UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Departamento de Morfologia - Instituto de Biociências de Botucatu
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – AC: GENÉTICA

MÁRCIO CESAR CHIACHIO

Doutorado

*E*studos *F*ilogenéticos na *S*ubfamília *H*ypoptopomatinae (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae) *C*om *B*ase em *S*equências de *DNA*

Orientador: Prof. Dr. Claudio de Oliveira

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de *DOUTOR* em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Genética.

Botucatu / SP
Junho de 2009

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

Chiachio, Márcio Cesar.
Estudos filogenéticos na subfamília Hypoptopomatinae (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae) com base em sequências de DNA / Márcio Cesar Chiachio. – Botucatu: [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu 2009
Orientador: Cláudio de Oliveira
Assunto CAPES: 20204000

1. Peixe - Genética 2. Filogenia
CDD 597.55

Palavras-chave: Filogenia; Hypoptopomatinae: Peixes; Sistemática molecular

Processo FAPESP
04-11693-8

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

UNESP - Botucatu - SP

"O que faz a vida valer a pena
é essa constante incerteza quanto ao momento seguinte.

É isso que nos estimula a inventar, a criar, a realizar,
a tentar melhorar o nosso mundo.

O que faz a gente ser grande é não perder o futuro de vista. É chegar a uma porta, fincar a bandeira da conquista e nesse mesmo instante começar a buscar outros portos.

É criar desafios, calcular riscos, avançando sempre. Porque a grande aventura é viver. E a vida, assim como as ondas, abriga todos os tipos de sonhos e embarcações.

O que faz a gente ser grande é ser como o mar: incansável na sua procura pela onda perfeita, até descobrir que a perfeição está na própria busca".

"Agora já posso contemplar um horizonte. Não que isso signifique a finalização dos meus sonhos.

É, sem dúvida, uma conquista: mas jamais será tudo! Serei, sempre, eterno sonhador a vislumbrar o futuro.

Envelheço sem, contudo, alcançar as estrelas do céu..."

Dedico este trabalho...

Com todo meu amor e carinho,
à minha avó ***D. Luzia****,*
que durante essa minha caminhada,
resolveu ir para longe dos olhos,
mas para dentro do coração.

Meus agradecimentos...

Nesse momento em que chego ao final de mais uma etapa em minha vida, mais do que necessário, é muito gratificante poder vir agradecer a tantas pessoas que participaram comigo de toda essa caminhada. Em muitos momentos de angústias, aflições ou grandes realizações, diferentes pessoas, com pensamentos e atitudes variadas, sempre se mostraram dispostas a opinar em algo (profissionalmente e/ou psicologicamente), ou simplesmente a me ouvir. Gostaria de agora citar, em especial, algumas que de uma forma direta, ou nem tanto, puderam estar comigo em momentos de que necessitei...

Primeiramente a meu bom DEUS, companheiro REAL de todos os meus momentos. Angústias e alegrias se tornam diferentes quando assumimos que uma força maior nos guia pelos caminhos que escolhemos.

Agradeço ao Dr. Claudio de Oliveira, que me deu a oportunidade de trabalhar ao seu lado nesses anos que fiz parte de seu grupo de pesquisa. Pela confiança, pelos ensinamentos, pela paciência, pela amizade, pelos momentos divertidos e por todas as outras demonstrações que o tornaram um grande orientador.

Pela concessão da bolsa de Doutorado, quero agradecer à FAPESP (Proc. 04/11693-8). Ajuda primordial para que eu pudesse me manter em Botucatu conseguindo realizar meu trabalho de uma forma um pouco mais "tranquila".

Ao Dr. Fausto Foresti, que nos dá chances de aprender sempre ao seu lado, quer seja nos momentos de descontração ou de seriedade. Um bate-papo pelos corredores, pelas salas de aulas, ou até mesmo no "café", sempre foram oportunidades de ouvir grandes histórias, experiências de vidas ou lições para levarmos em nossas recordações.

Ao Dr. Juan Montoya-Burgos, da Université de Genève – Faculté des Sciencies, em Genebra, na Suíça, por ter me recebido com tanta simpatia para que eu pudesse desenvolver parte do meu trabalho em seu laboratório. Agradeço muito por todos os momentos, por ter sido tão agradável enquanto lá estive e, principalmente, por ter me ensinado TANTO em tão pouco tempo. Experiências únicas vividas dentro e fora de seu laboratório.

Agradeço aos companheiros do Molecular Phylogeny Laboratory and Evolution in Vertebrates do Département de Zoologie et Biologie Animale, da Université de Genève, pela troca de experiências, pela troca de culturas e pelos momentos tão divertidos que passamos por lá em meio a tanto frio. Yamila Cardoso, por ter sido tão querida e prestativa, pessoa que certamente vou me lembrar para sempre com muito carinho, por me socorrer tantas vezes dentro e fora do laboratório. Sophie De Chambrier e Thierry Châtelain, por me deixarem "invadir" as suas bancadas de trabalho. Ilham Bahechar, por me ensinar sempre com tanta paciência, repetindo no bom francês vezes e vezes, onde estava e como usava cada coisa, e, principalmente, onde guardá-las depois. Pelas pacientes lições de cálculos e mais cálculos de concentrações, molaridades, etc. Obrigado por ter sido simpática em todo o tempo! À Slim Chraiti, meu divertido (primeiro) colega de residência. Obrigado pela simpatia constante e por me ajudar em tantos momentos. Obrigado pelo auxílio nas fantásticas (e caras) análises de raio-x.

Quero agradecer aos colegas do Muséum d'histoire naturelle de Genève: Rafaël Covain, pelo auxílio nas análises, pelos diversos momentos divertidos e pelas sugestões do manuscrito; à Sonia Fisch-Muller pela simpatia, por abrir as portas de sua coleção e pela doação de amostras importantes em minhas análises.

À família ARIAS que me recebeu em sua casa durante todo o tempo em Genébra. Por ter me permitido fazer parte de sua família e me sentir tão à vontade.

Ao Dr. Luis Roberto Malabarba, pela simpatia com que me recebeu em seu laboratório na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre. Por ter sido tão prestativo na temporada que fiquei por lá. Além, é claro, pela doação de importantes amostras.

Agradeço aos alunos de Porto Alegre, especialmente a Fernando Carvalho (UFRGS), Fernando Jerep (PUC-RS), Juliano dos Santos (UFRGS) e Thiago Carvalho (PUC-RS), pelo auxílio nas coletas, identificação dos exemplares e sugestões.

Agradeço ao amigo (e técnico) do nosso laboratório, Renato Devidé, que muitas vezes fazia do nosso trabalho, também o seu trabalho. Agradeço pela disponibilidade em sempre "bater uma peneira" ou então "chutar umas pedras" em busca de nossos simpáticos Loricariídeos.

Grandes momentos aconteceram dentro do nosso Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP de Botucatu, momentos esses divididos por grandes companheiros, que sabiam a hora da brincadeira e também da ajuda necessária. Agradeço especialmente à Gleisy dos Santos, Kelly Abe e Luís Garcia Pereira por toda ajuda nos "encaixes" na agenda do sequenciamento.

Deixo um agradecimento especial àqueles que mais do que colegas de trabalho souberam se tornar amigos:

Ao Prof. Celso Benites, pessoa que sempre nos divertia e nos presenteava com uma excelente gastronomia; Guilherme Lopes, pelas esticadas até um "buteko" mais próximo depois do trabalho e pela abertura de sua casa para que pudéssemos nos divertir como nunca no "Barretão"; Zeca, um cara de conversa sincera e agradável em toda hora que eu "passava" pela Citogenética; aos recém-chegados Víctor Tagliacollo, Bruno de Melo e Ricardo Britzke, amigos divertidos pra jogar conversa fora ou trocar idéias ictiológicas; ao grande Ernesto Ron, venezuelano gente boa demais!!! Fernando Fernandes (grande "Konrado"), amigo que sempre tinha algo legal para falar (na maioria das vezes via MSN, mesmo estando do nosso lado). Cara, você é um grande companheiro, ainda vamos esquematizar muitas coisas por aí afora.

Agradeço a Tatiane Mariguela, pelas divertidas conversas e por dividir comigo as dificuldades e "alegrias" durante a estadia em Porto Alegre.

À Dra. Cristiane Shimabukuro-Dias que, desde que cheguei ao laboratório, sempre teve palavras amigas e conhecimentos para me transmitir. Agradeço de coração por toda amizade nesse tempo todo.

Agradeço de coração à Adriana Takako, por todo companheirismo e bondade que sempre "sobram" em sua pequena pessoa.

À mais "antiga" companheira de trabalho, (Dra.) Daniela Ferreira, quero deixar um agradecimento especial por todos esses mais de 10 anos de convivência diária, iniciada lá atrás nos primeiros anos da graduação em Rio Preto. Por estar comigo em marcantes acontecimentos, pessoais e profissionais, pela troca de cidade juntos, pelas viagens, conselhos, companheirismo e tantos outros acontecimentos.

Quero agradecer também aos outros amigos do Departamento de Morfologia: Andréia Polleto, vai ser muito ruim não ouvir suas conversas animadas todo dia; Danillo Pinhal grande companheiro de mesa de bar, viagens e roda de violão; sertaneja, funkeira e Barbie-workshop Juliana Mazzuchelli, vou sentir demais a sua falta Jú!!! Pequena Irani Ferreira, é até difícil pensar em algo pra te escrever, você é uma pessoa que a gente conhece e já não larga mais. Irânis gosto muito de você, obrigado pela amizade e carinho nesse tempo todo!

Depois de tantos anos longe, é muito gratificante saber que ainda possuo grandes irmãos em minha "terra-natal". Alessandra Garutti, Fernando Dias, Fabiana Garutti, Eliane Fávaro, Luiz Sérgio Júnior e André Luis Rodrigues, que participaram comigo da minha formação pessoal desde minha infância e que hoje dividem também mais essa conquista em minha vida. Ana Paula Veiga, Rafael Pierini, Ana Carolina, Paty e Jean, amigos de pouco tempo, mas que se fazem especiais e essenciais em minha vida. Karina Furlanetto, obrigado por acreditar sempre em mim, por me dar tanta força, por estar ao meu lado em todos os momentos. Hoje eu já não saberia o que seria não poder contar com sua amizade. Você é muito importante para mim.

Às minhas tias, Tata, Bica, Má e Jú... Pessoas queridas e fundamentais em minha vida. Ao meu irmão Marcus (Kako), minha cunhada Giseli e minha afilhada Maria Luiza, agradeço pelo carinho, admiração e amor sempre presentes. À minha irmã Andrea, meu cunhado André, meu sobrinho Paulo Cesar e minha afilhada Maria Fernanda. Obrigado por tornarem cada dia vivido ao lado de vocês, único! Agradeço de coração por estarem ao meu lado quer sejam minhas decisões.

E finalmente quero agradecer aos meus pais, Francisco Cezar e Maria José. Hoje deixo bem claro que tudo isso realmente foi dedicado a vocês. Mais do que uma conquista pessoal, tudo foi feito para que vivessem esse momento de conquista em suas vidas.

Resumo

A subfamília Hypoptopomatinae, considerada monofilética desde a sua descrição, incluí cerca de 100 espécies distribuídas em 17 gêneros que se dividem atualmente em duas tribos, Hypoptopomatini e Otothyrini. A tribo Hypoptopomatini é composta pelos gêneros *Acestridium*, *Hypoptopoma*, *Oxyropsis*, *Niobichthys, Nannoptopoma* e *Otocinclus* e a tribo Otothyrini por *Corumbataia, Eurycheilichthys*, *Epactionotus*, *Hisonotus, Microlepidogaster*, *Otothyris*, *Otothyropsis, Parotocinclus, Pseudotocinclus*, *Pseudotothyris* e *Schizolecis.* Os Hypoptopomatinae apresentam tamanho pequeno a moderado e geralmente compartilham uma fisionomia adulta distinta para Loricariidae. Diferentes estudos realizados nos últimos anos apontam a necessidade de novas reconstruções filogenéticas para a subfamília, devido a evidências levantadas por diferentes metodologias de análises que não corroboram o monofiletismo para o grupo em questão. Baseado nesses questionamentos, o presente trabalho objetivou realizar uma análise filogenética baseada em caracteres moleculares englobando o maior número de gêneros da subfamília Hypoptopomatinae, e de seus gêneros diretamente relacionados, a fim de se testar o monofiletismo para o grupo. Nossos resultados, baseados em sequências parciais do gene nuclear F-Reticulon4 e dos genes mitocondriais Citocromo oxidase I e 16S rRNA, não corroboram a hipótese de que Hypoptopomatinae é um grupo monofilético, quando os dados foram analisados por Máxima Parcimônia e Análise Bayesiana, devido a inclusão dos representantes de Neoplecostominae entre as duas tribos Otothyrini e Hypoptopomatini. Analisando as topologias obtidas para as tribos de Hypoptopomatinae, evidenciamos o monofiletismo para Hypoptopomatini, tendo *Otocinclus* como gênero basal para o grupo. O mesmo não pôde ser encontrado para Otothyrini devido à exclusão do gênero *Pseudotocinclus* que aparece mais relacionado à Neoplecostominae em todas as análises realizadas. Se admitirmos o nível de subfamília para Neoplecostominae, automaticamente estamos negando o mesmo estado para Hypoptopomatinae e assim se torna necessário elevar o nível de tribo de Hypoptopomatini e Otothyrini a subfamília. Nossos resultados estatísticos suportam tal alteração taxonômica.

Palavras-chave: Peixes; Hypoptopomatinae; Sistemática Molecular; Filogenia.

Sumário

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVOS 20

3. MATERIAIS 21

3.1 Grupo Interno 21

3.2 Grupo Externo 21

4. MÉTODOS 25

4.1 Extração de DNA Genômico 25

4.1.1 Extração por Fenol-Clorofórmio 25

4.1.2 Extração por Tampão de extração 26

4.1.3 Extração por Kit comercial 27

4.2 Amplificação dos segmentos de DNA 28

4.2.1 Genes mitocondriais 30

4.2.2 Gene nuclear 30

4.3 Purificação das amostras amplificadas 33

4.4 Reação de PCR para sequenciamento 34

4.5 Limpeza do PCR de sequenciamento 35

4.6 Sequenciamento de DNA 35

4.7 Obtenção das sequências consenso 35

4.8 Análise filogenética 36

4.8.1 Alinhamento das sequências 36

4.8.2 Análise dos dados 37

4.8.2.1 Máxima parcimônia 39

4.8.2.2 Inferência Bayesiana 41

5. RESULTADOS 43

5.1 Análise filogenética baseada em sequências de genes mitocondriais 45

5.2 Análise filogenética baseada em sequências do gene nuclear F-Reticulon 4 49

5.3 Análise filogenética baseada na combinação de genes 52

6. DISCUSSÃO 56

7. CONCLUSÃO 62

8. REFERÊNCIAS 64

9. ANEXOS 73

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Sistemática Filogenética

O conhecimento da diversidade biológica parece ser tão antigo quanto o próprio conhecimento humano. Desde tempos remotos na história da humanidade, já existia uma preocupação de descrever e classificar tal diversidade, isto é, compreender as diferenças entre grupos de animais, plantas, fungos, organismos unicelulares e procariotos. Dentro da biologia comparada existe uma preocupação em analisar as características de espécies diferentes, procurando claramente as semelhanças e diferenças entre os grupos. Entretanto, apenas nos anos 50 foi proposto um sistema de classificação biológica, baseado na idéia de que os organismos constituem sistemas contínuos e modificados. Willi Hennig, entomólogo alemão, fundava então uma nova corrente de classificação para os seres vivos, a Cladística ou Sistemática Filogenética (Hennig, 1950). Escola esta pouco difundida no mundo científico em sua primeira década de existência até que, em 1966, a obra original do autor é traduzida do alemão para o inglês.

Após esse período, observa-se significativos avanços conceituais e metodológicos em Sistemática Filogenética, e essa, passa a ser aplicada não apenas em questões relacionadas à classificação da biodiversidade mas também nos mais diversos ramos das Ciências Biológicas, buscando auxiliar na compreensão da diversidade biológica, na evolução dos táxons e na modificação dos caracteres morfológicos, comportamentais, fisiológicos e moleculares.

