanal	Brasil

Subfamília Trichogeninae

Trichogenes longipinnis Cachoeira do Amor Ubatuba-SP

Subfamília Trichomycterinae

Bullockia maldonadoi Rio La Laja Monte Aguila/VIII Region-
Chile
Ituglanis amazonicus Córrego Fundo Barra do Garça-MT
Scleronema angustirostris Arroio dos Corrientes Pelotas-RS
Trichomycterus areolatus Rio Rehue/ Rio Biobio IXRegion/Quechereguas
Traiguén- Chile
Trichomycterus nigricans Rio Itapucu Jaraguá do Sul-SC
Trichomycterus striatus Rio Llano Sucio Sta Rita Arriba/Colón-
Panamá

Para a extração de DNA foi utilizado o kit da BioRad segundo o protocolo que acompanha o kit. Para amplificar o DNA mitocondrial foram utilizados os primers listados na Tabela 2 e os genes codificadores de proteínas e rRNA assim como os tRNA utilizados nas análises estão listados nas Tabelas 3 e 4 respectivamente. Foram realizados dois tipo de amplificação, uma para longos trechos de DNA (Long PCR) e outras amplificações mais curtas (Short PCR) com diferentes combinações de primers.

Tabela 2: Primers utilizados para amplificar o DNA mitocondrial

PRIMERS	Seqüência do primer
H885-12S	TAACCGCGGYGGCTGGCACGA
H1065-12S	GGCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTGT
H1358-12S	CGCCTGTTTACCAAAAACAT
H2590-16S	ACAAGTGATTGCGCTACCTT
H2990-16SH	TGCACCATTRGGATGTCCTGATCCAACATC
H3084-16S	AGATAGAAACTGACCTGGAT
H4129-ND1	CGGAABCAGGGGTAKGARGC
H5334-ND2M	CGKAGRTAGAAGTAKAGGCT
H6855-COI	AGTCAGCTGAAKACTTTTAC
H7892-CO2	TCGTAGCTTCAGTATCATTG
H10019-GLY	CAAGACKGKGTGATTGGAAG
H10677-ND4	AGGGCWAGGCKGCGCTWGCTTC
H11534-ND4	GCKAGGAYAATAAAKGGGTA
H12293-LEU	TTGCACCAAGAGTTTTTGGTTCCTAAGACC
H13396-ND5M	CCTATTTTKCGGATGTCYTG

H14718-GLU	TTTTTGTAGTTGAATWACAACGGT
H15560-CB	TAGGCRAATAGGAARTATCA
H15913-THR	CCGGTSTTCGGMTTACAAGACCG
H16500-CR	GCCCTGAAATAGGAACCAGA
L1083-12S	ACAAACTGGGATTAGATAC
L2508-16S	CTCGGCAAACATAAGCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC
L2510-16S	CGCCTGTTTACCAAAAACAT
L2949-16s	AGTTACCCTGGGGATAACAGCGCAATC
L3074-16S	CGATTAAAGTCCTACGTGATCTGAGTTCAG
L3686-ND1	TGAGCMTCWAATTCMAAATA
L5261-ND2	CWGGTTTCRTRCCWAAATGA
L6730-COI	TATATAGGAATRGTMGTGAGC
L7467-SER	GAGAAAGGRAGGAATTGAACC
L8329-LYS	AGCGTTGGCCTTTTAAGC
L8598-ATP	TCCTGARRCTGACCATG
L9500-CO3	CACACVCCHCCYGTCCAAAA
L10267-ND3	TTTGAYCTAGAAATYGC
L11424-ND4	TGACTTCCWAAAGCCCATGTAGA
L12321-LEU	GGTCTTAGGAACCAAAAACCTTTGGTGCAA
L12329-LEU	CTCTTGGTGCAAMTCCAAGT
L13280-ND5	CAACTWGGKCTAATAATAGT
L14504-ND6	GCCAAWGCTGCWGAATAMGCAA
L14736-GLU	AACCACCGTTGTTATTCAACTA
L15172-CB	TGAGGACAAATATCNTTYTGAGG
L15927-THR	AGAGCGTCGGTCTTGTAACCCG
L16517-CR	CATCTGGTTCCTATTTTCAGG

*Primers desenhados de acordo com o seu final 3' correspondente ao genoma mitocondrial humano (Anderson et al., 1981). L e H significam cadeias leves e longas respectivamente. Posições com bases mistas são baseadas em seus códons IUB.

Tabela 3: Genes codificadores de proteínas e rRNA utilizados em cada espécie

	ATP6	ATP8	COI	CO2	CO3	CR	CytB	ND1	ND3	ND4	ND4L	12S	16S
Trichogeninae													
<i>Trichogenes longipinnis</i>	X	X		X				X	X	X	X		
Copionodontinae													
<i>Copionodon orthiocarinatus</i>	X	X	X	X	X		X					X	X
<i>Copionodon pecten</i>	X	X		X	X	X	X		X			X	X
Sarcoglanidinae													
<i>Stauroglanis gouldingi</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Stegophilinae													
<i>Homodiaetus passarellii</i>	X	X		X		X	X	X	X		X	X	X
Glanapteryginae													
<i>Listrura pinguabae</i>	X	X		X	X		X		X		X	X	X
Vandelliinae													
<i>Paravandellia oxyptera</i>	X	X		X	X				X	X	X		
Trichomycterinae													
<i>Scleronema angustirostris</i>	X	X		X	X							X	
<i>Ituglanis amazonicus</i>	X	X	X		X		X		X			X	X
<i>Bullockia maldonadoi</i>	X	X		X	X			X					
<i>Trichomycterus areolatus</i>	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	
<i>Trichomycterus nigricans</i>	X	X		X	X		X		X			X	
<i>Trichomycterus striatus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X

Tabela 4: tRNAs utilizados para cada espécie nas análises.