Quando é levantada a questão da diversidade biológica, torna-se necessário o conhecimento de dois aspectos distintos. A *Diversidade Biológica* implica em um certo número de *grupos diferentes*. Ou seja, táxons, que de alguma maneira

podem ser distinguidos uns dos outros. Outro aspecto refere-se ao número de *caracteres diferentes* dessas entidades, cada organismo possuindo características que podem ser iguais ou diferentes aos de outros grupos (Amorim, 2002).

Ao mesmo tempo que a teoria filogenética passa a ser mais amplamente empregada após a metade do século passado, o surgimento de técnicas de análise de DNA como a análise de produção de fragmentos gerados por enzimas de restrição, a clonagem gênica, a reação em cadeia da polimerase (PCR), e o sequenciamento de DNA, permitiu se compreender melhor a estrutura molecular dos genes e genomas.

Assim, estas técnicas de estudo do DNA permitiram ampliar os estudos de evolução molecular em duas áreas principais que se encontram relacionadas intimamente: (1) o estudo dos mecanismos e padrão de evolução de ácidos nucléicos e de proteínas, de fundamental importância para idealizar modelos para a inferência das relações entre os organismos e (2) a reconstrução da história evolutiva dos organismos, também conhecida como *filogenia molecular*, aliada a outras disciplinas como biogeografia, geologia e paleontologia, permite traçar hipóteses de origem, datação e evolução dos organismos e possibilita determinar e compreender a ordem das mudanças dos caracteres (Nei & Kumar, 2000).

Estimar relações de ancestralidade para determinados grupos taxonômicos é o intuito dessa *reconstrução filogenética*, baseando-se em unidades (famílias, gêneros, espécies e/ou populações) do qual se pretende determinar a sua história evolutiva (Amorim, 2002). Esses táxons recebem a designação de *Unidades taxonômicas operacionais* (OTU – *"Operational Taxonomic Unit"*).

Como resultado, obtemos as chamadas *Árvores filogenéticas* que são representações gráficas das relações taxonômicas encontradas para as OTUs, mostradas através de ramos, nós internos e terminais. Nós terminais representam as

OTUs estudadas, que são unidas por ramos cujo nó interno representam o ancestral comum destes táxons.

Dentro da metodologia de análise filogenética, alguns termos definidos inicialmente para caracteres morfológicos, também são aplicados nas reconstruções genéticas. Quando tratamos de análises evolutivas de genes, conceitos de *Homologia* e *Homoplasia* tornam-se um pouco mais complexos.

A Sistemática Filogenética baseia-se no conceito de *Homologia* de caracteres para desenhar a história evolutiva das unidades taxônomicas em questão. Uma estrutura ou um órgão é chamado de *homólogo* se apresentar uma origem ancestral comum para diferentes táxons, independente da sua função. Em um par de condições homólogas, a condição pré-existente (mais antiga) é uma *Plesiomorfia* e a condição modificada (mais recente) é uma *Apomorfia*. Apomorfias de um táxon terminal são denominadas *Autapomorfias* (Amorim, 2002).

Estruturas morfológicas que não possuem uma origem comum, mesmo apresentando semelhanças funcionais e morfológicas, são designadas como *análogas* (asas de insetos e morcegos) e, o fenômeno que leva a formação dessas estruturas análogas é denominado *Homoplasia*. Distinguir a falsa evidência da homoplasia da evidência confiavel de homologia, é o problema fundamental da inferência filogenética. Quando analises utilizando-se os mesmos caracteres apresentam mais de uma árvore filogenética resultante, sabemos que existe evidências de homoplasia entre tais caracteres.

Em análises genéticas, dois genes são considerados *Ortólogos* quando a sua homologia tenha ocorrido através de processos de especiação, apresentando portanto um mesmo ancestral comum. Em contrapartida, chamamos de *Parálogos* àqueles genes homólogos que resultaram de um evento de duplicação gênica dentro de um único genoma, podendo apresentar funções diferenciadas (Nei & Kumar, 2000).

A homologia é dada através do alinhamento de diferentes sequências de determinado grupo de táxons comparativos. O alinhamento dessas sequências nada mais é do que uma hipótese de homologia, onde, cada posição da base é tratada como um caráter, presumindo que essas posições sejam homólogas entre si (Amorim, 2002).

Quando desejamos inferir relações de determinados grupos taxônomicos partimos da idéia de que tal grupo em análise sempre seria *monofilético*, ou seja, as OTUs estudadas apresentam um mesmo ancestral comum. Esse é um ponto importante dentro das reconstruções filogenéticas, o conceito de *Monofilia.* A definição indica que um grupo monofilético é formado por uma espécie ancestral e todas as suas descendentes. Assim, podemos concluir que um grupo monofilético é reflexo do processo evolutivo pelo qual o grupo passou. Dessa maneira, entendemos que se trata de um *grupo natural*, ou seja, um produto do processo natural, evolutivo. Esses grupos incluiriam aqueles táxons que apresentam *sinapomorfias*, isto é, os caracteres derivados de um mesmo ancestral comum. Grupos não monofiléticos são denominados *Parafiléticos* ou *Polifiléticos*. Os *Parafiléticos* possuem suas unidades taxônomicas com caracteres *plesiomórficos* (primitivos) e nem todos os descendentes do ancestral comum deste grupo estão incluídos no *grupo interno*. Já os *Polifiléticos* apresentam táxons com caracteres diagnósticos homoplásicos, não sendo descendentes de um mesmo ancestral (Amorim, 2002).

A maneira mais empregada para se testar o monofiletismo de algum grupo em questão se dá através da inclusão de *grupos externos*, ou seja, unidades taxônomicas relativamente próximas, porém não pertencente ao grupo de análise, o chamado *grupo interno.* Por esse método, a polaridade do caráter é estabelecida por comparação com o seu estado em um ou mais grupos fora do conjunto investigado, e parte-se da idéia de que, se dentro do grupo interno, ocorrem dois ou mais estados de

um caráter, o estado ancestral é aquele encontrado também no grupo externo, enquanto que o estado derivado não, resultantes ou não de homoplasias.

1.2 A Ordem Siluriformes

A região Neotropical possui uma fauna de peixes extremamente diversificada. Estima-se, atualmente, a existência de cerca de 6.000 espécies em água doce apenas nessa região, quando, englobando todo o restante do mundo, teríamos algo em torno de 13.000 espécies nesse mesmo tipo de ambiente (Reis et al., 2003). Na região Neotropical, encontramos 71 famílias, num total de 4.475 espécies consideradas válidas e outras 1.550 ainda não descritas (Reis et al., 2003). 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.

A superordem Ostariophysi, com cinco ordens, cerca de 63 famílias, aproximadamente 1.000 gêneros e 6.500 espécies (Nelson, 2006), engloba aproximadamente 25% das espécies de teleósteos e 75% das espécies de água doce de todo o mundo (Fink e Fink, 1981). Esse é o grupo de peixes dominante na região Neotropical, onde são encontrados representantes das ordens Siluriformes, Gymnotiformes e Characiformes.

Os peixes da ordem Siluriformes, conhecidos popularmente como *bagres e cascudos*, formam o grupo natural melhor diagnosticado de peixes primariamente de água doce. Muitos representantes são aparentemente tolerantes apenas a tais

ambientes, porém, diversas espécies se extendem a águas levemente salinas, regiões estuarinas ou até mesmo pelos oceanos. Dentro de Ostariophysi, Siluriformes é a ordem mais diversificada e bem distribuída, incluindo 36 famílias, cerca de 477 gêneros e mais de 3.088 espécies, refletindo a sua complexidade taxonômica (Teugels, 1996; de Pinna, 1998; Diogo, 2003; Ferraris, 2007). Entre os Siluriformes neotropicais, foram descritas 1.648 espécies, divididas 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. Ferraris (2007) afirma em seus estudos que existem cerca de 230 espécies com problemas de posição taxonômica necessitando de estudos adicionais. Sabaj et al. (2004) já sugeríam que podíamos estimar a existência de cerca de 1.750 espécies ainda não descritas dentro de Siluriformes.

A ampla diversidade ecológica e evolutiva observada nesta ordem a faz foco de muitos estudos (Burgess, 1989; Fink e Fink, 1981, 1996; de Pinna, 1998; Arratia et al., 2003; Britto, 2003). Embora tal diversidade e distribuição atraiam grande interesse, esses dois fatores provavelmente respondem pelo pequeno número de estudos sobre as relações entre os grandes grupos de Siluriformes (Britto, 2003). Segundo Diogo (2003), muitos dos estudos pré-cladísticos sobre os relacionamentos entre os Siluriformes são confusos e questionáveis, com propostas de agrupamentos dos táxons tendo por base caracteres plesiomórficos e altamente homoplásticos ou embasamento pobre. Entretanto, o autor ressalta que tais trabalhos não devem ser ignorados.

Embora nos últimos anos notem-se progressos, a grande maioria dos estudos cladísticos sobre a filogenia dos Siluriformes é dedicada aos inter-relacionamentos em suas famílias (Diogo, 2003). Contudo, dois importantes trabalhos que atentam para uma análise filogenética mais global entre as famílias de Siluriformes

são o de de Pinna (1998) e o de Britto (2003), os quais se baseiam em uma grande quantidade de novos caracteres. Entre os tópicos abordados por de Pinna (1998), em seu estudo sobre as relações filogenéticas dos Siluriformes neotropicais, há uma comparação entre os resultados obtidos por de Pinna (1993), concluindo que existe concordância em alguns pontos destes trabalhos, que podem ser vistos como uma evidência de corroboração independente, apresentada em ambos, sobre as relações entre as famílias de Siluriformes.

A análise realizada por Britto (2003), com base em 331 caracteres morfológicos de representantes dos principais grupos da ordem Siluriformes indicou que algumas famílias formam agrupamentos polifiléticos e vários grupos tradicionais tiveram seu monofiletismo corroborado, concordando com as hipóteses previamente propostas por de Pinna (1993, 1998). Como exemplo, tem-se a posição basal da família Diplomystidae dentro da ordem, o monofiletismo da superfamília Loricarioidea e a relação entre suas familílias. Dentre as novas hipóteses, não foi confirmada a relação da família Pseudopimelodidae com o grupo formado por Sisoroidea, Loricarioidea e Amphiliidae, que se mostra agora mais relacionado a Heptapteridae e outros Siluriformes (Britto, 2003). Entre os grupos apresentados, os que possuem representantes na região neotropical são: Diplomystidae, Cetopsidae, Aspredinidae, Loricarioidea, Pseudopimelodidae, Heptapteridae, Doradoidea, Pimelodidae e Ariidae. O grupo-irmão de cada uma destas linhagens inclui alguns membros com distribuição fora da região neotropical (de Pinna, 1998; Britto, 2003). Possivelmente isto indica que a diversificação dos Siluriformes na região neotropical precede a separação entre a América do Sul e os outros blocos continentais, justificando, por exemplo, os componentes afro-neotropicais presentes em Siluriformes (de Pinna, 1998).

Poucos trabalhos baseados em dados moleculares objetivaram resoluções entre as famílias de Siluriformes (Hardman, 2005; Sullivan et al., 2006).

Hardman (2005), utilizando sequências do gene mitocondrial CytB de 170 espécies de 29 famílias, obteve uma grande politomia como resultado de sua análise. Tal topologia se deve, possivelmente, a escala de variação desta região genômica. A única exceção deu-se pelo reconhecimento de Heptapteridae como grupo-irmão de Pimelodidae e Pseudopimelodidae.

A análise de Sullivan et al. (2006), baseada em sequências dos genes nucleares RAG-1 e RAG-2, obteve a maior divergência com as hipóteses previamente conhecidas para Siluriformes (de Pinna 1993, 1998) devido ao posicionamento da superfamília Loricarioidea como grupo-irmão dos demais Siluriformes (Diplomystidae + Siluroidei). Mesmo definindo alguns grandes grupos dentro da ordem, as relações interfamiliares ainda permaneceram sem resolução (Sullivan et al., 2006)

1.3 A Família Loricariidae

A superfamília Loricarioidea é um dos grupos de Siluriformes mais bem estudado, onde encontramos três das famílias mais especiosas desta ordem, Loricariidae (716 espécies), Callichthyidae (194 espécies) e Trichomycteridae (207 espécies), entre outras (de Pinna, 1998; Britto, 2003; Reis, 2003; Ferraris, 2007). Assim, Loricarioidea corresponde a cerca de 60% dos Siluriformes neotropicais, sendo considerado o maior grupo monofilético de bagres neotropicais (de Pinna, 1998). Dentro desse grupo estão os três maiores gêneros de Siluriformes: *Hypostomus*, *Corydoras* e *Trichomycterus*, possuindo um grande número de espécies, muitas delas apresentando interesse econômico, principalmente como espécies ornamentais.

As hipóteses de relacionamento entre as famílias constituintes de Loricarioidea proposta por de Pinna (1998) e Britto (2003) mostram que as famílias Callichthyidae, Scoloplacidae, Astroblepidae e Loricariidae divergem de

Nematogenyidade e Trichomycteridae, com a formação de dois grupos, um com Nematogenyidae como grupo-irmão de Trichomycteridae e outro grupo os demais membros da superfamília, tendo Loricariidae e Astroblepidae como grupos-irmãos. Várias transformações de caracteres são conhecidas para os diferentes clados de Loricarioidea. Por outro lado, as filogenias apresentadas em de Pinna (1998) revelam que são relativamente poucas as hipóteses de relacionamento dentro das famílias de Loricarioidea.

A família Loricariidae, com aproximadamente 716 espécies (Ferraris, 2007), é a maior em número de espécies entre os Siluriformes e também uma das maiores famílias da ictiofauna mundial (Nelson, 2006). Essa família está distribuída 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. A grande maioria das espécies de loricariideos são peixes primários de água doce, ou seja, não toleram ambientes salobros e marinhos (Nelson, 2006). Pela alta especialização encontrada em sua morfologia, os Loricariidae compõem um dos grupos melhor caracterizados dentro de Siluriformes, sendo reconhecido como táxon válido já nas classificações mais antigas dentro dessa ordem.

Apesar dos loricariideos 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 diversidades de formas de todos os peixes do mundo e com uma das maiores complexidades taxonômicas. Isso é evidenciado pela diversidade encontrada em cada nova captura de exemplares em ambiente natural.

Baseando-se principalmente em musculatura cranial **(Figura 1)**, Howes (1983) apresenta uma primeira classificação filogenética para Loricariidae, reconhecendo Neoplecostominae, Chaetostominae, Loricariinae, Hypoptopomatinae e

Hypostominae como subfamílias. De acordo com Reis et al. (2003) existem seis subfamílias em Loricariidae: Hypoptopomatinae, Loricariinae, Hypostominae, Ancistrinae, Neoplecostominae e Lithogeneinae. Schaefer (1987) apresentou uma filogenia das subfamílias quando definiu seis grupos monofiléticos: Ancistrinae; Ancistrinae mais Hypostominae; Loricariinae; Ancistrinae, Hypostominae e Loricariinae; Hypoptopomatinae; Hypoptopomatinae, Loricariinae, Hypostominae mais Ancistrinae.

Um recente estudo realizado por Armbruster (2004) mostrou que essa divisão deve ser reavaliada uma vez que Lithogeninae pode ser mais relacionado com Astroblepidae e as únicas subfamílias demonstradas monofiléticas foram Hypoptopomatinae e Loricariinae **(Figura 4)**. Com o objetivo de estabelecer grupos naturais a subfamília Hypostominae foi redefinida com a exclusão de vários gêneros e a incorporação da antiga subfamília Ancistrinae. Assim, Hypostominae é agora divida em cinco tribos: Corymbophanini, Rhinelepini, Hypostomini, Pterygoplichthini e Ancistrini (Armbruster, 2004).

1.4 A Subfamília Hypoptopomatinae

A subfamília Hypoptopomatinae foi considerada monofilética por Schaefer (1998) incluíndo cerca de 70 espécies distribuídas em 12 gêneros. O autor, baseando-se em características morfológicas, divide tais gêneros em duas tribos, Hypoptopomatini e Otothyrini. Uma revisão mais recente aponta 17 gêneros presentes na subfamília Hypoptopomatinae e aproximadamente 100 espécies (Ferraris, 2007). A tribo Hypoptopomatini é composta pelos gêneros *Acestridium*, *Hypoptopoma*, *Oxyropsis*, *Niobichthys, Nannoptopoma* e *Otocinclus* e a tribo Otothyrini por *Eurycheilichthys*, *Epactionotus*, *Microlepidogaster*, *Hisonotus*, *Pseudotocinclus*, *Otothyris*, *Pseudotothyris*, *Schizolecis* e *Parotocinclus* (Schaefer, 1998). *Corumbataia* (Britski, 1997) e *Otothyropsis* (Ribeiro et al., 2005), novos gêneros de Hypoptopomatinae recentemente descritos e não incluídos na filogenia de Schaefer (1998) **(Figura 2)**, foram sugeridos como pertencentes à tribo Otothyrini (Britski, 1997, Gauger & Buckup, 2005, Ribeiro et al., 2005).