	Ala	Arg	Asn	Asp	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Ser-Agy	Trp	Tyr	Val
Trichogeninae																			
<i>Trichogenes longipinnis</i>		X			X		X	X	X	X	X	X			X	X			
Copionodontinae																			
<i>Copionodon orthiocarinatus</i>	X		X	X		X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X
<i>Copionodon pecten</i>		X		X		X	X	X		X	X		X	X		X			X
Sarcoglanidinae																			
<i>Stauroglanis gouldingi</i>	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Stegophilinae																			
<i>Homodiaetus passarellii</i>	X	X	X	X			X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
Glanapteryginae																			
<i>Listrura pinguabae</i>	X	X	X	X			X	X		X	X		X	X				X	X
Vandelliinae																			
<i>Paravandellia oxyptera</i>		X		X			X	X	X		X		X	X		X	X	X	
Trichomycterinae																			
<i>Scleronema angustirostris</i>				X		X				X	X		X		X				X
<i>Ituglanis amazonicus</i>	X	X	X			X	X	X		X			X	X	X	X	X	X	X
<i>Bullockia maldonadoi</i>				X	X			X	X	X	X	X							
<i>Trichomycterus areolatus</i>		X		X		X	X	X			X	X	X						X
<i>Trichomycterus nigricans</i>	X	X		X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X			X
<i>Trichomycterus striatus</i>	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X

Para amplificar o genoma mitocondrial foram utilizados de 4 a 8 pares de primers combinados para gerar fragmentos que abrangessem toda a extensão do DNA mitocondrial.

Foram realizadas reações de PCR com um volume final de 20 µl, contendo: 7,0 µl de água destilada, 4,0 µl de dNTP (4mM), 2,0 µl de 10x "PCR Buffer" (Takara), 2,0 µl de MgCl₂, 1,0 µl de cada primer, 3,0 de amostra de DNA (cerca de 200 ng) e 0,25 µl de LA*Taq* (Takara).

A reação de PCR seguiu os seguintes parâmetros: uma denaturação inicial de 94° C por 1 minuto seguida por outra a 98° C por 10 segundos, anelamento dos primers e extensão combinados a 68° C por 16 minutos. O ciclo a partir da segunda denaturação foi repetido por 30 vezes e ainda possuiu uma extensão final a 72° C por 10 minutos

Para amplificar segmentos curtos do genoma mitocondrial foram utilizadas diversas combinações dos primers listados na tabela 2. As reações possuíam um volume final de 14,25 µl, contendo: 8,4375 µl de água destilada, 1,25 µl de dNTP (4mM), 1,5 µl de "PCR Buffer" (Takara), 1,0 µl de cada primer, 1,0 µl de Ex*Taq* (Takara) e 1,0 µl de amostra de Long PCR.

A reação seguiu os seguintes parâmetros: uma denaturação inicial a 94° C por 2 minutos seguida por uma denaturação a 96° C por 15 segundos, hibridação dos primers a 53° C por 15 segundos e extensão a 72° C por 90 segundos. A partir da segunda denaturação, o ciclo foi repetido 30 vezes.

Para realizar a reação de seqüenciamento foi utilizado o kit da Amershan Bioscience, DYEnamic Terminator de acordo com as especificações do fabricante.

A reação de seqüenciamento seguiu os seguintes parâmetros: um ciclo inicial a 95°C por 2 minutos e 20 ciclos com 95°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 2 minutos. As seqüências foram determinadas num seqüenciador automático ABI PRISM™ 377

DNA Sequencer (Perking-Elmer). As seqüências foram alinhadas no programa DAMBE versão 4.2.13 (Xia e Xie, 2001).

As análises filogenéticas baseadas em máxima parcimônia (MP) foram realizadas com o programa PAUP* versão beta 4.0b10 (Swofford, 2002) e a confiabilidade dos nós internos foram testadas com o método de *bootstrap* (Felsenstein, 1985).

Resultados e Discussão

Foram realizadas três tipos de análises, uma com todos os genes listados nas Tabelas 3 e 4, uma outra análise sem os tRNA e a última sem os rRNA e sem os tRNA.

O alinhamento de todos os genes da primeira análise resultou numa matriz de 13568 pb, sendo que destes, 8929 são sítios conservados, 2394 são variáveis e 2245 são informativos do ponto de vista filogenético. A análise por MP resultou em uma árvore final com 8249 passos, CI= 0,72 e RI=0,46 (Figura 1).

Na segunda análise, sem os genes tRNA, o alinhamento resultou em uma matriz de 12204 pb, sendo que destes, 8013 são constantes, 2117 são variáveis e 2074 são informativos do ponto de vista filogenético. A análise por MP resultou numa árvore com 7561 passos, CI=0,72 e RI=0,46 (Figura 2).

A última análise foi realizada sem os genes rRNA e tRNA, o alinhamento final resultou numa matriz de 9555 pb, sendo que destes, 5997 sítios eram constantes, 1865 eram variáveis e 1693 informativos filogeneticamente. As análises em MP resultaram numa árvore com 6574 passos, com IC=0,71 e RI=0,43 (Figura 3).