Baseando-se na grande quantidade de trabalhos de descrições taxonômicas publicados na década de 90, Reis e Schaefer (1998) afirmam que a diversidade a nível genérico e específico dos Hypoptopomatinae é muito maior do que conhecemos atualmente e que a classificação conhecida, até o presente momento, não é um reflexo satisfatório de toda a história evolutiva dentro desse grupo.

Os representantes dessa subfamília estão distribuídas ao longo das terras baixas da América do Sul cis-andina, da Venezuela até o norte da Argentina. Estes peixes geralmente são conhecidos como “cascudinhos” ou “limpa-vidros” no Brasil, onde o grupo é mais diversificado. Os Hypoptopomatinae, como outros membros da família, são primariamente herbívoros, mas, ao contrário de outros loricariídeos, encontrados primariamente junto ao fundo, os Hypoptopomatinae são encontrados em,

ou próximo, da porção superior da coluna d'água em associação direta com galhos de árvores submersos, macrófitas aquáticas e gramas crescendo ao longo das margens correntes e estendendo-se dentro da água (Schaefer, 1998).

Os Hypoptopomatinae apresentam tamanho pequeno a moderado [Comprimento padrão (SL) = 30-130 mm] e geralmente compartilham uma fisionomia adulta distinta para Loricariidae. De corpo alongado em sua maioria, poucos são fortemente deprimidos, compartilhando todos, uma morfologia peculiar no raio da peitoral, diagnóstico para a subfamília (Schaefer, 1991). A parte externa, lateral, do esqueleto da cintura peitoral em sua porção ventral pode ser comparável à porção lateral exposta do cleitro até a margem posterior do opérculo, encontrada em todos os membros da família, isto é, ao menos a porção ventro-lateral da cintura peitoral é exposta e não recoberta por pele. Este caráter era incluído e discutido na análise original de Schaefer (1991), mas foi excluído como autapomorfia para a subfamília e, consequentemente, não informativo para análises de relações entre Hypoptopomatinae com outros Loricariidae (Schaefer, 1998).

Schaefer (1998) adiciona outras seis sinapomorfias para os hypoptopomatíneos em sua última análise para o grupo: (1) presença de cápsula nasal ventralmente aberta; (2) osso pterótico perfurado por númerosas fendas; (3) presença de canal no metapterigóide; (4) fossas arretoras fechadas no esqueleto peitoral ventral; (5) presença de placa rostral medial no focinho; (6) odontóides espalhados nas margens ventral e dorsal do focinho.

O monofiletismo da tribo Hypoptopomatini é suportado por oito sinapomorfias, cinco das quais são caracteres usados na análise original de Schaefer (1991) e, duas dessas, não revertidas (Schaefer, 1998). Quatro caracteres não ambíguos suportam o monofiletismo da tribo Otothyrini, sendo que, a presença de

margem ventral do preopérculo refletida ventromedialmente é o único caráter mantido na última topologia de Schaefer (1998).

A família Loricariidae apresenta inúmeros problemas de classificação principalmente quando se trata das subfamílias (Schaefer, 1987; Armbruster, 1997). Montoya-Burgos et al. (1998) estudaram a família Loricariidae utilizando sequências parciais dos genes mitocondriais 12S e 16S rRNA de 58 espécies, sendo 12 gêneros de Hypostominae, 14 de Ancistrinae, 9 de Loricariinae, 5 de Hypoptopomatinae e 1 de Neoplecostominae, associadas a um método proposto pelos autores para reduzir os ruídos filogenéticos, causado pela ocorrência de múltiplas substituições. Como resultado desse trabalho, confirmou-se apenas o monofilestismo de Loricariinae, além de revalidar a maneira ampla de definir os Neoplecostominae **(Figura 3)**. As filogenias geradas mostraram também que parte dos Hypostominae e provavelmente de Loricariinae se separaram de um grupo primitivo de Ancistrinae. Dentre todas as espécies estudadas, a primeira a divergir foi *Hemipsilichthys gobio*, e os gêneros *Hypostomus* e *Hemipsilichtys* não formaram grupos monofiléticos. Tratando especificamente da posição do gênero *Pseudotocinclus*, o mesmo apresenta-se na filogenia bem próximo de *Pareiorhina* e formando um grupo irmão com o clado que inclui *Neoplecostomus* mais cinco espécies de Hypostominae. Tal resultado estaria de acordo com a sugestão expressa por Nichols (1919), que propôs *Pseudotocinclus* como intermediário entre Hypoptopomatinae e Hypostominae. Porém, ao mesmo tempo, causou espanto aos autores, já que se pensava que *Pareiorhina* era mais relacionado a *Isbrueckerichthys* (Derijst, 1996). Tal resultado fez também com que o monofilestismo de Hypoptopomatinae não pudesse ser corroborado (Montoya-Burgos et al., 1998).

Armbruster (2004), em um trabalho com caracteres de morfologia externa, osteologia e anatomia do trato digestivo da família Loricariidae, com ênfase nas

subfamílias Hypostominae e Ancistrinae, apresentou uma nova hipótese de relacionamento para Loricariidae **(Figura 4)**. Seus dados sugerem, entre outras coisas, que a família Hypoptopomatinae, apesar de monofilética, está intimamente relacionada com espécies da subfamília Neoplecostominae (sensu Armbruster, 2004), e seu *status* de subfamília deve ser reavaliado pois se admitirmos Hypoptopomatinae como subfamília, a subfamília Neoplecostominae torna-se parafilética. Armbruster (2004) não encontra o monofilestismo das tribos de Hypoptopomatinae, como proposto por Schaefer (1998), indicando o parafiletismo de Otothyrini devido a inclusão da monofilética Hypoptopomatini. Gauger & Buckup (2005) também questionam o monofiletismo de Otothyrini **(Figura 5)**. Estes resultados indicam uma necessidade de novas reconstruções filogenéticas para Hypoptopomatinae baseadas em dados independentes.

O estudo filogenético empregando sequências parciais de DNA mitocondrial em peixes é uma realidade bastante atual, o que pode ser confirmado pelo grande número de trabalhos publicados com essa abordagem (Cichlidae em Pérez et al., 2006; Clupeiformes em Lavouè et al., 2007; Cyprinidae em Pramuk et al., 2006 e Costedoat et al., 2006; Cotidae em Yokoyama e Goto, 2005; Gobioidei em Keith et al., 2005; Characiformes em Hubert et al., 2005; Cobitoidea em Tang et al., 2005; Perciformes em Doiuchi e Nakabo, 2006 e Sloss et al., 2004; Callichthyidae em Shimabukuro-Dias et al., 2004; Siganidae em Kuriiwa et al., 2007, dentre muito outros).

Uma outra abordagem baseada em sequências de DNA vem sendo utilizada em reconstruções filogenéticas para diversos grupos, onde o genoma mitocondrial completo tem sido sequenciado para diversos vertebrados, incluindo muitos peixes, onde podemos citar: *Cyprinus carpio, "*carpa comum" (Chang et al., 1994); *Petromyzon marinus,* "lampréia" (Lee e Kocher, 1995); *Gadus morhua,* "bacalhau" (Johansen e Bakke, 1996); *Latimeria chalumnae,* "celacanto" (Zardoya e

Meyer, 1997); *Pangasianodon gigas,* "catfish" (Jondeung et al., 2007), entre muitos outros.

Em tais estudos moleculares em peixes, dois grupos de genes mitocondriais costumam ser mais amplamente utilizados, os que codificam os rRNA ribossômicos e os que codificam as proteínas. Os genes ribossomais geralmente são muito conservados, mesmo contendo regiões que possuem variação que são suficientes para ser utilizadas em reconstruções filogenéticas no nível de espécie. Já nos genes mitocondriais que codificam proteínas, encontramos uma grande variedade de níveis de conservação. Por exemplo, o gene COI (Citocromo Oxidase I) é altamente conservado, enquanto os para ATPase 6 e 8 são altamente variáveis (Hillis et al., 1996).

O número de estudos publicados que usam genes nucleares em estudos filogenéticos ainda é pequeno em relação ao número daqueles que utilizam genes mitocondriais. Contudo, diversos trabalhos têm sido publicados nos últimos anos mostrando a utilidade desses genes em estudos de diversos grupos de peixes (Lovejoy e Collete, 2001; Lavoué et al., 2003; Crespi e Fulton, 2004; Hardman, 2004; Near et al., 2004; Moyer et al., 2004; Quenouille et al., 2004; Rüber et al., 2004; Calcagnotto et al., 2005; Sullivan et al., 2006; Chiachio et al., 2008) e espera-se que nos próximos anos muitas filogenias baseadas em genes nucleares estejam disponíveis. A elaboração de filogenias moleculares permite também testar hipóteses de relacionamento construídas com base em outros caracteres como os caracteres morfológicos.

Baseando-se na filogenia atual proposta por Armbruster (2004), onde é levantanda a hipótese dos hypoptopomatíneos não formarem um grupo natural dentro de Loricariidae, um estudo molecular desses indivíduos pode ser bastante útil para elucidar as reais relações do grupo com os demais loricariídeos e confirmar, ou não, a idéia do monofiletismo para o grupo em questão.

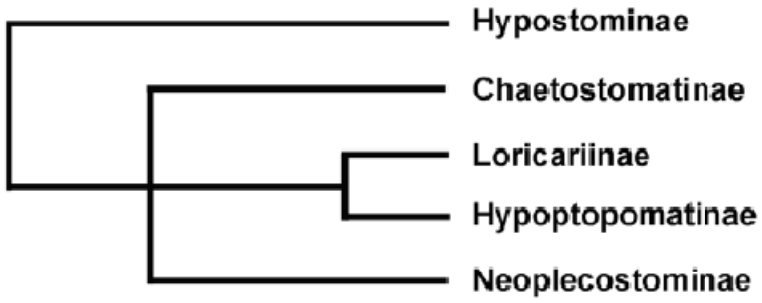

Figura 1. Relações filogenéticas proposta por Howes (1983) para as subfamílias de Loricariidae.

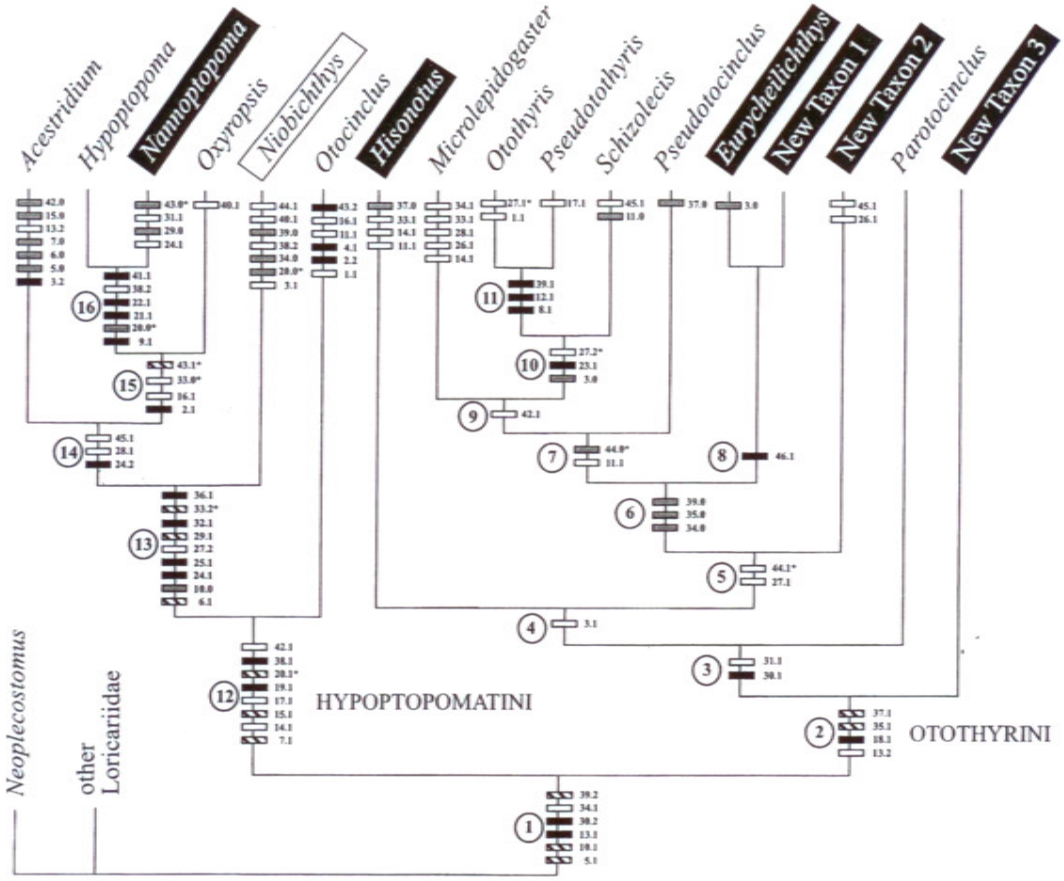

Figura 2. Cladograma mostrando as relações entre os gêneros de Hypoptopomatinae, segundo Schaefer (1998).

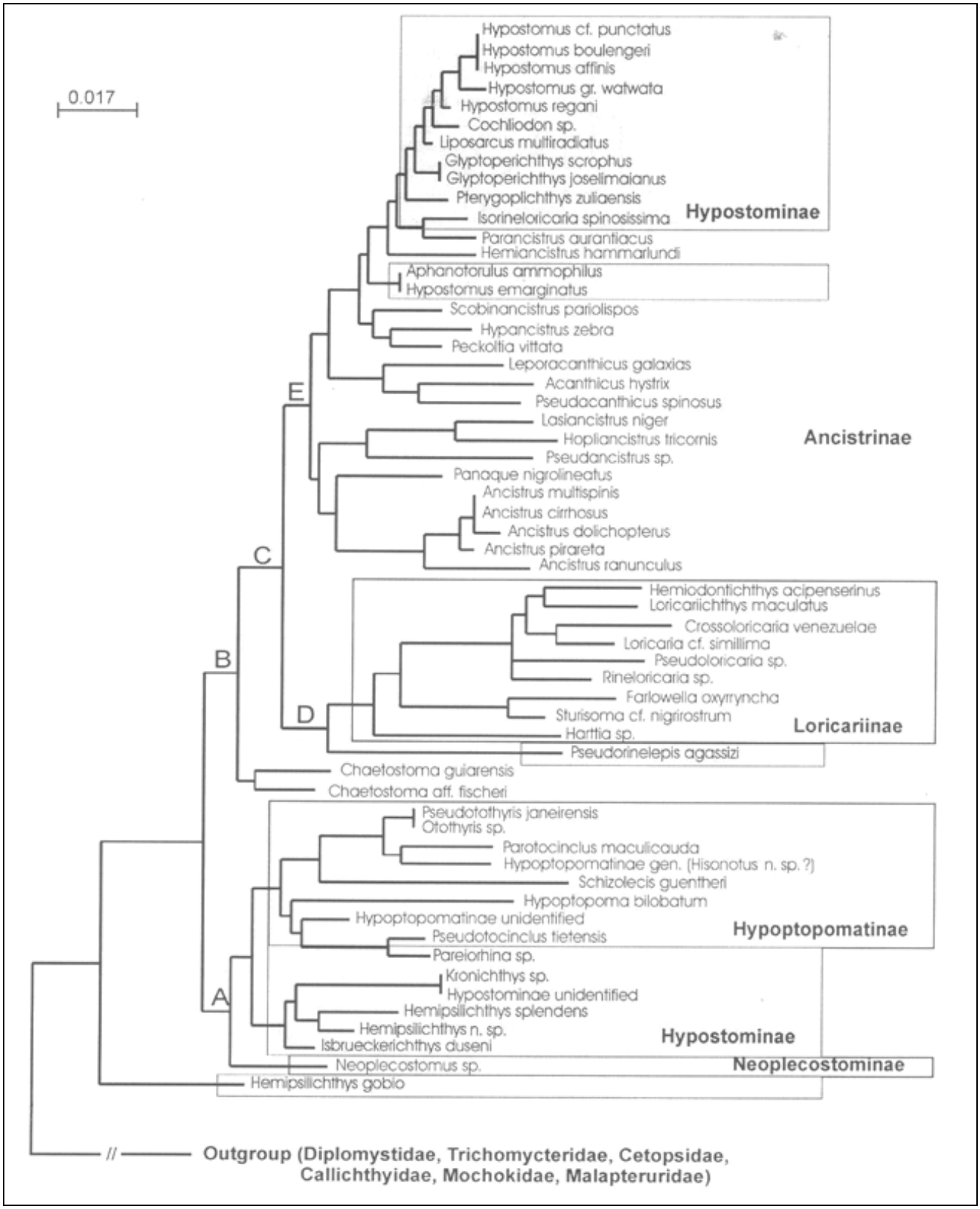

Figura 3. Relações filogenéticas proposta por Montoya-Burgos et al. (1998) para a família Loricariidae utilizando sequências parciais dos genes mitocondriais 12S e 16S rRNA.

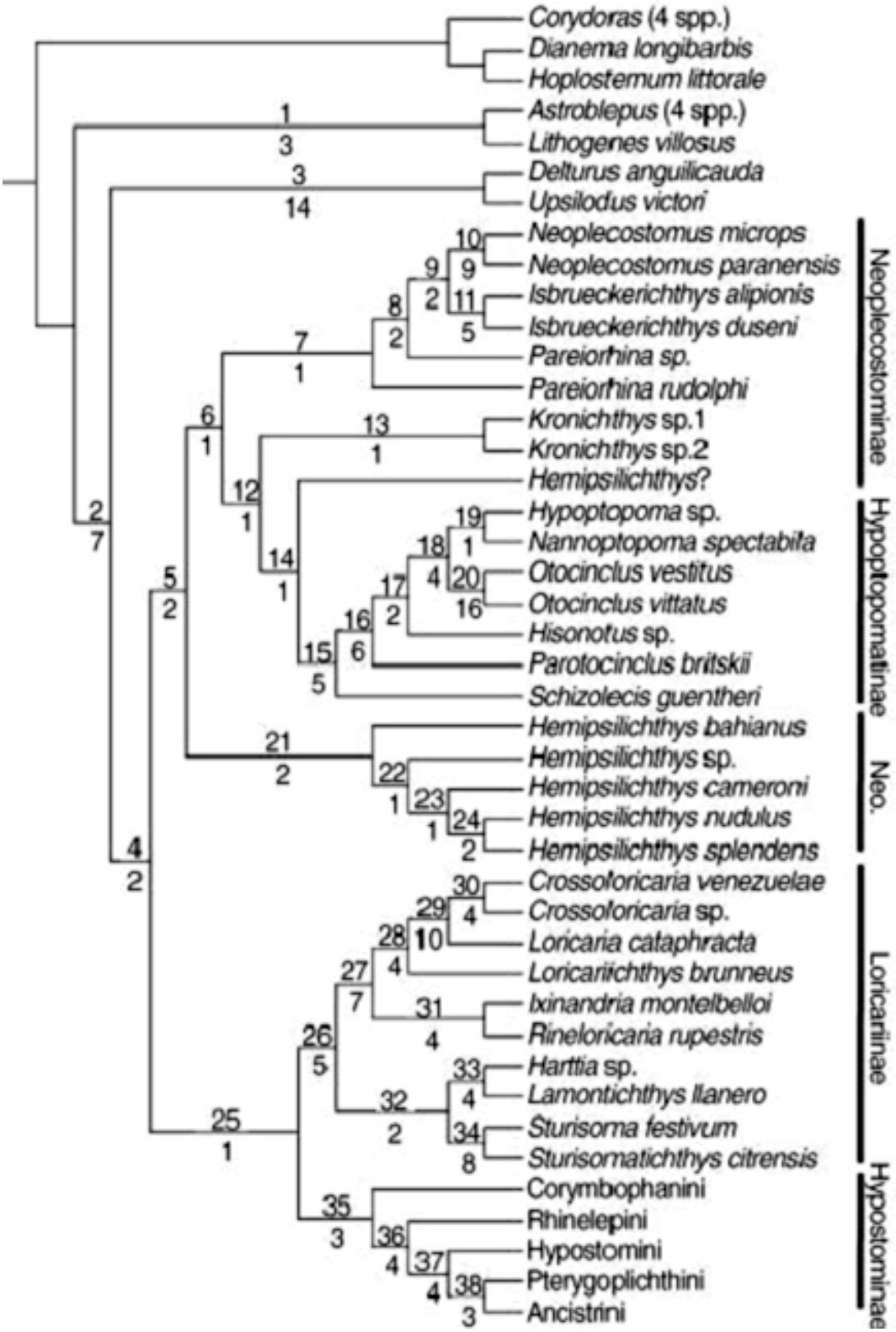

Figura 4. Filogenia da família Loricariidae baseada em caracteres morfológicos, segundo Armbruster (2004).

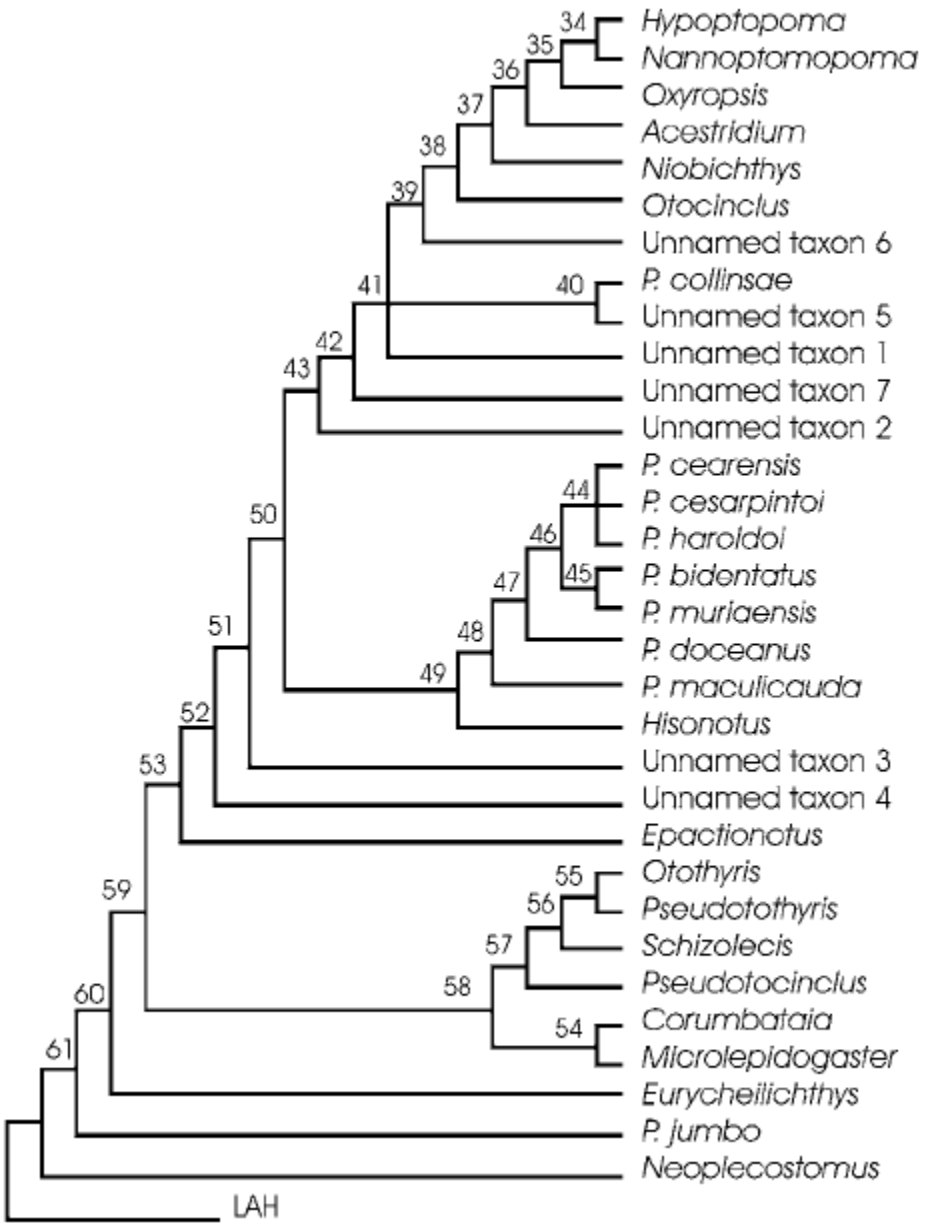

Figura 5. Filogenia da subfamília hypoptopomatinae baseada em caracteres morfológicos, segundo Gauger & Buckup (2005).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho está inserido em um amplo estudo das relações dentro e entre os membros da superfamília Loricarioidea. Como objetivos específicos temos:

1- Sequênciar segmentos do genoma mitocondrial e nuclear de representantes dos gêneros da subfamília Hypoptopomatinae e de gêneros relacionados, com o propósito de construir uma árvore filogenética para as espécies analisadas.

2- Realizar uma análise combinada dos dados obtidos no presente estudo para elaboração de uma árvore de consenso para os táxons analisados.

3. MATERIAIS

3.1 Grupo Interno

A lista de todos os 53 exemplares (16 gêneros) de Hypoptopomatinae analisados no presente trabalho é mostrada na **Tabela 1**. Suas localidades de coleta e dados de registro de tombo também estão relacionados nessa tabela.

Após o processamento, os peixes foram devidamente identificados e encontram-se depositados nas coleções de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brasil; da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil; do Laboratório de Ictiologia da UNESP (DZSJRP), São José do Rio Preto, SP, Brasil; e Muséum d'Histoire Naturelle de Genève (MHNG), Genébra, Suiça. A **Figura 6** apresenta imagens de espécies representantes dos gêneros constituintes da subfamília Hypoptopomatinae.

3.2 Grupo Externo

Paralelamente, a fim de se testar as reais relações dos representantes de Hypoptopomatinae com a subfamília Neoplecostominae, foram utilizados 11 indivíduos de quatro gêneros de Neoplecostominae em nossas análises. Para enraizarmos as árvores utilizamos amostras de duas espécies do gênero *Hemipsilichthys* pertencentes a subfamília Delturinae. Tais exemplares encontram-se listados na **Tabela 2** onde encontramos também suas localidades de coleta e dados sobre o seu tombamento. Os animais encontram-se depositados nas coleções de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brasil e Muséum d'Histoire Naturelle de Genève (MHNG), Genébra, Suiça.

Tabela 1. Indivíduos da subfamília Hypoptopomatinae utilizados no presente trabalho.

Espécie	Número de Catálogo	Número do espécime	Localidade
Acestridium discus	LBP-3165	19315	Rio Preto da Eva, Rio Preto da Eva, AM, Brasil
Acestridium sp.	LBP-7204	35332	Igarapé Ya-Mirim, São Gabriel da Cachoeira. AM. Brasil
Corumbataia cuestae	LBP-2001	12191	Rio Alambari, Botucatu, SP, Brasil
Corumbataia tocantinensis	LBP-1653	11477	Rio Vermelho, Goiás, Goiânia, Brasil
Epactionotus bilineatus	LBP-4871	24919	Rio Carvalho, São Francisco de Paula, RS, Brasil
Eurycheilichthys sp.	LBP-4723	24951	Arroio Jabuticaba, Veranópolis, RS, Brasil
Hisonotus charrua	LBP-4720	24941	Arroio Cuaró Grande, Artigas, Uruguai
Hisonotus luteofrenatus	LBP-7848	35749	Rio dos Patos, Nova Mutum, MT, Brasil
Hisonotus luteofrenatus	LBP-7848	35750	Rio dos Patos, Nova Mutum, MT, Brasil
Hisonotus luteofrenatus	LBP-7848	35752	Rio dos Patos, Nova Mutum, MT, Brasil
Hisonotus francirochai	LBP-5529	25381	Ribeirão Cubatão, Marapoama, SP, Brasil
Hisonotus insperatus	LBP-1412	311/03	Ribeirão Araquá, Botucatu, SP, Brasil
Hisonotus leucofrenatus	LBP-760	18218	Rio Passa Sete, Morretes, PR, Brasil
Hisonotus nigricauda	LBP-4719	25636	Arroio do Nariz, Rosário do Sul, RS, Brasil
Hisonotus ringueleti	LBP-4863	24930	Arroio Cuaró Grande, Artigas, Uruguai
Hisonotus sp.	LBP-5624	35326	Rio Maravilha, Balsas / MA
Hisonotus sp.	LBP-5624	35327	Rio Maravilha, Balsas / MA
Hypoptopoma guentheri	LBP-693	7084	Afluente rio Pirai, Poconé, MG, Brasil
Hypoptopoma gulare	LBP-3081	19713	Rio Orinoco, Caicara, Bolivar, Venezuela
Hypoptopoma inexpectatum	MHNG	PR-12	Rio Paraná, Santa Fé, Argentina
Hypoptopoma sp.	LBP-1693	12792	Lago do Vanico, Carero, AM, Brasil
Hypoptopoma sp.	LBP-4042	22905	Rio Moa, Cruzeiro do Sul, AC, Brasil
Microlepidogaster	LBP-7253	33309	Córrego sem nome (Dre. Rio Paranaíba / Bacia La Plata).Pires do Rio. GO. Brasil
Microlepidogaster sp.2	LBP-7244	33301	Afluente Rio Araguari, Perdizes, MG, Brasil
Microlepidogaster sp.2	LBP-7244	33302	Afluente Rio Araguari, Perdizes, MG, Brasil
Microlepidogaster sp.1	LBP-7245	33304	Afluente Rio Arapuca, Bela Vista de Goiás, GO. Brasil
Microlepidogaster sp.1	LBP-7245	34405	Afluente Rio Arapuca, Bela Vista de Goiás, GO. Brasil
Nannoptopoma sp.	MHNG	MUS-388	Export Iquitos, Upper Amazon basin, Peru
Otocinclus cf. mariae	MHNG	BR98-040	Rio Acará, PA, Brasil
Otocinclus cf. *mariae*	MHNG	SU07-350	Witoto Ecu creek, Sipaliwini, Suriname
Otocinclus cocama	MHNG	MUS-282	Bacia alto Rio Amazonas , Perú
Otocinclus flexilis	LBP-877	8564	St. Antônio da Patrulha, RG, Brasil
Otocinclus gibbosos	LBP-2652	17407	Rio Carombé, Campinhos, PR, Brasil
Otocinclus hoppei	MHNG	CA-25	Arroio Huangana, Alto Pisqui, Loreto/Ucay. Peru
Otocinclus hoppei	LBP-5310	26831	Igarapé Uiratapuru, Laranjal do Jari, AM, Brasil
Otocinclus vittatus	LBP-5132	26233	Lagoa Bairro Caiçara, Cáceres, MG, Brasil
Otothyris juquiae	LBP-2094	13851	Riacho Descoberto, Guaratuba, PR, Brasil
Otothyris travassossi	LBP-1971	13685	Riacho Rosário, Canavieiras, BA, Brasil
Otothyropsis marapoama	LBP-5528	25343	Ribeirão Cubatão, Marapoama, SP, Brasil
Oxyropsis acutirostra	LBP-4300	23945	Igarapé Zamula, Barcelos, AM, Brasil
Oxyropsis sp.	LBP-6973	35324	Igarapé Demuriari, São Gabriel da Cachoeira. AM. Brasil

(continua…)

Espécie	Número de Catálogo	Número do espécime	Localidade
Parotocinclus britskii	MHNG	GY04-351	Bacia Rio Orinoco, Drenagem Costeira, Guianas
Parotocinclus eppleyi	LBP-4787	25579	Caño Tama Tama, AM, Venezuela
Parotocinclus maculicauda	LBP-2869	18571	Rio Fau, Miracatu, SP, Brasil
Parotocinclus sp.	LBP-6950	35328	Igarapé Nouba-Uba, São Gabriel da Cachoeira. AM. Brasil
Pseudotocinclus juquiae	LBP-1160	9664	Rio Ribeira de Iguape, Juquitiba, SP, Brasil
Pseudotocinclus tietensis	LBP-2931	18994	Rio Paraitinga, Salesópolis, SP, Brasil
Pseudotothyris obtusa	LBP-4722	24946	Lago Acaraí, São Francisco do Sul, SC, Brasil
Schizolecis guntheri	LBP-3238	19471	Rio Garuva, Garuva, SC, Brasil
Schizolecis guntheri	LBP-2401	15272	Rio São Pedro, Glicério, RJ, Brasil
Schizolecis guntheri	LBP-2513	15240	Rio Macacu, Itaboraí, RJ, Brasil
Schizolecis guntheri	LBP-2514	13846	Rio Sagrado, Morretes, PR, Brasil
Schizolecis guntheri	LBP-2988	19646	Rio Indaiá, Ubatuba, SP, Brasil

Tabela 2. Indivíduos das subfamílias Neoplecostominae e Delturinae utilizados no presente trabalho como grupo externo.