As três análises apresentaram resultados semelhantes. *Trichogenes longipinnis* (Trichogeninae) aparece relacionada às

subfamílias Vandelliinae, Stegophilinae e Trichomycterinae. De acordo com as filogenias propostas por de Pinna (1998) e Wosiacki (2002), as subfamílias Copionodontinae e Trichogeninae formariam uma dicotomia com os outros Trichomycteridae.

Ao contrário das propostas de de Pinna (1998) e Wosiacki (2002), as subfamílias Glanapteryginae (*L. picinguabae*) e Sarcoglanidinae (*S. gouldingi*) não ficaram agrupadas. Nos dados obtidos, *S. gouldingi* aparece como grupo irmão de um clado maior formado por *L. picinguabae* e Trichomycterinae (Figuras 1 e 3) ou a todos os Trichomycteridae exceto Copionodontinae (Figura 2).

A subfamília Trichomycterinae não apareceu como monofilética em nenhuma das análises executadas. Atualmente, *Scleronema* assim como *Ituglanis*, têm sido inclusos na subfamília Trichomycterinae, embora estes dois gêneros aparentemente pertençam a subfamílias diferentes ainda não definidas. No presente trabalho, *Scleronema* aparece como grupo irmão da subfamília Stegophilinae em duas das análises (Figuras 1 e 2) e como grupo irmão da subfamília Vandelliinae em uma das análises (Figura 3). Já nos trabalhos de de Pinna (1998) e Wosiacki (2002) este gênero estaria relacionado a um clado maior composto por Vandelliinae + Stegophilinae + Tridentinae + Sarcoglanidinae + Glanapteryginae.

Com a exclusão de *S. angustirostris* a subfamília Trichomycterinae aparece como monofilética em todas as análises como observado em algumas análises utilizando os genes 12S rRNA e COI (capítulo 2). Porém este monofiletismo não foi verificado por Wosiacki (2002).

B. maldonadoi estritamente relacionada à *T. areolatus* apareceu com um valor de *bootstrap* de 100 nos três cladogramas, esta relação também aparece no cladograma consenso estrito apresentado por Wosiacki (2002), ainda que com um baixo índice de decaimento de Bremer.

O grupo irmão do clado composto por *B. maldonadoi* + *T. areolatus* foi a espécie *Ituglanis amazonicus* em duas das análises (Figuras 1 e 3). Esta espécie apareceu como basal dentro dos Trichomycterinae quando apenas os genes 12S e COI foram analisados (capítulo 2). Na outra análise (Figura 2), *B. maldonadoi* + *T. areolatus* aparecem como grupo irmão de *T. striatus* que é uma espécie que pertenceria a uma nova subfamília monoespecífica ainda não nominada de acordo com Wosiacki (2002).

A amostragem de um número maior de genes para algumas espécies amostradas, assim como outros representantes de cada subfamília deverão esclarecer melhor a relação entre as subfamílias e permitir uma melhor comparação com as hipóteses disponíveis sobre relacionamento entre grupos de Trichomycteridae.

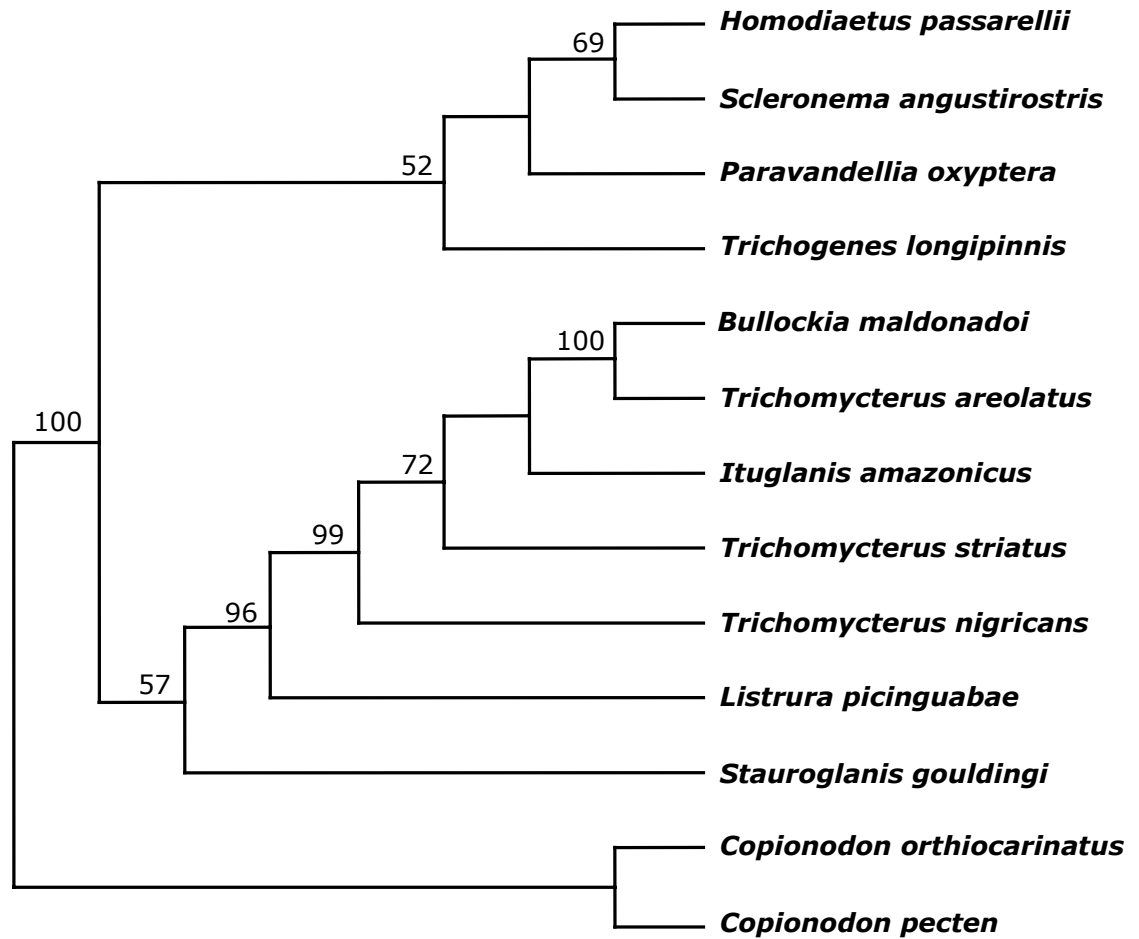


Figura 1: Filogenia proposta para a família Trichomycteridae, construída com o método de MP, baseada em longos trechos de DNA mitocondrial. Os números nos nós representam o valor de bootstrap para 1000 réplicas.

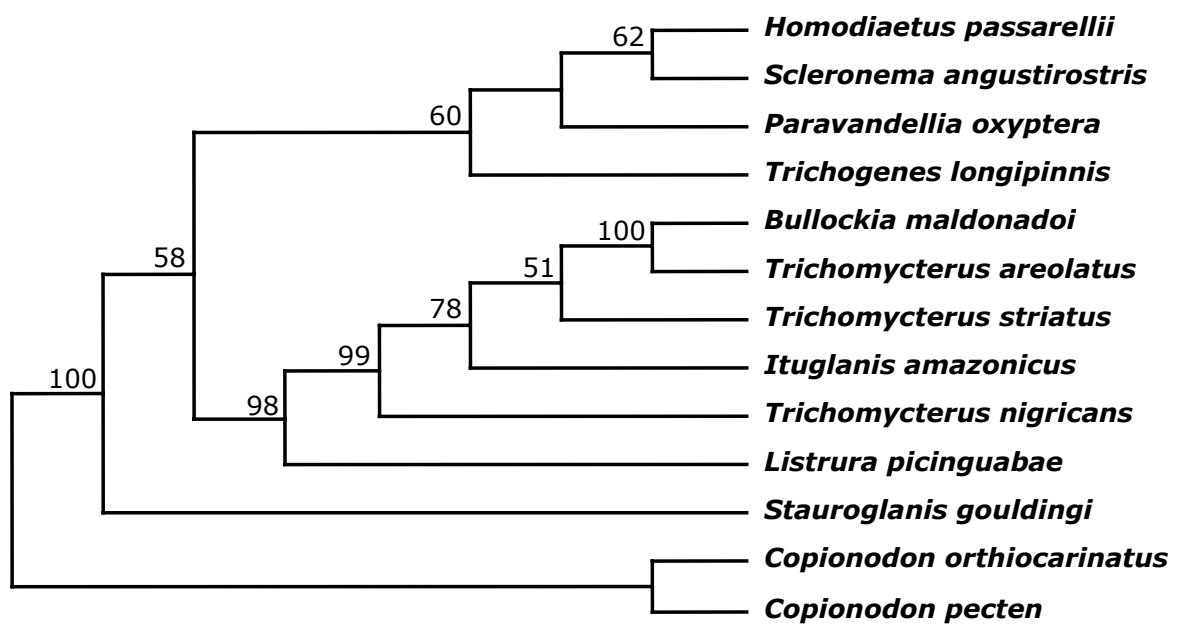


Figura 2: Filogenia proposta para a família Trichomycteridae, construída com o método de MP, baseada em longos trechos de DNA mitocondrial excluindo os tRNA. Os números nos nós representam o valor de bootstrap para 1000 réplicas.