Espécie	Número de Catálogo	Número do espécime	Localidade
Subfamília Neoplecostominae			
Neoplecostomus microps	LBP-645	7593	Ribeirão Cajarana, Pidamonhangaba, SP, Brasil
Neoplecostomus microps	MHNG 2588.002	BR1283	Ribeirão Benfica, São Paulo, Brasil
Isbrueckerichthys duseni	LBP-2650	17404	Rio Pulador, Campinhos, PR, Brasil
Isbrueckerichthys alipionis	MHNG 2586.80	BR1187	Rio Betari, Iporanga, SP, Brasil
Isbrueckerichthys alipionis	LBP-7373	34853	Rio Betari, Iporanga, SP, Brasil
Pareiorhaphis splendens	MHNG 2586.47	BR1148	Rio Araraquara, Santa Catarina, Brasil
Pareiorhaphis steindachneri	LBP-902	7989	Rio Itapocu, Jaraguá do Sul, SC, Brasil
Pareiorhaphis azygolechis	MHNG 2586.49	BR1152	Rio Araraquara, Santa Catarina, Brasil
Pareiorhina rudolphi	MHNG 2587.22	BR1229	Ribeirão Benfica, São Paulo, Brasil
Pareiorhina sp	LBP-4391	24188	Ribeirão Guaxinduva, São Paulo, Brasil
Pareiorhina sp	LBP-4391	24189	Ribeirão Guaxinduva, São Paulo, Brasil
Subfamília Delturinae			
Hemipsilichthys gobio	LBP-2368	15363	Rio Macaquinho, Bairro dos Macacos, SP, Brasil
Hemipsilichthys papillatus	LBP-4956	10241	Ribeirão da Jacutinga, B.Jd. de Minas, Minas Gerais, Brasil

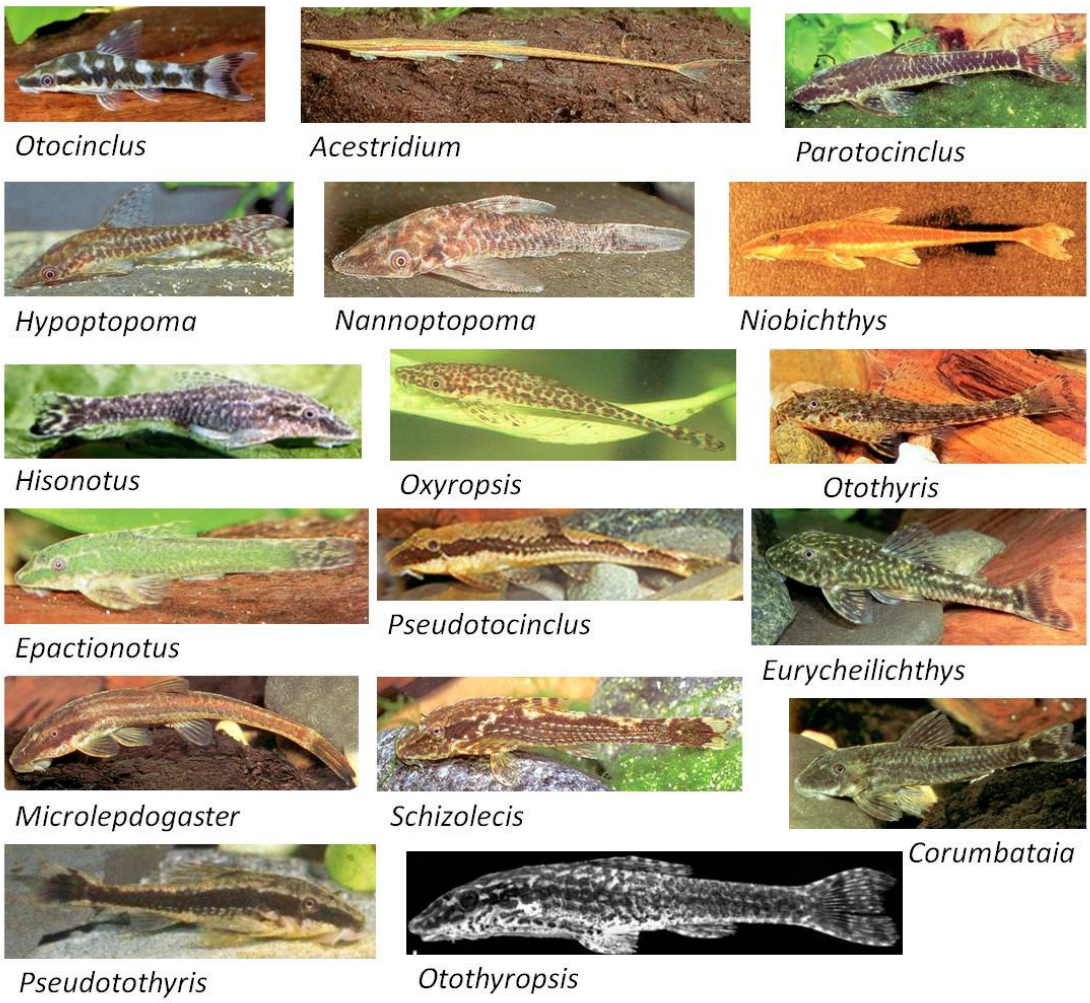

Figura 6. Imagens de espécies representativas para os 17 gêneros da subfamília Hypoptopomatinae. Fonte: Evers & Seidel (2005) e Ribeiro et al., 2005 (*Otothyropsis*).

4. MÉTODOS

4.1 Extração de DNA Genômico

O DNA foi obtido a partir de amostras de músculo preservadas em etanol 95%, seguindo diferentes metodologias:

4.1.1 Extração por Fenol-Clorofórmio (Sambrook et al., 2001)

1. Prepara-se uma solução MIX contendo:

Soluções	Volume / 1 amostra
EDTA 0,5M	25,0 µl
SDS 10%	25,0 µl
NaCl 5M	10,0 µl
Proteinase	5,0 µl
Tris HCl 2M	2,5 µl
H_2O (completar para 500 µl)	432,5 µl
Volume Final	**500 µl**

2. Em um cadinho, dissocia-se a amostra juntamente com a solução MIX e transfere-se a solução obtida para um tubo 1,5 ml;
3. Deixa-se em banho-maria (50°C) por 2 horas, vertendo-os esporadicamente;
4. Em uma Capela, realiza-se a primeira lavagem com Fenol, adicionando 500 µl de Fenol em cada tudo, dobrando o volume inicial;
5. Verte-se o tubo por aproximadamente 15 minutos;
6. Centrifuga-se por 15 minutos a 14.000 rpm;
7. Com cuidado, retira-se o sobrenadante e transfere-se para outro tubo e então se realiza a segunda lavagem repetindo os passos 5, 6 e 7;
8. Na terceira lavagem, adiciona-se 250 µl de Fenol e 250 µl de Clorofórmio;
9. Centrifuga-se por 15 minutos a 14.000 rpm;
10. Precipita-se com 1/10 do volume inicial (50µl) de NaCl 5M + 2X o volume (1000µl) de Etanol gelado 100%;
11. Se houver a formação de nuvens, coleta-se o material e coloca-se em outro tubo com 1000µl de Etanol 70% gelado, ou senão;
12. Deixa-se por uma noite (*"overnight"*) no freezer –20°C;
13. Centrifuga-se por 30 minutos e descarta-se o sobrenadante;
14. Adiciona-se 800 µl de Etanol 70% gelado;

15. Centrifuga-se por 15 minutos e descarta-se o sobrenadante;
16. Deixa-se secar durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente;
17. Elui-se com TE ou H_2O adicionando cerca de 300 µl, de acordo com o tamanho do pellet formado no fundo do tubo;
18. Trata-se com 1,5 µl de RNAse em banho-maria 1h à 37°C, depois novamente por 10 minutos à 65°C.

4.1.2 Extração por Tampão de extração (Aljanabi & Martinez, 2001)

1. Prepara-se uma solução MIX contendo:

Soluções	Volume / 1
Tampão de Extração (Tris-HCl + EDTA + SDS 1%)	290,0 µl
Proteinase K (10 mg/ml)	10,0 µl

2. Em um cadinho, dissocia-se a amostra juntamente com a solução MIX (sem a Proteinase K) e transfere-se a solução obtida para um tubo 1,5 ml;
3. Adciona-se a Proteinase K e deixa-se em banho-maria (55°C) por 2 a 3 horas, vertendo-os esporadicamente;
4. Colocar 100 µl de solução de NaCl 5M e misturar bem vertendo o tubo vagarosamente;
5. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente;
6. Remover 300 µl de sobrenadante e transferir para um novo tubo de 1,5 ml;
7. Adicionar 600 µl de etanol 100% gelado;
8. Deixar no ultrafreezer (-70ºC) por 20 minutos;
9. Centrifugar a 14.000 rpm por 30 minutos a 4ºC;
10. Remover o sobrenadante;
11. Secar bem (pode-se deixar em estufa a 37ºC por até 30 minutos ou então por uma noite em temperatura ambiente).
12. Adicionar 200 µl de água ultrapura autoclavada. Aguardar por pelo menos 24 horas para hidratação;
13. Aliquotar o DNA e guardar cerca de 150 µl no freezer (-20ºC) para solução estoque e o restante na geladeira (4ºC) para a solução de trabalho.

4.1.3 Extração por Kit Comercial ("DNeasy Tissue Kit" – Qiagen Peqlab)

1. Coloque a amostra em um tubo 1,5 ml e transfira o mesmo a um "banho seco" (Block) à 55°C por cerca de 25 minutos até a secagem completa de todo o álcool presente na amostra;
2. Com o auxílio de um pequeno bastão plástico (*piston*) macere toda a amostra;
3. Adicione 200 µl de Tampão de Extração (Tris HCl pH8.0 10mM + EDTA pH8.0 10mM + NaCl 50mM + SDS 0,5%) à amostra;
4. Macere novamente o tecido com o bastão;
5. Adicione 25 µl de Proteinase K (20 mg/ml) e passe o tubo no vórtex ligeiramente;
6. Coloque o tubo num block aquecido a 55°C e deixe por uma noite para a digestão completa do tecido;
7. Após a digestão retire o tubo do Block e Centrifugue a 6.000 rpm por 5 segundos (*spin*);
8. Adicione 220 µl de Tampão BL e passe no vórtex ligeiramente;
9. Transfira o tubo para um block programado a 70°C e deixe por 10 minutos;
10. Centrifugue a 6.000 rpm por 5 segundos (*spin*);
11. Adicione 220 µl de EtOH 100% e passe no vórtex;
12. Centrifugue a 6.000 rpm por 5 segundos (*spin*);
13. Transfira o conteúdo do tubo (digestão) para uma coluna acoplada a um tubo coletor, ambos devidamente identificados;
14. Centrifugue por 1 minuto a 10.000 rpm;
15. Transfira a coluna para um novo tubo coletor e descarte o anterior;
16. Adicione 600 µl de Wash Buffer (preparado com EtOH) na coluna;
17. Centrifugue por 1 minuto a 10.000 rpm. Descarte o líquido do tubo coletor e o acople novamente à coluna;
18. Adicione novamente 600 µl de Wash Buffer (preparado com EtOH) na coluna;
19. Centrifugue por 1 minuto a 10.000 rpm. Descarte o líquido do tubo coletor e o acople novamente à coluna;
20. Prepare o Elution Buffer aquecendo-o à 70°C;
21. Centrifugue a coluna (vazia) acoplada ao mesmo tubo coletor por 2 minutos a 13.000 rpm, para a secagem completa da coluna;
22. Transfira a coluna para um novo tubo 1,5 ml e descarte o tubo coletor;
23. Adicione à coluna 200 µl de Elution Buffer pré-aquecido;
24. Coloque o tubo 1,5 ml com a coluna num block a 70°C por 3 minutos;
25. Centrifugue por 1 minuto a 10.000 rpm;
26. Aliquotar o DNA e guardar cerca de 150 µl no freezer (-20ºC) para solução estoque e o restante na geladeira (4ºC) para a solução de trabalho.

4.2 Amplificação dos Segmentos de DNA

As amostras utilizadas no presente trabalho tiveram suas regiões parciais dos genes mitocondriais 16S rRNA e Citocromo Oxidase I e a região correspondente ao gene nuclear F-Reticulon4 amplificadas pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).

O gene F-Reticulon4, também conhecido como RTN4 ou Nogo, possui duas regiões exônicas e duas intrônicas. Codifica para uma proteína integrante da membrana predominantemente presente no sistema nervoso e foi analisado intensivamente em mamíferos (Yan et al., 2006) e em peixes (Diekmann et al., 2005).

O gene 16S rRNA, componente da subunidade ribossomal maior do mtDNA juntamente com o 12S rRNA, possui suas sequências razoavelmente conservadas, com uma evolução mais lenta em comparação com o genoma mitocondrial como um todo (Palumbi et al., 1996). Porém, o autor afirma a existência de uma variação considerável, fazendo com que tais sequências possam ser utilizadas em reconstruções a nível de população. O gene da subunidade citocromo oxidase, participante também da cadeia transportadora de elétrons (Palumbi et al., 1996), tem suas sequências de nucleotídeos altamente conservadas, característica importante, pois o torna de fácil alinhamento e com simplicidade também para o desenho de primers universais.

O desenho dos *primers* utilizados possuem as sequências mostradas na tabela abaixo (**Tabela 3**).

TABELA 3: Lista de primers e respectivos sítios de anelamento utilizados no presente trabalho.

Região	Nome	Referência	Sequência do Primer
16S rRNA	16S F 16S R	KOCHER *et al.*, 1989	5' ACG CCT GTT TAT CAA AAA CAT 3' 5' CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T 3'
Citocromo Oxidase I	L5698-Asn F H7271-COI R	Dr. Claudio de Oliveira	5' AGG CCT CGA TCC TAC AAA GKT TTA GTT AAC 3' 5' GTG GTG GGC TCA TAC AAT AAA 3'
F-Reticulon4	Freticul4-D Freticul4-R Freticul4- Freticul4-	Dr. Juan Montoya-Burgos	5' AGG CTA ACT CGC TYT SGG CTT TG 3' 5' GGC AVA GRG CRA ART CCA TCT C 3' 5' CTT TGG TTC GGA ATG GAA AC 3' 5' AAR TCC ATC TCA CGC AGG A 3'

O gene de F-reticulon4 (**Figura 7**) foi amplificado utilizando duas rodadas de PCR; a primeira PCR foi executada com os primers externos Freticul4-D e Freticul4-R e a segunda PCR foi executada com os primers internos Freticul4-D2 e Freticul4-R2, como determinado em Montoya-Burgos et al. (em preparação). Nos casos onde o produto obtido apresentou-se fraco, utilizamos um novo conjunto de primers ligeiramente internos com a seguinte sequência: FReticul4-D2.1 (5'-GAA GCT CCA TRR CGC AYG CA-3').