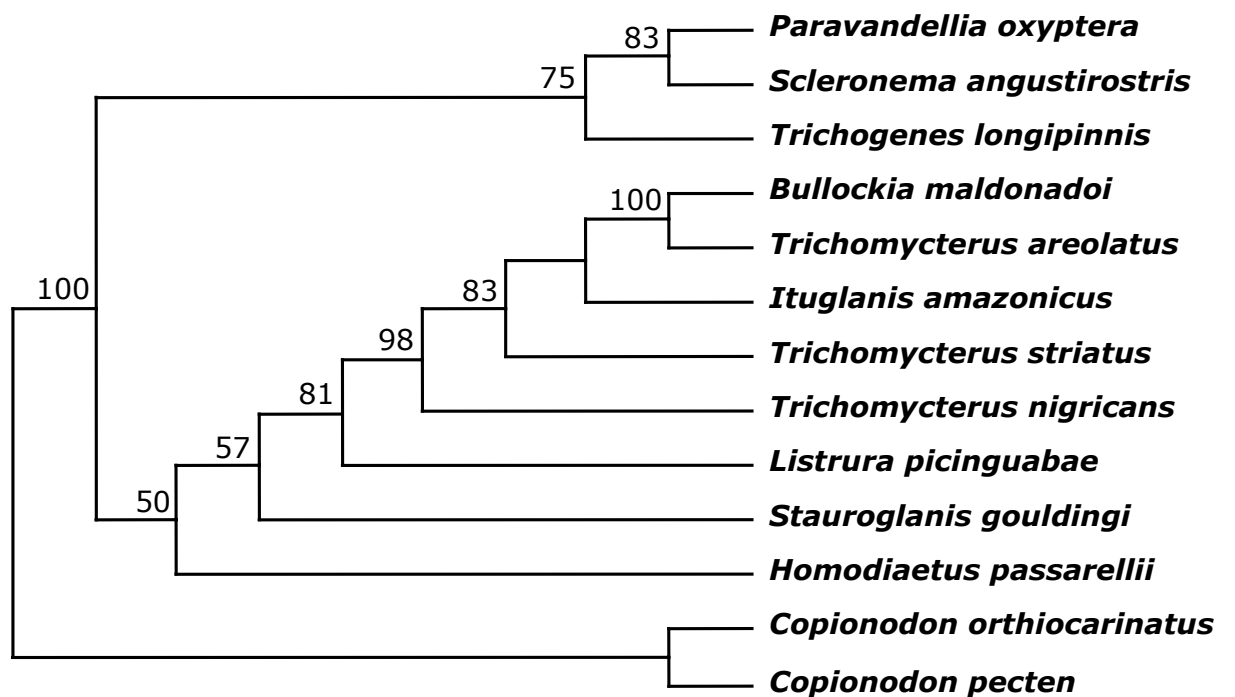


Figura 3: Filogenia proposta para a família Trichomycteridae, construída com o método de MP, baseada em longos trechos de DNA mitocondrial excluindo os tRNA e rRNA. Os números nos nós representam o valor de bootstrap para 1000 réplicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aljanabi, S.M.; Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acid Res.*, v.25(22): 4692-4693.
- Almeida-Toledo, L.F. (1978). Contribuição à citogenética dos Gymnotoidei (Pisces, Ostariophysi). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 128p.
- Almeida-Toledo, L.F.; Viegas-Pequignot, E.; Foresti, F.; Toledo, S.A.; Dutrillaux, B. (1988). BrdU replication patterns demonstrating chromosome homeologies in two fish species, genus *Eigenmannia*. *Cytogenet. Cell Genet.*, 48: 117-120.
- Almeida-Toledo, L.F.; Viegas-Pequignot, E.; Foresti, F.; Toledo, S.A.; Dutrillaux, B. (1988). BrdU replication patterns demonstrating chromosome homologies in two fish species, genus *Eigenmannia*. *Cytogenet. Cell Genet.*, v.48, p. 117-120.
- Alves-Gomes, J.; Ortí, G.; Haygood, M.; Heiligenberg, W.; Meyer, A. (1995). Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Mol. Biol. Evol.*, 12: 298-318.
- Anderson, S.; Bankier, A.T.; Barrell, B.G.; de Bruijin, M.H.L.; Coulson, A.R.; Drouin, J.; Eperon, I.C.; Nierlich, D.P.; Roe, B.A.; Sanger, F.; Schreier, P.H.; Smith, A.J.H.; Staden, R.; Young, I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465
- Arratia, G.; Veloso, A. (1980). Cariotipos de peces tricomictéridos (Siluriformes). *Arch. Biol. Med. Exp.* 13: 137.
- Arratia, G.; Campos, H. (1997). *Proc. Int. Symp. Phylog. Classif. Neotropical Fishes*, 53.
- Baskin, J.N. (1973). Structure and relationships of the Trichomycteridae. Tese de Doutorado, City University of New York, New York, USA.
- Bensch, S.; Harlid, A. (2000). Mitochondrial genomic rearrangements in songbirds. *Mol. Biol. Evol.* 17, 107-113.
- Borin, L.A.; Martins-Santos, I.C. (1999). Karyotype characterization of three species of the genus *Trichomycterus* (Teleostei, Siluriformes) from Iguaçú river basin. *Genetica*, 106: 215-221.
- Borin, L.A.; Martins-Santos, I.C. (2000). Intra-individual numerical chromosomal polymorphism in *Trichomycterus davisii* (Siluriformes,

- Trichomycteridae) from the Iguazu River basin in Brazil, Gen. Mol. Biol., Short Communication 23(3): 605-607.
- Borin, L.A.; Martins-Santos, I.C.; Oliveira, C. (2002). A natural triploid in *Trichomycterus davisii* (Siluriformes, Trichomycteridae): meiotic characterization by chromosome banding and synaptonemal complex analyses. Genetica 115: 253-258.
- Bremer, K. (1988). The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. Evolution, 42: 795-803.
- Burges, W.E. (1989). An Atlas of Freshwater and Marine Catfishes. A Preliminary Survey of Siluriformes. T.F.H. Publications, Neptune, NJ.
- Britto, M.R. (2002). Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysi). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 289p.
- Burges, W.E. (1989). An Atlas of Freshwater and Marine Catfishes. A preliminary survey of Siluriformes. T.F.H. Publications, Neptune, NJ.
- Campanario, C.M.; de Pinna, M.C.C. (2000). A new species of the primitive trichomycterid subfamily Copionodontinae from northeastern Brazil (Teleostei: Trichomycteridae). Ichthyol. Explor. Freshwaters, 11(4): 369-375.
- Carvalho, M.L.; Oliveira, C.; Foresti, F. (1998). Nuclear content of thirty species of Neotropical fishes. Genet. Mol. Biol. 21: 47-54.
- Cole, C.J.; Leavens, C.R. (1971). Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. Herpetol. Rev., 3: 102-1971.
- Colihueque, N.; Coralles, O.; Parraguez, M. (2006). Karyotype and nuclear DNA content of *Trichomycterus areolatus* (Siluriformes, Trichomycteridae). Genet. Mol. Biol. 29(2): 278-282.
- Delany, M.E.; Bloom, S.E. (1984). Replication banding patterns in the chromosomes of rainbow trout. J. Heredity 75: 431-434.
- Desjardins, P.; Morais, R. (1990). Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. J. Mol. Biol., 212: 599-634.
- Desjardins, P.; Morais, R. (1991). Nucleotide sequence and evolution of coding and noncoding regions of a quail mitochondrial genome. J. Mol. Biol., 32: 153-161.
- Diogo, R. (2003). Higher-level phylogeny of Siluriformes- an overview. In: Arratia, G.; Kapoor, B.G.; Chardon, M.; Diogo, R. (Eds.). Catfishes. London: Science Publishers. p. 353-384.