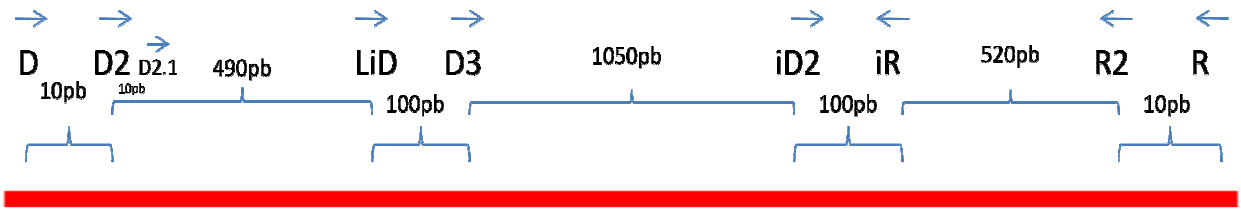

FIGURA 7: Representação de um segmento do gene F-reticulon4, com a região de anelamento dos primers que foram utilizados para amplificação e posterior sequenciamento desse gene. (Primers iD2 e iR foram utilizados apenas para a reação de sequenciamento).

Para as reações de PCR foi utilizado o kit GoTaq Promega. Nesse kit a *Taq* Polimerase já possui o tampão *Buffer* e dNTP em concentrações ótimas para a reação. Os procedimentos foram:

4.2.1 Genes mitocondriais

1. Em um tubo 1.5 ml prepara-se uma reação MIX, descrita abaixo. Multiplicam-se os valores de acordo com o número de reações a serem amplificadas.
   O volume para cada reação é:

Soluções	
GoTaq	6.5 µl
Primer F	1,0 µl
Primer R	1,0 µl
H_2O Autoclavada	5,5 µl
DNA genômico	1,0 µl
Volume Final	15,0 µl

2. Leva-se os tubos a um termociclador e realiza-se o seguinte programa:

Passo	Processo	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação Inicial	94º C	3′
2	Desnaturação	94℃	30″
3	Anelamento	48-56℃	1′
4	Extensão	72℃	2′
5	Volta para o passo 2	-	35X
6	Extensão Final	72℃	5′

3. As amostras, após a amplificação, são checadas em gel de agarose 1%.

4.2.2 Gene nuclear

1. Em um tubo de 1,5 ml prepara-se uma reação MIX, descrita abaixo. Multiplicam-se os valores de acordo com o número de reações a serem amplificadas.
   O volume para cada reação é:

Soluções	
GoTaq	6.5 µl
Primer F	1,0 µl
Primer R	1,0 µl
H_2O Autoclavada	5,5 µl
DNA genômico	1,0 µl
Volume Final	15,0 µl

2. Leva-se os *eppendorfs* a um termociclador e realiza-se o seguinte programa:

Passo	Processo	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação Inicial	95ºC	3′
2	Desnaturação	95°C	30″
3	Anelamento	48°C	30″
4	Extensão	72°C	2′:15″
5	Volta para o passo 2	-	37-45X
6	Extensão Final	72°C	5′

3. As amostras, após a amplificação, são checadas em gel de agarose 1%.

Um exemplo de resultado padrão obtido nessa primeira reação de PCR está apresentado na **Figura 8A**.

Após essa etapa uma nova amplificação foi realizada com uma temperatura de anelamento mais elevada, utilizando-se os primers F-Reticul-D2 e F-Reticul-R2 (representados com suas regiões de anelamento na **Figura 7**), seguindo o seguinte protocolo de reação:

Soluções	
GoTaq	6.5 µl
Primer F	1,0 µl
Primer R	1,0 µl
H_2O Autoclavada	5,5 µl
Produto de PCR da primeira reação - Diluído 1/20	1,0 µl
Volume Final	15,0 µl

1. Leva-se os *eppendorfs* a um termociclador e realiza-se o seguinte programa:

Passo	Processo	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação Inicial	94º C	3′
2	Desnaturação	94°C	30″
3	Anelamento	54°C	30″
4	Extensão	72°C	2′:15″
5	Volta para o passo 2	-	37-45X
6	Extensão Final	72°C	5′

2. As amostras, após a amplificação, são checadas em gel de agarose 1%.

Um exemplo de resultado padrão obtido nessa segunda reação de PCR está apresentado na **Figura 8B**.

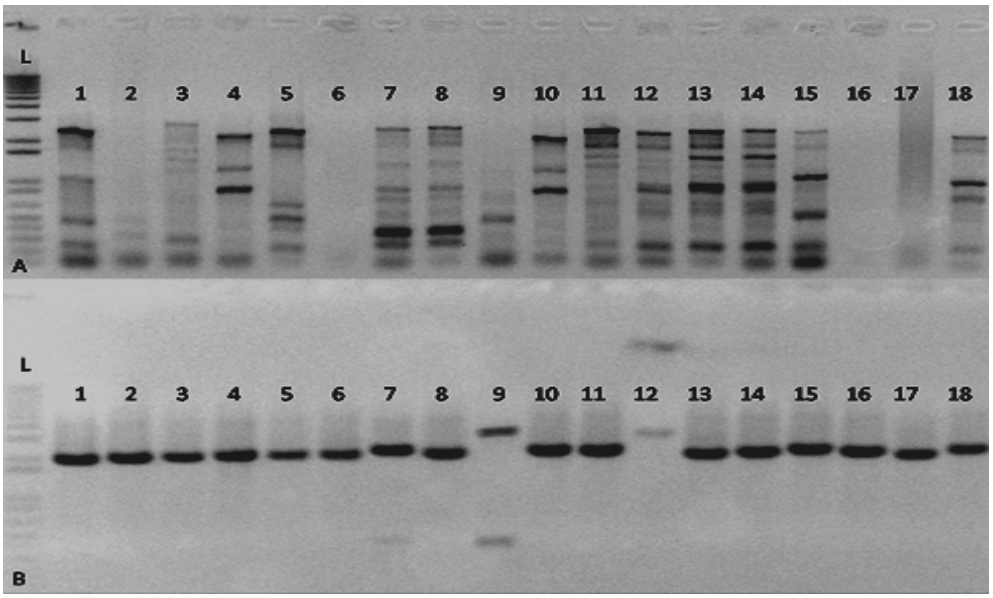

FIGURA 8: Fotografia do gel de agarose 1.0% após a eletroforese, representando com bandas o resultado positivo de amplificações: "L" representa a região de "corrida" do Ladder. **A.** Primeira reação de amplificação do gene nuclear F-Reticulon4, onde apresentam-se muitas amplificações inespecíficas, arrastos ou até mesmo banda alguma. **B.** Segunda reação de amplificação do gene nuclear F-Reticulon4, onde evidenciam-se apenas amplificações específicas, com bandas de aproximadamente 2000 pb. Os números representam amostras.

4.3 Purificação das Amostras Amplificadas

Após checagem da amplificação, o produto de PCR (MITOCONDRIAL) passou por reação de limpeza através da enzima ExoSap-IT® (Exonuclease I: Recombinant SAP: *Pandalus borealis* - USB Corporation) seguindo o seguinte procedimento:

1. Em um tubo 0,2 ml prepara-se uma reação contendo **5,0 µl** do DNA amplificado juntamente com **2,0 µl** da enzima ExoSap-IT® e leva-se para o termociclador para a realização do seguinte programa:

Passo	Temperatura	Tempo
1	37º C	15′
2	80℃	15′

As amplificações das regiões NUCLEARES foram purificadas utilizando o Kit comercial *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche) seguindo o procedimento:

1. Transfira 25 µl de produto de PCR amplificado para a coluna (*High Pure Filter Tube*) e acople a coluna num tubo coletor (*Collection Tube*);
2. Adicione em cada coluna 250 µl de *Binding Buffer* (Tampão de captura);
3. Centrifugue por 1 minuto em 13.000 rpm em temperatura ambiente;
4. Descarte o liquido do tubo coletor e acople o mesmo novamente a coluna;
5. Adicione 250 µl de *Wash Buffer* (Tampão de Lavagem);
6. Centrifugue por 1 minuto em 13.000 rpm em temperatura ambiente;
7. Descarte o liquido do tubo coletor e acople o mesmo novamente a coluna;
8. Adicione 100 µl de *Wash Buffer* (Tampão de Lavagem);
9. Centrifugue por 1 minuto em 13.000 rpm em temperatura ambiente;
10. Descarte o liquido do tubo coletor e acople a coluna num tubo 1,5 ml;
11. Adicione 25 µl de *Elution Buffer* (Tampão de Eluição);
12. Centrifugue por 1 minuto em 13.000 rpm em temperatura ambiente.

4.4 Reação de PCR para Sequenciamento

Para a reação de PCR foi utilizado o Kit "Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystems). O procedimento utilizado foi o seguinte:

1. Prepara-se uma amostra e duas réplicas para cada região a ser sequenciada e para isso, prepara-se uma solução MIX, para cada um dos primers, contendo:

Soluções	Volume
DNA (Amplificado e limpo)	2,0 µl
Primer (Diluído na proporção 3:1)	2,0 µl
Solução Pré-MIX (nucleotídeos marcados com fluorescência)	2,0 µl
H_2O Autoclavada	3,0 µl
Volume Final	9,0 µl

OBS: para o gene nuclear F-Reticulon4 o produto da segunda reação de amplificação limpo pela ExoSap-IT® foi diluído novamente na proporção 1/20 para posterior reação de sequenciamento.

2. Leva-se os tubos a um termociclador e realiza-se o seguinte programa:

Passo	Processo	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação	94º C	3′
2	Desnaturação	94 °C	30″
3	Anelamento	56 °C	1′
4	Extensão	72 °C	2′
5	Volta para o		35X
6	Extensão Final	68 °C	4′

4.5 Limpeza do PCR de Sequenciamento

1. Adiciona-se em cada tubo 0.7 µl de EDTA (125mM);
2. Adiciona-se 0.7 µl de Acetato de Sódio (3 M);
3. Homogeneizar e passar numa microcentrifuga (*spin*) brevemente;
4. Adicionar 17,5 µl de Etanol 100%;
5. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente;
6. Centrifuga-se por 15 min, 13.000 rpm à 25°C;
7. Descartar o Etanol em papel toalha;
8. Adiciona-se 24,5 µl de Etanol 70% Gelado;
9. Centrifuga-se por 10 minutos, 13.000 rpm à 25°C;
10. Descartar o Etanol em papel toalha;
11. Repetir passo 8 a 10 (lavagem com Etanol 70%);
12. Secar em termociclador por 2 minutos a 96°C;
13. Guarda-se os tubos, já secos, no freezer à 4°C envolto em papel alumínio, até o momento do sequenciamento;

4.6 Sequenciamento de DNA

As sequências dos genes utilizados no presente trabalho foram obtidas através da técnica de sequenciamento por capilaridade num sequenciador Modelo ABI 3130 – Applied Biosystems, no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu e no *MolBioAni Laboratory* – Molecular Systematic Group, na Université de Genève – Faculté des Sciencies, técnico responsável Dr. José Fahrni, em Genébra, Suiça.

4.7 Obtenção das sequências consenso

Após o sequenciamento das amostras e suas réplicas, as sequências obtidas para o conjunto de primers para cada gene foram analisadas com a visualização simultânea do eletroferograma originário do processo de sequenciamento

automático. Isso possibilita que as sequencias consenso de cada gene sejam obtidas com um maio grau de precisão. Tais sequências foram então passadas para um editor de texto, nomeadas separadamente e salvas em um único arquivo em formato de texto sem formatação (extensão .txt).

4.8 Análise Filogenética

4.8.1 Alinhamento das sequências

Diferentes programas e algoritmos foram testados a fim de se obter um alinhamento mais próximo do final, para que a matriz sofresse a menor interferência possível. Foram testados o programa DAMBE 4.1.27 (Xia e Xie, 2001), BioEdit (Hall, 1999) com o algoritmo ClustalW (Thompson et al., 1994), Geneious 3.8.5 (Biomatters Ltd.) e CLC Sequencer Viewer 5.0 (CLC Bio A/S) também com o algoritmo ClustalW (Thompson et al., 1994). No Geneious 3.8.5 e CLC também foi testado o alinhamento a partir dos algoritmos dos próprios programas. O algoritmo MUSCLE gerou os melhores resultados tanto acoplado aos programas CLC e Geneious quanto o disponível no link "http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html", que foi o utilizado na análise final devido a sua praticidade.

Posteriormente, o alinhamento foi exportado numa matriz salva como arquivo FASTA e importada no programa BIOEDIT efetuando, quando necessário, as correções manuais do alinhamento. O BioEdit é um programa de edição de sequências biológicas que permite edição, alinhamento, manipulação e análise tanto de sequências de nucleotídeos como de proteínas. Possibilita a fácil visualização do resultado do alinhamento através da utilização de códigos de cores para cada nucleotídeo e possibilita a edição manual das sequências, tanto de forma isolada como em grupos, simplificando o processo de correção, quando necessário, das mesmas, já que, a qualidade do alinhamento é fundamental para as análises, uma vez que a comparação

é feita em função das posições dos nucleotídeos nas sequências. Os algoritmos descritos anteriormente são largamente utilizadas em biologia molecular e facilitam esse processo de preparação dos dados isolados, que constitui um fundamental passo para a obtenção de um resultado confiável.

4.8.2 Análise dos dados

Três matrizes independentes contendo sequências separadas e conjuntas de genes foram elaboradas para as análises. A primeira matriz com apenas as sequências parciais dos genes mitocondriais 16S rRNA e Citocromo Oxidase I para os representantes das subfamílias Hypoptopomatiane e Neoplecostominae. A matriz de número dois continha apenas as sequências referentes ao gene nuclear F-Reticulon4 para as mesmas amostras da primeira matriz. A última matriz apresenta de maneira conjunta, sequências de todos os três genes analisados no presente trabalho. Em todas as matrizes, espécies do gênero *Hempsilichthys* foram utilizadas como grupo externo em nossas análises.

Para verificar se o número de transições e de transversões de nossas matrizes de dados atingiram o nível de saturação, isto é, se ocorreu mais do que uma substituição em determinados sítios, foram construídos gráficos, onde o eixo X representa os valores das distâncias de cada par de táxons usados e o eixo Y o número de transição (TS) ou de transversão (TV) presentes em cada par. No caso de não haver saturação, a relação entre estes parâmetros é linear, isto é, com o aumento da distância, há o aumento do número de TS ou TV. Se houver substituições múltiplas, o gráfico atinge uma situação no qual aumentando-se a distância, não há o aumento no número de TS ou TV. Tal análise foi estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros com o auxílio do programa DAMBE (Xia e Xie, 2001).

A escolha do melhor modelo de substituição nucleotídica (evolução

genética) para cada matriz foi realizada com o programa Modeltest 3.06 (Posada e Crandall, 1998) e estão listados abaixo (**Tabela 4**). O modelo de substituição de nucleotídeos nos permite estimar como ocorreram as mudanças entre as sequências ao longo do tempo. Esse modelo envolve a estimativa do número de mudanças de caracteres que foram necessárias para a geração das sequências observadas e da probabilidade de ocorrência de cada um desses passos. Esse processo visa captar o processo evolutivo envolvido na geração das sequências. Para auxiliar na escolha de qual modelo se enquadra em nossa matriz de dados existem testes estatísticos que comparam os modelos, definindo qual o mais adequado para os dados em questão. O Modeltest utiliza os testes de verossimilhança (Likelihood Ratio Test – LRT) e do critério de informação de Akaike (Akaike Information Criterion – AIC) para realizar diferentes comparações entre modelos hierárquicos, um mais simples e um mais complexo, de forma a encontrar o modelo mais simples que melhor represente os dados analisados. Como resultado, fornece o modelo ideal para as amostras que se deseja analisar, como também os parâmetros que serão utilizados no programa que construirá a filogenia.

TABELA 4: Resultado das análises efetuadas com o programa Modeltest 3.06 para as diferentes matrizes.

Matriz	Genes	*Modelo*
Matriz 01	16S rRna + Citocromo Oxidase I	GTR – General time-reversible model (Rodriquez et al. 1990) + Invariantes e distribuição Gama.
Matriz 02	F-Reticulon4	GTR – General time-reversible model (Rodriguez et al. 1990) + Invariantes e distribuição Gama.
Matriz 03	16S rRna + Citocromo Oxidase I + F-Reticulon4	TVM – Modelo Transversional (Rodriguez et al., 1990) + Invariantes e distribuição Gama.

O modelo TVM (Rodríguez et al., 1990), sigla do inglês Transversional Model, é bem semelhante ao modelo GTR (General time-reversible), porém um pouco mais simplificado. Ele considera apenas uma taxa para transição e quatro taxas para transversão, além de quatro diferentes frequências de bases, totalizando sete parâmetros livres. Para nossas matrizes de dados o Modeltest indicou, além dos modelos TVM ou GTR, que fossem consideradas proporção de sítios invariáveis (I) e uma distribuição gama (G) para modelar as variações nas taxas de substituição entre os sítios. Tais valores (I e G) para cada matriz também são fornecidos pelo programa Modeltest.