- Eigenmann, C. H. (1918). The Pygidiidae, a family of South American catfishes. *Memoirs of the Carnagie Museum*, vol.7(5): 259-398.
- Eschmeyer, W.N. (1998). *Catalog of fishes*. Vol. 3. California Academy of Science, California.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fernandes-Matioli, F.M.C. (1996). Análises citogenéticas e dos padrões de descargas dos órgãos elétricos (DOEs) no gênero *Gymnotus* (Pisces, Gymnotidae). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 160 pp.
- Ferraris, C.J. (1995). Catfishes and knifefishes. IN: *Encyclopedia of fishes*, J.R. Paxton & W.N. Eschmeyer eds., Academic Press, San Diego, pp. 106-112.
- Ferraris, C.J. (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, 1418: 1-628.
- Foresti, F.; Almeida-Toledo, L.F.; Toledo-Filho, S.A. (1984). Chromosome studies in *Gymnotus carapo* and *Gymnotus* sp. (Pisces, Gymnotidae). *Caryologia*, 37:141-146.
- Foresti, F.; Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F. (1993). A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. *Experientia*, 49: 810-813.
- Froese, R.; Pauly, D. Editors (2007) FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org , versão (02/2007).
- Giuliano-Caetano, L. (1986). Estudo citogenético em *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) de diferentes bacia hidrográficas brasileira. Tese de Mestrado. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos. 84 p
- Glenn, T. PEG Precipitation of PCR products. (acessado em 03/10/2006: http://www.uga.edu/srel/DNA_Lab/PEG_Precip'00.rtf)
- Gold, J.R.; Li, Y.C.; Shipley, N.S.; Powers; P.K. (1990). Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology*, 37: 563-575.
- Gonzo, G.M.; Fenocchio, A.S.; Pastori, C. (2000). Chromosome characterization of *Trichomycterus spegazzini* (Siluriformes, Trichomycteridae) from three hydrographic basins of the Northwest of Argentina. *Caryologia*, 53: 39-43.

- Guindon, S.; Lethiec, F.; Duroux, P.; Gascuel, O. (2005). PHYML Online- a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res.* 1:33 (Web Server issue):W557-9.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symp. Ser., Philadelphia*, v.41, p.95-98.
- Hennig, W. (1966). *Phylogenetics systematics*. University of Illinois Press, Urbana, Illinois. 263 p.
- Howell, W.M.; Black, D.A. (1981). Controlled silver staining of Nucleolus Organizer Regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- Inoue, J.G.; Miya, M.; Tsukamoto, K.; Nishida, M. (2001). Complete mitochondrial DNA sequence of *Conger myriaster* (Teleostei: Anguilliformes): novel gene order for vertebrate mitochondrial genomes and the phylogenetic implications for anguilliform families. *J. Mol. Evol.*, 52: 311-320.
- Inoue, J.G.; Miya, M.; Tsukamoto, K.; Nishida, M. (2003a). Basal actinopterygian relationships: a mitogenomic perspective on the phylogeny of the "ancient fish". *Mol. Phylogenet. Evol.* 26: 110-120.
- Inoue, J.G.; Miya, M.; Tsukamoto, K.; Nishida, M. (2003b). Evolution of the deep-sea gulper eel mitochondrial genomes: large-scale gene rearrangements originated within the eels. *Mol. Biol. Evol.* 20: 1917-1924.
- Inoue, J.G.; Miya, M.; Tsukamoto, K.; Nishida, M. (2004). Mitogenomic evidence for the monophyly of elopomorph fishes (Teleostei) and the evolutionary origin of the leptocephalus larva. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32: 274-286.
- Ishiguro, N.B.; Miya, M.; Nishida, M. (2003). Basal euteleostean relationships: a mitogenomic perspective on the phylogenetic reality of the "Protacanthopterygii". *Mol. Phylogenet. Evol.* 27: 476-488.
- Janke, A.; Feldmaier-Funchs, G.; Thomas, W.K.; von Haeseler, A.; Pääbo, S. (1994). The marsupial mitochondrial genome and the evolution of placental mammals. *Genetics* 137: 234-256.
- Jianxun, C.; Xiuhai, R.; Qixing, Y. (1991). Nuclear DNA content variation in fishes. *Cytologia* 56: 425-429.
- Kantek, D.L.Z.; Peres, W.A.M.; Moreira-Filho, O. (2006). Citogenética de espécies do gênero *Trichomycterus* (Teleostei: Siluriformes:

- Trichomycteridae) da região de transposição do rio Piumhi. In: 52º Congresso Nacional de Genética, nº 244.
- Klinkhardt, M.; Tesche, M.; Greven, H. (1995). Database of fish chromosomes. Magdeburg: Westarp-Wiss., 237 pp.
- Kocher, T.D.; Stepien, C.A. (1997). Molecular Systematics of Fishes. Academic Press, London, U.K.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. (2004) MEGA3.0: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics 5: 150-163, Distribuído pelos autores.
- Kumazawa, Y.; Nishida, M. (1995). Variation in mitochondrial tRNA gene organization of reptiles as phylogenetic markers. Mol. Biol. Evol., 12:759-722.
- Lavoué, S.; Miya, M.; Inoue, J.G.; Saitoh, K.; Ishiguro, N.B.; Nishida, M. (2005). Molecular systematics of the gonorynchiform fishes (Teleostei) based on whole mitogenome sequences: Implications for higher-level relationships within the Otocephala. Mol. Phylogenet. Evol. 37:165-177.
- Lee, M.R.; Elder, F.F.B. (1980). Yest simulation for bone marrow mitosis for cytogenetic investigation. Cytogenet Cell Genet, v.26, p.36-40.
- Lee, W.J.; Kocher, T.D. (1995). Complete sequence of a sea lamprey (*Petromyzon marinus*) mitochondrial genome: early establishment of the vertebrate genome organization. Genetics, 139: 873-887.
- Lemmon, A.R.; Milinkovitch, M.C. (2002). MetaPIGA (Phylogenetic Inference using the MetaGA) version 1.0.2b. Distribuído pelos autores. www.ulb.ac.be/sciences/ueg .
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 5: 201-220.
- Lewin, B. (1994). Genes V. Oxford University Press Inc., New York, 1272 p.
- Lima, N.R.W.; Galetti Jr., P.M. (1990). Chromosome characterization of the fish *Trichogenes longipinnis*. A possible basic karyotype of Trichomycteridae. Rev. Brasil. Genet. 13: 239-245
- Mabuchi, K.; Miya, M.; Satoh, T.P.; Westneat, M.W.; Nishida, M. (2004). Gene rearrangement and evolution of tRNA pseudogenes in the mitochondrial genome of the parrotfish (Teleostei: Perciformes: Scaridae). J. Mol. Evol., 59: 287-297.

- Macey, J.R.; Larson, A.; Ananjeva, N.B.; Fang, Z.; Papenfuss, T.J. (1997). Two novel gene orders and role of light-strand replication in rearrangement of the vertebrate mitochondrial genome. *Mol. Biol. Evol.* 14: 287-104.
- Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, C.A.S. (1998) Phylogeny and classification of neotropical fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS 603 p.
- Mindell, D.P.; Sorenson, M.D.; Dimcheff, D.E. (1998). Multiple independent origins of mitochondrial gene order in bird. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10693-10697.
- Miya, M.; Nishida, M. (1999). Organization of the mitochondrial genome of a deep-sea fish, *Gonostoma gracile* (Teleostei: Stomiiformes): first example of transfer RNA gene rearrangements in bony fishes. *Mar. Biotechnol.*, 1: 416-426.
- Miya, M.; Nishida, M. (2000). Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Mol. Phylogenet. Evol.* 17: 437-455.
- Miya, M.; Kawaguchi, A.; Nishida, M. (2001). Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: a case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 18: 1993-2009.
- Miya, M.; Takeshima, H.; Endo, H. et al. (2003). Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26: 121-138.
- Miya, M.; Satoh, T.P.; Nishida, M. (2005). The phylogenetic position of toadfishes (order Batrachoidiformes) in the higher ray-finned fish as inferred from partitioned Bayesian analysis of 102 whole mitochondrial genome sequences. *Biol. J. Linnean Soc.*, 85: 289-306.
- Murphy, W.J.; Collier, G.E. (1997). A molecular phylogeny for Aplocheiloid fishes (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): the role of vicariance and the origins of annualism. *Mol. Biol. Evol.* 14: 790-799.
- Nei, M.; Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York, USA.
- Nelson, J.S. (2006). *Fishes of the world*. 4rd ed., John Wiley & Sons, Inc. 600 pp.

- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F. (2007). Karyotypic evolution in Neotropical fishes. IN: Fish Cytogenetics. Ed. E. Pizano, C. Ozouf-Costaz, F. Foresti, B.G. Kapoor. Science Publishers, Enfield, pp. 111-164.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Britski, H.A.; Toledo Filho, S.A. (1988). Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. Rev. Brasil. Genet. 11: 577-624.
- Oliveira, C.; Chew, J.S.K.; Porto-Foresti, F.; Dobson, M.; Wright, J.M. (1999). A LINE2 repetitive DNA sequence from the cichlid fish, *Oreochromis niloticus*: sequence analysis and chromosomal distribution. Chromosoma, 108(7): 457-468, 1999.
- Oliveira, C.; Wright, J.M.; Foresti, F. (2002). Chromosome structure in fishes. In: Some Aspects of Chromosome Structure. R.C. Sobti, G Obe & R. S. Athwal, eds. Narose Publishing House, New Delhi, Índia. pp. 103-108.
- Oliveira, C. (2007). Banco de dados sobre citogenética de peixes neotropicais. http://www.ibb.unesp.br/departamentos/Morfologia/lab_pesq_biologia_e_genetica_de_peixes.php
- Pääbo, S.; Thomas, W.K.; Whitfield, K.M.; Kumazawa, Y.; Wilson, A.C. (1991). Rearrangements of mitochondrial transfer RNA genes in marsupials. J. Mol. Evol., 33: 426-430.
- Paxton, J.R.; Eschmeyer, W.N. (1995). Encyclopedia of fishes. Academic Press, San Diego.
- Phillips, R.B.; Ihssen, P.E. (1985). Identification of sex chromosomes in lake trout (*Salvelinus namaycush*). Cytogen. Cell Genet. 39: 14-18.
- Reis, R. E.; Kullander, S.O.; JR., C.J.F. (2003). Check list of the freshwater fishes of South America. Porto Alegre: Edipucrs. 729p.
- de Pinna, M.C.C. (1992). A new subfamily of Trichomycteridae (Teleostei, Siluriformes), lower loricarioid relationships and a discussion on the impact of additional taxa for phylogenetic analysis. Zool. J. Linn. Soc., 106(3): 175-229.
- de Pinna, M.C.C. (1998). Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. IN: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S., eds). Porto Alegre: EDIPUCRS, pp. 279-330.
- de Pinna, M.C.C.; Wosiacki, W.B. (2003). Family Trichomycteridae (pencil or parasitic catfishes), pp270-290. In R.E: Reis, S.O.