As análises filogenéticas foram efetuadas utilizando-se métodos de parcimônia máxima e inferência bayesiana, que permitem o uso de modelos de evolução complexos no intuito de captar ao máximo as informações fornecidas pela matriz de dados. Os diferentes protocolos de análises foram usados, de maneira geral, para todos os três conjuntos de dados.

4.8.2.1 Máxima Parcimônia

A máxima parcimônia é um método de reconstrução filogenética que presume que a melhor hipótese filogenética é aquela que envolve o menor número de passos evolutivos, ou seja, de mudanças que expliquem toda a variação de uma matriz de dados. Como explicitado em seu próprio nome, a melhor árvore é aquela que requer o menor número de mudanças, ou seja, a hipótese mais parcimoniosa, assumindo que o processo evolutivo ocorreu da forma mais curta possível.

Apresenta-se diretamente ligada ao conceito de ancestralidade, isto é, na presença de um estado de caráter compartilhado por dois ou mais táxons que foram potencialmente herdados de um ancestral comum. Desta forma, todos os sítios informativos por parcimônia devem ter uma hipótese de ancestralidade comum entre

táxons, ou seja, um sítio informativo por parcimônia é aquele que apresenta variação e que os estados de caráter são compartilhados por pelo menos dois táxons. A árvore que menos requerer mudanças para explicar as substituições nesses sítios informativos, é considerada a melhor hipótese filogenética para os dados em questão.

As árvores resultantes de máxima parcimônia foram encontradas com o auxílio do programa PAUP* 4.0b10 (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) que, como definido por seu próprio onme, foi criado para inferir filogenias a partir de dados discretos usando o método de máxima parcimônia, no entanto, além dessa possibilidade, ele oferece outros dois métodos de resconstrução (verossimilhança e distância) na escolha das árvores (Swofford 2002).

Em nosso trabalho as árvores foram encontradas através do método Heurístico, onde os *Gaps* foram tratados como "perdas" (*"missing data"*). A árvore inicial foi construída via *Stepwise-addition*, que é um algoritmo bastante simples, onde inicialmente três táxons são escolhidos para compor uma árvore inicial, posteriormente, um quarto táxon é unido a eles em todas as posições possíveis e aquela árvore que representar a árvore ótima é considerada no passo seguinte. Isso se procede até que todas as unidades taxonômicas tenham sido inseridas e uma árvore tenha sido escolhida entre as possíveis árvores finais.

Conjuntamente, o algoritmo *Branch-swapping* foi utilizado caso o sinal filogenético das sequências fosse baixo, o que levaria o algoritmo *Stepwise-addition* encontrar árvores "subótimas". Para tanto, foi utilizado o método TBR (*tree-bisection-reconnection* – "*bisecção de árvore"*) que quebra a árvore em duas subárvores disjuntas e as une por meio de um par de ramos diferentes daqueles que foi originada. O procedimento é repetido até que todos os pares possíveis de ramos destas duas subárvores sejam unidos e a melhor árvore seja definida. Foram calculados ainda os

índices de consistência (IC), índice de retenção (IR) e índice de consistência rescalonado (RC) das ávores mais parcimoniosas encontradas.

Ao assumirmos relações filogenéticas, temos a preocupação de avaliar a confiabilidade das árvores, ou mais ainda, mostrar qual a confiança nos agrupamentos formados por cada um dos nós mostrados em nossa topologia final. O *bootstrap* é uma técnica computacional de reamostragem que pode ser utilizada para estimar distribuições implícitas desconhecidas ou difíceis de serem descobertas analiticamente (Efron, 1979). Sua utilização em estudos filogenéticos foi feita por Felsenstein (1985) e desde então se tornou um método popular. O teste de *bootstrap* serve como uma forma de calcular índices que indiquem o grau de confiança dos ramos internos da árvore.

Valores altos de *bootstrap* encontrados, claramente indicam uma boa estimativa e valores baixos devem ser avaliados com cautela. A utilização de um número maior de réplicas geralmente aumenta o grau de confiança dos resultados.

4.8.2.2 Inferência Bayesiana

Filogenias baseadas em inferência Bayesiana são relativamente recentes (Rannala e Yang, 1996), porém baseiam-se no teorema de Bayes, proposto pelo matemático Thomas Bayes em 1763. É usado para combinar a probabilidade *a priori* de uma filogenia com a verossimilhança produzindo uma distribuição da probabilidade posterior nas árvores. A probabilidade posterior de uma árvore pode ser interpretada como a possibilidade de que uma árvore seja correta. Normalmente, todas as árvores são consideradas igualmente prováveis *a priori*, e a verossimilhança é calculada sob um modelo de Markov padrão de evolução de caracteres. Para calcular a probabilidade posterior é usado um modelo numérico, conhecido com Markov Chain Monte Carlo (MCMC) que permite que a probabilidade posterior seja aproximada, já que a sua formulação envolve o somatório de todas as árvores, integração de todas as

combinações possíveis de tamanho de ramo e valores de parâmetros de modelos de substituição, o que não pode ser resolvido analiticamente (Huelsenbeck et al. 2001).

Através da análise Bayesiana é possível se estimar filogenias de uma grande quantidade de organismos em espaços de tempo relativamente pequenos quando comparado a outros métodos, além de calcular uma estimativa de confiabilidade dos ramos ao mesmo tempo em que realiza a inferência das árvores.

As análises Bayesianas foram realizadas em nosso conjunto de dados com o programa MrBayes-3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003). Os parâmetros iniciais para cada conjuntos de dados foram estimados pelo AIC (*Akaike Information Criterion*) implementado no programa MrAIC (Nylander 2004). O modelo “General Time Reversible” (GTR) foi o selecionado para as nossas três diferentes matrizes. A forma da distribuição gama (G), a proporção de sítios invariáveis (I) e os valores dos parâmetros de substituição nucleotídica foram estimados. Foram usadas 3.000.000 de gerações, com quatro cadeias, com uma amostragem a cada 100 gerações. Foram excluídas as gerações anteriores à convergência das cadeias (*burn in* = 1.000.000) e uma árvore de consenso de maioria (50%) foi computada a partir das árvores amostradas depois da estabilidade encontrada. As probabilidades posteriores foram usadas como valores de suporte para os agrupamentos.

5. RESULTADOS

Foram sequenciados um dos genes mitocondriais da subunidade do RNA ribossômico, o gene 16S, o gene codificador de uma das subunidades da citocromo oxidase I (COI) e o gene nuclear F-Reticulon4 (**Tabela 3**). Tais genes foram utilizados por apresentarem, além de um grande número de caracteres, uma taxa de evolução compatível com uma análise em nível de gênero.

As transições/transversões (Ti/Tv) foram plotadas versus a distância genética segundo o modelo de Kimura-2-parâmetros para cada conjunto de genes (Mitocondriais; Nuclear; Mitocondriais + Nuclear), considerando como relações lineares, aquelas que possuíam o coeficiente de correlação (r) maior que 0.75, indicando que não houve saturação dos nucleotídeos (**Figura 9**).

Os resultados obtidos em cada matriz de dados serão apresentados separadamente a seguir.

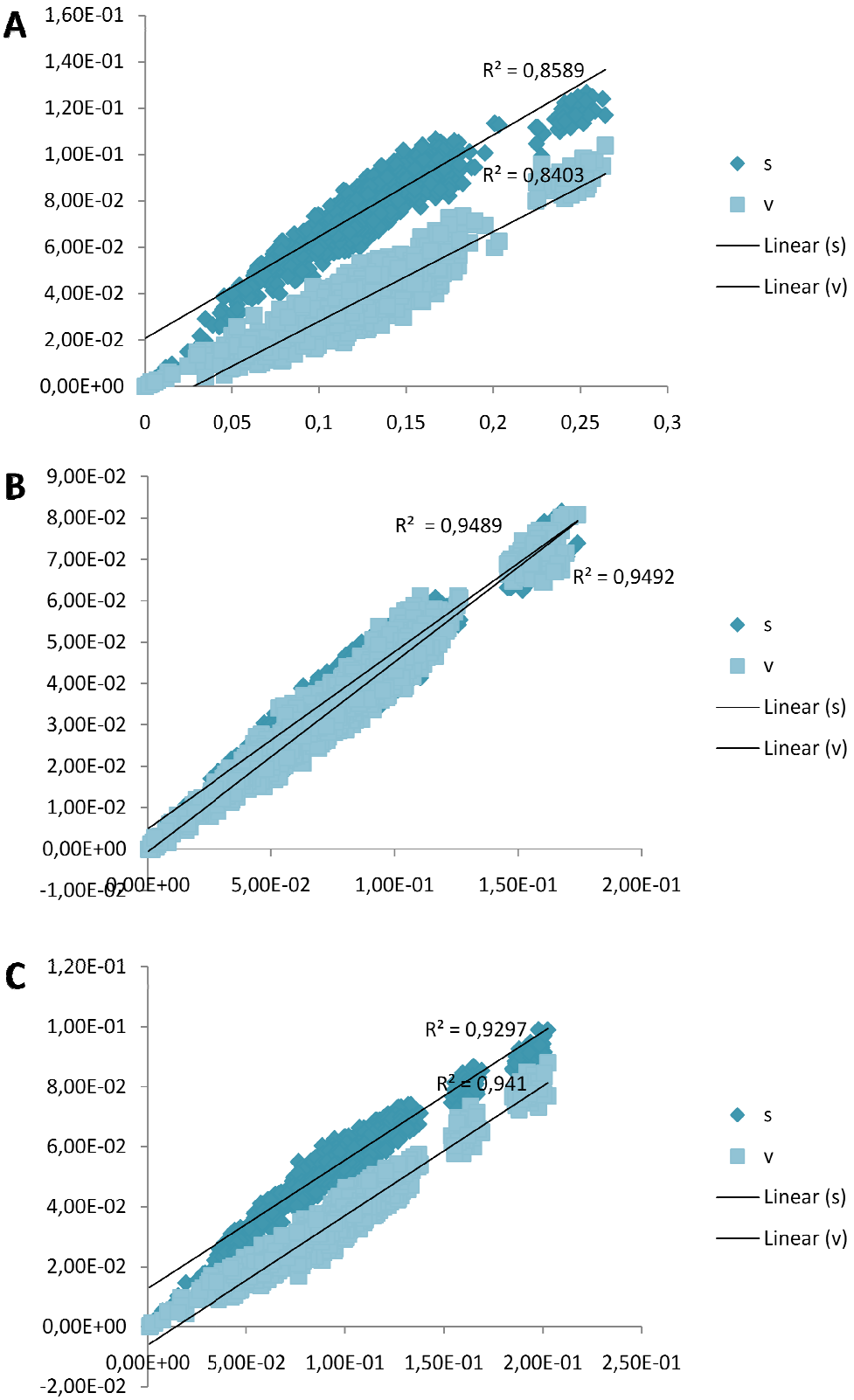

Figura 9. Gráficos mostrando a frequência observada de transições (s) e transversões (v) em relação à distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros. (**A**) Genes mitocondriais apenas (16S rRNA + COI); (**B**) Gene nuclear F-Reticulon4; (**C**) Análise combinada de genes mitocondriais e nuclear.

5.1 Análise filogenética baseada em sequências de genes mitocondriais

Na presente análise 60 exemplares foram incluídos em nossa matriz de dados, sendo que 53 pertencentes à subfamília Hypoptopomatinae, 5 à subfamília Neoplecostominae e dois representantes de Delturinae, como grupo externo. As informações sobre as características da sequência e alinhamento e as estatísticas da análise de parcimônia são sumarizadas na **Tabela 5**. A **Figura 10** apresenta a árvore com o menor comprimento obtido (TL=3132) dentre as quatro árvores mais parcimoniosas encontradas a partir da matriz de dados.

As topologias obtidas através das análises de máxima parcimônia (MP) e análise bayesiana (AB) apresentaram-se iguais mostrando apenas que, na segunda análise, todos os suportes estatísticos apresentaram-se relativamente superiores, porém, para a construção da árvore consenso (englobando as duas análises) optamos pelo corte referente aos valores de *bootstrap* (50%) e não pelos valores de probabilidades posteriores oriundos da análise bayesiana.

Na topologia final notamos a presença de um grande clado polifilético formado por nossas amostras. Em Hypoptopomatinae nenhuma das duas tribos permanece monofilética, sendo que os gêneros da tribo Hypoptopomatini *Acestridium*, *Oxyropsis*, *Hypoptopoma* e *Nannoptopoma* aparecem formando um clado irmão dos demais Hypoptopomatini, Otothyrini e Neoplecostominae.

Nesse primeiro clado, os gêneros *Acestridium* e *Oxyropsis* aparecem monofiléticos com alto suporte estatístico (MP 100/ AB 100), irmãos do clado formado pelos gêneros *Hypoptopoma* e *Nannoptopoma* (66/70).

A subfamília Neoplecostominae não aparece monofilética devido a inclusão das duas espécies do gênero *Pseudotocinclus*, pertencentes à

Hypoptopomatinae, que apresentam-se estritamente relacionados à *Pareiorhina* com valor de *bootstrap* alto (85/100) (**Figura 10**, seta). Ainda em Neoplecostominae, o gênero *Isbrueckerichthys* também não aparece monofilético pela presença de *Pareiorhaphis* dentro de seus representantes. O clado formado por Neoplecostominae mais *Pseudotocinclus* apresenta-se irmão do restante do grupo.

O gênero *Otocinclus* apresenta-se monofilético com moderado suporte estatístico, onde encontramos *O. gibosus* como basal para as espécies amostradas. O gênero *Schizolecis* mostra-se polifilético pela inclusão da espécie *Otothyris travassosi* que não se encontra irmã de *O. juquiae*.

Encontramos também um clado moderadamente suportado (62/68) formado por *Hisonotus, Microlepidogaster, Otothyropsis, Epactionotus* e *Eurycheilichthys.* Porém o gênero *Hisonotus* não é encontrado como monofilético devido a ruptura de suas espécies em diferentes clados.

Para relações interespecíficas e intergenéricas os genes mitocondriais utilizados na presente análise apresentaram valores estatísticos relativamente altos e suficientes para suportar a maioria das relações, porém em níveis superiores, tais como as tribos e inter-subfamíliais, os valores encontrados não foram suficientes para levantar alguma possível hipótese de relacionamento ou ancestralidade.

Tabela 5. Sumário das características das sequências e das estatísticas da árvore de Máxima Parcimônia inferidas para a investigação das relações filogenéticas baseadas na matriz combinada formada por genes mitocondriais de Hypoptopomatinae, Neoplecostominae e Delturinae.