- Kullander, and C.J. Ferraris, Jr. (Eds.), Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil.
- Posada, D.; Crandall, K.A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, Bledam, v.14, p.817-818.
- Quinn, T.W., Midell, D.P. (1996). Mitochondrial gene order adjacent to the control region in crocodile, turtle, and tuatara. *Mol. Phylogen. Evol.*, 5: 334-351.
- Reis, R.E.; Kullander, S.O.; JR., C.J.F. (2003). Check list of the freshwater fishes of South America. Porto Alegre:Edipucrs, 729 p.
- Saitoh, K.; Miya, M.; Inoue, J.G.; Ishiguro, N.B.; Nishida, M. (2003). Mitochondrial genomics of ostariophysan fishes: perspectives on phylogeny and biogeography. *J. Mol. Evol.* 56: 464-472.
- Saitoh, K.; Miya, M.; Hiromitsu, E.; Nishida, M. (2006). Round and pointed-head grenadier fishes (Actinopterygii: Gadiformes) represent a single sister group: Evidence from the complete mitochondrial genome sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* 40: 129-138.
- Sato, L.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2004). Karyotype description of five species of *Trichomycterus* (Teleostei, Siluriformes, Trichomycteridae). *Genetics and Molecular Biology.* 27(1): 45-50.
- Schaefer, S.A. (1991). Anatomy and relationships of the scoloplacid catfishes. *Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.* 142: 167-210.
- Schaefer, S.A. (1998). Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). IN: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes.* (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S., eds). Porto Alegre: EDIPUCRS, pp. 375-400.
- Scheel, J.J. (1973). Fish chromosome and their evolution. Internal Report of Danmarks Akvarium, Charlottenlund, Denmark
- Shimabukuro-Dias, C.K.; Oliveira, C.; Reis, R.E.; Foresti, F. (2004). Molecular Phylogeny of the armored catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). *Mol. Phylogen. Evol.* 32:152-163.
- Sola, L.; Cataudella, S.; Capanna, E. (1981). New developments in vertebrate cytotaxonomy III. Karyology of bony fishes: a review. *Genetica*, 54: 285-328.
- Stock, D.W.; Gibbons, J.K.; Whitt, G.S. (1991). Strengths and limitations of molecular sequences comparisons for inferring the phylogeny of the major groups of fishes. *J. Fish Biol.*, 39: 225-236.

- Sumida, M.; Kanamori, Y.; Kaneda, H.; Kato, Y.; Nishioka, M.; Hasegawa, M.; Yonekawa, H. (2001). Complete nucleotide sequence and gene rearrangement of the mitochondrial genome of the Japanese pond frog *Rana nigromaculata*. *Genes Genet. Syst.*, 76:311-325.
- Swofford, D.L. (2002). PAUP* - Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Swofford, D.L.; Olsen, G.J.; Waddell, P.J.; Hillis, D.M. (1996). Phylogenetic inference. IN: *Molecular Systematics*. (Hillis, D.M, Moritz, C., Mable, B.K., eds). Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, USA, pp. 407-514.
- Teugels, G. G. et al.(1996). Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei): an overview. *Aquatic Living Resourc. Montrouge*, v.9, p. 9-34.
- Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 24:4876-4882.
- Torres, R.A.; Foresti, F.; Oliveira, C. (1998). Comparative cytogenetic studies in allopatric populations of *Trichomycterus paolence* Eignmann, 1918 from South-Eastern Brazil (Siluriformes, Trichomycteridae). *Cytologia*, v.63, p.107-114.
- Torres, R.A.; Foresti, F.; Oliveira, C. (2002). Occurrence of karyotypical mosaicism in *Trichomycterus paolence* (Teleostei, Trichomycteridae). *Cytologia*, v.55, p. 283-287.
- Torres, R.A.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2004). Cytotaxonomic diagnosis of *Trichomycterus diabolus* (Teleostei: Trichomycteridae) with comments about its evolutionary relationships with co-generic species. *Neotropical Ichthyol.*, 2(3): 123-125.
- Vari, R.P.; Malabarba, L.R. (1998). Neotropical Ichthyology: an overview. IN: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S., eds). Porto Alegre: EDIPUCRS, pp. 1-11.
- Wosiacki, W.B. (2002). Estudo das relações filogenéticas de Trichomycterinae (Teleostei, Siluriformes, Trichomycteridae) com uma proposta de classificação. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 324 pp.

Xia, X.; Xie, Z. (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity* 92: 371-373.

Yoneyama, Y. (1987). The nucleotide sequences of the *Rana catesbeiana* mitochondrial genome. *Nippon Ika Daigaku Zasshi*, 54: 429-440 [in Japanese].

Zardoya, R.; Meyer, A. (1997). The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of a "living fossil" the coelacanth (*Latimeria chalumnae*). *Genetics*, 146: 995-1010.