Característica	Análise Combinada 16S rRNA + COI
Número de Táxons Analisados	60
Características das Sequências	
Tamanho das sequências (faixa)	1136-1473
Tamanho do alinhamento	1522
Sítios constantes	859
Sítios variáveis	148
Sítios informativos para parcimônia	515
Estatísticas da Árvore	
Número de árvores mais parcimoniosas	4
Número de passos (*Tree length*)	3132
Índice de Consistência (IC)	0.3282
Índice de Homoplasia (HI)	0.6718
Índice de Retenção (IR)	0.6546
Índice de Consistência Rescalonado (RC)	0.2148

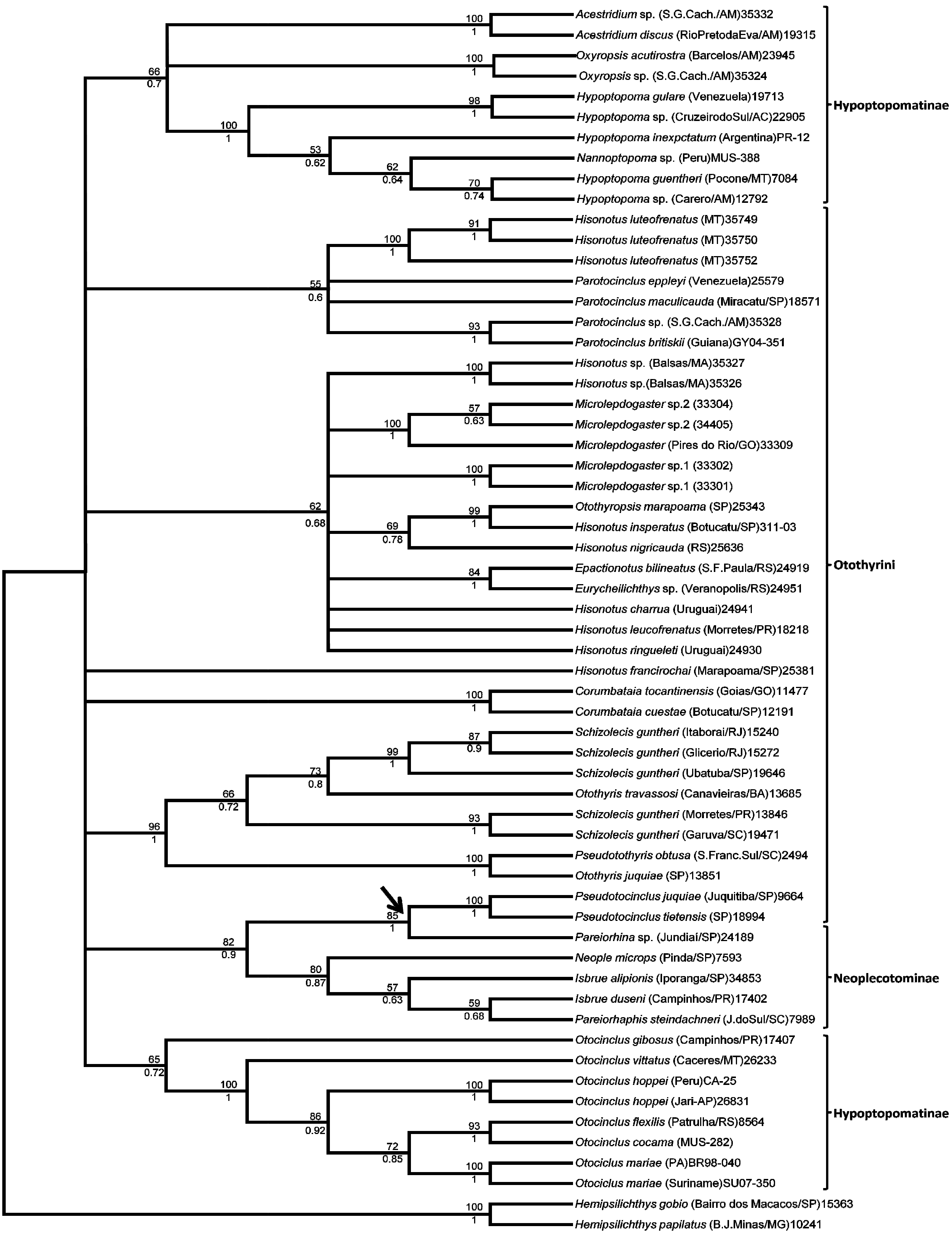

Figura 10. Árvore consenso por maioria derivada a partir da análise de Máxima Parcimônia e análise bayesiana inferida para as espécies das subfamílias Hypoptopomatinae e Neoplecostominae com base em sequências parciais dos genes 16S rRNA e Citocromo Oxidase I. Os valores acima dos ramos representam os valores de bootstrap (1.000 réplicas) para a análise de Máxima Parcimônia e o número abaixo as probabilidades posteriores (Inferência Bayesiana), que também servem de suporte aos clados. Seta mostra a relação de *Pseudotocinclus* com *Pareiorhina*.

5.2 Análise filogenética baseada em sequências do gene nuclear F-Reticulon4

Na análise envolvendo apenas sequências do gene nuclear F-Reticulon4, 66 indivíduos foram incluídos em nossa matriz de dados, sendo que 53 pertencentes a subfamília Hypoptopomatinae, 11 a Neoplecostominae e dois representantes de Delturinae como grupo externo. A **Tabela 6** mostra as informações referentes às características da sequência e alinhamento e as estatísticas da análise de parcimônia. Variações no comprimento das sequências estão exclusivamente localizadas nas regiões intrônicas presentes no gene F-Reticulon4.

Na **Figura 11** encontramos as topologias resultantes da árvore com o menor comprimento obtido (TL=2112) dentre as quatro árvores mais parcimoniosas encontradas a partir de nossa matriz de dados.

A análise bayesiana resultou numa topologia bem próxima da resultante por máxima parcimônia, apenas com as seguintes diferenças: valores de suporte relativamente superiores e "monofiletismo" do gênero *Isbrueckerichthys*, já que na analise bayesiana, *Isbrueckerichthys duseni* aparece como irmão de *I. alipionis*, porém com suporte baixo (35), devido a esse valor, a relação obtida pela máxima parcimônia foi a assumida na topologia de consenso final apresentada por apresentar suporte estatístico maior (*bootstrap* 62).

Na topologia final notamos que Hypoptopomatinae apresenta-se parafilética, devido a inclusão da subfamília Neoplecostominae como irmã da tribo Otothyrini com alto valor de suporte (MP 87/ AB 99). Novamente o gênero *Pseudotocinclus* aparece dentro de Neoplecostominae intimamente relacionado com o gênero *Pareiorhina* com valor estatístico relativamente alto (92/100).

A tribo Hypoptopomatini, tendo seu monofiletismo suportado por fraco suporte (59/86), apresenta apenas os gêneros *Otocinclus* e *Acestridium* como monofiléticos. Já em Otothyrini temos *Corumbataia, Schizolecis, Microlepidogaster, Otothyris* e *Parotocinclus* todos eles, gêneros monofiléticos. Já *Hisonotus* aparece com suas espécies espalhadas pelos outros agrupamentos levantando novamente a idéia de parafiletismo para o gênero. O gênero *Otothyris* não aparece irmão de *Pseudotothyris*, como originalmente proposto (Schaefer, 1998), e sim de *Otothyropsis*. Já *Pseudotothyris* mostra-se irmão dos representantes de *Schizolecis*. Os gêneros *Epactionotus* e *Eurycheilichthys* novamente encontram-se como gêneros irmãos e estreitamente relacionados com *Microlepidogaster* e *Parotocinclus*.

O gene F-Reticulon4 mostrou-se um bom marcador para nossa matriz de dados, apresentando bons valores de suportes estatísticos para os diferentes níveis de relacionamentos dentro do nosso grupo de táxons.

Tabela 6. Sumário das características das sequências e das estatísticas da árvore de Máxima Parcimônia inferidas para a investigação das relações filogenéticas baseadas na matriz formada pelo gene nuclear F-Reticulon4 de Hypoptopomatinae, Neoplecostominae e Delturinae.

Característica	F-Reticulon4
Número de Táxons Analisados	66
Características das Sequências	
Tamanho das sequências (faixa)	1784-1849
Tamanho do alinhamento	1963
Sítios constantes	1230
Sítios variáveis	86
Sítios informativos para parcimônia	647
Estatísticas da Árvore	
Número de árvores mais parcimoniosas	4
Número de passos (*Tree length*)	2112
Índice de Consistência (IC)	0.4725
Índice de Homoplasia (HI)	0.5275
Índice de Retenção (IR)	0.7602
Índice de Consistência Rescalonado (RC)	0.3592

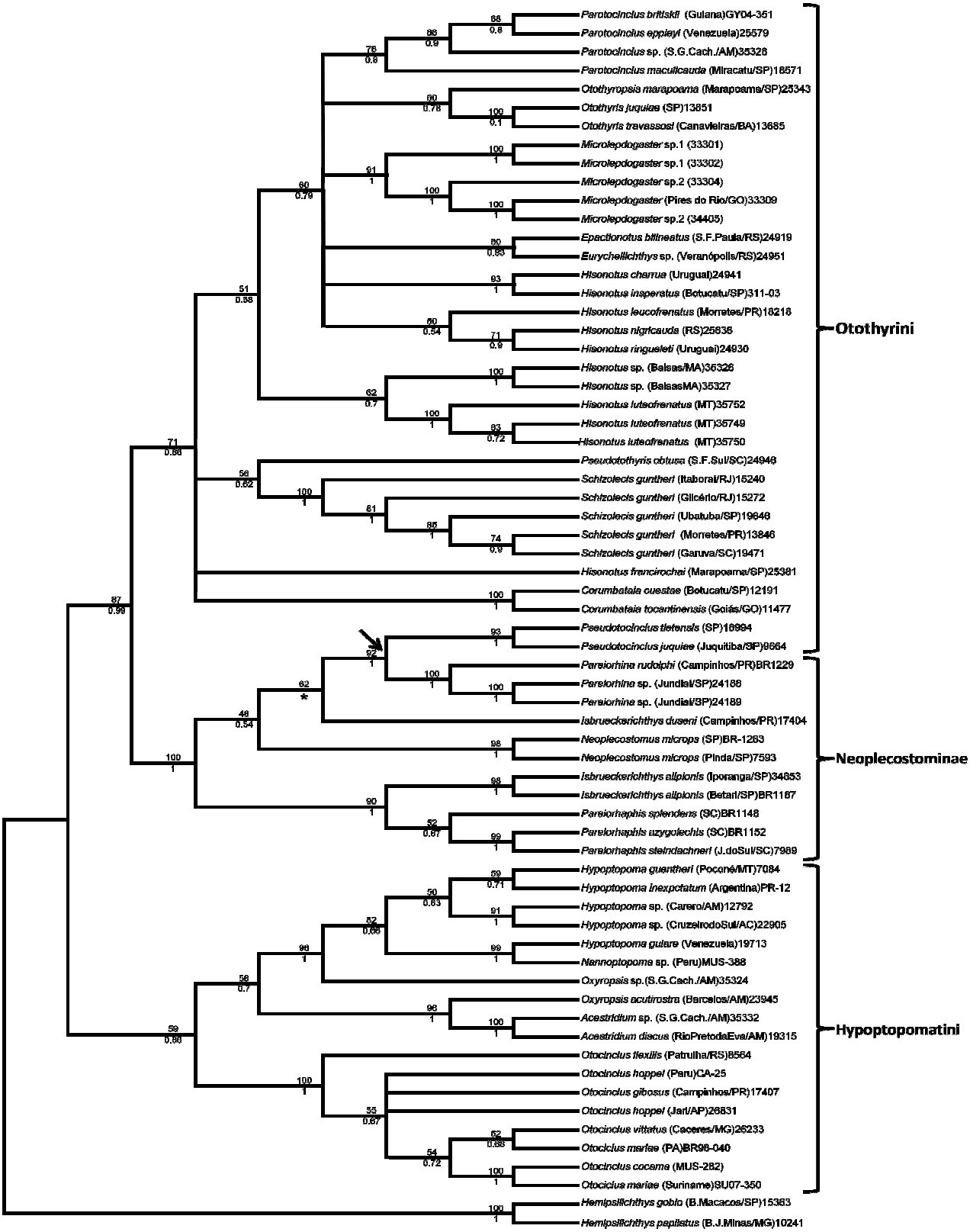

Figura 11. Árvore consenso derivada a partir da análise de Máxima Parcimônia e análise bayesiana inferida para as espécies das subfamílias Hypoptopomatinae e Neoplecostominae com base em sequências do gene F-Reticulon4. Os valores acima dos ramos representam os valores de bootstrap (1.000 réplicas) para a análise de Máxima Parcimônia e o número abaixo as probabilidades posteriores (Inferência Bayesiana), que também servem de suporte aos clados. **Seta** mostra a relação de *Pseudotocinclus* com *Pareiorhina*. * indica a variação encontrada nas duas análises (MP e bayesiana).

5.3 Análise filogenética baseada na combinação de genes

Em nossa última análise, uma matriz total contendo as sequências dos três diferentes genes analisados no presente trabalho foi construída a fim de se testar as possíveis relações para Hypoptopomatinae e Neoplecostominae, onde, 60 táxons foram incluídos em nossa matriz de dados, sendo que 53 pertencentes a subfamília Hypoptopomatinae, 5 a Neoplecostominae e dois representantes de Delturinae como grupo externo. Na **Tabela 7** encontramos um resumo das informações referentes às características da sequência e alinhamento e as estatísticas da análise de parcimônia. Na construção da matriz combinada de genes, o tamanho das sequências variou entre 2.822 pb (*Hemipsilichthys gobio*) e 3.328 pb *(Epactionotus bilineatus*), com média de 3.232 pb. As variações encontradas no tamanho das sequências ficaram localizadas quase que exclusivamente nas regiões intrônicas presentes no gene nuclear F-Reticulon4. A **Figura 12** apresenta a topologia consenso referente às análises de Máxima Parcimônia e análise bayesiana.

Analisando o resultado final dessa última análise nota-se que novamente a subfamília Hypoptopomatinae não aparece monofilética devido a inclusão dos representantes de Neoplecostominae entre as duas tribos de Hypoptopomatinae com considerável suporte estatístico. Vale ressaltar que a tribo Hypoptopomatini aparece monofilética e irmã de Otothyrini mais Neoplecostominae.

A subfamília Neoplecostominae tem seu monofiletismo quebrado pela inserção do gênero *Pseudotocinclus* entre seus representantes, com relação direta fortemente suportada (MP 80/ AB 100) a *Pareiorhina*. Relação já evidenciada nos itens anteriores do presente trabalho. Como irmão desse clado encontramos um segundo agrupamento formado por *Neoplecostomus, Pareiorhaphis* e o monofilético gênero

Isbrueckerichthys. E esse clado intitulado Neoplecostominae, irmão dos representantes da tribo Otothyrini, menos *Pseudotocinclus*.

Em Otothyrini encontramos *Corumbataia* como um gênero monofilético e basal para a tribo, juntamente com *Hisonotus francirochai*, porém com suporte relativamente fraco (50/58). Posteriormente, encontramos um clado monofilético com alto valor estatístico (100/100) formado pelos representantes do gênero monofilético *Schizolecis* amostrado aqui em toda a sua área de distribuição. Esse mesmo grupamento apresenta-se relacionado diretamente ao gênero *Pseudotothyris,* porém com suporte baixo (51/58).

Novamente *Epactionotus bilineatus* e *Eurycheilichthys* sp. são encontrados formando um grupamento (98/100) e irmão de *Hisonotus ringueleti* e *H. nigricauda* (70/80); *H. ringueleti* e *H. nigricauda* mais *H. leucofrenatus* (54/70); *H. ringueleti, H. nigricauda* e *H. leucofrenatus* mais *H. insperatus* e *H. charrua* (53/60). *Hisonotus insperatus* e *H. charrua* aparecem relacionadas e bem suportadas estatísticamente (95/100). Porém, o gênero *Hisonotus* não aparece monofilético em mais essa análise devido a presença das espécies *Hisonotus luteofrenatus* e *H.* sp. (Balsas/MA) separadas desse agrupamento *Hisonotus* mais *Epactionotus* mais *Eurycheilichthys*.

Por fim, ainda em Otothyrini encontramos um clado formado pelos gêneros monofiléticos *Microlepidogaster* (85/100), *Otothyris* (100/100), *Otothyropsis, e Parotocinclus* (69/90).

Analisando o clado denominado Hypoptopomatini encontramos basal para a tribo o monofilético gênero *Otocinclus* (100/100) onde *O. gibosus* apresenta-se basal para o grupo. Irmão desse grupamento temos os monofiléticos gêneros *Acestridium e Oxyropsis* (96/100) irmão de *Hypoptopoma* mais *Nannoptopoma* (53/65). O gênero

Hypoptopoma não apresenta-se monofilético devido a inclusão de *Nannoptopoma* entre seus representantes, relacionada mais diretamente a *H. gulare* (100/100).

A combinação dos genes parece ter se mostrado mais resolutiva já que a sua topologia final não apresenta politomias pela presença de valores estatísticos suficientes para suportar os agrupamentos dos táxons analisados.

Tabela 7. Sumário das características das sequências e das estatísticas da árvore de Máxima Parcimônia inferidas para a investigação das relações filogenéticas baseadas na matriz combinada dos genes 16S rRNA, Citocromoxidase I e pelo gene nuclear F-Reticulon4 de Hypoptopomatinae, Neoplecostominae e Delturinae.

Característica	Genes Combinados
Número de Táxons Analisados	60
Características das Sequências	
Tamanho das sequências (faixa)	2822-3328
Tamanho do alinhamento	3490
Sítios constantes	2095
Sítios variáveis	246
Sítios informativos para parcimônia	1149
Estatísticas da Árvore	
Número de árvores mais parcimoniosas	8
Número de passos (*Tree length*)	5482
Índice de Consistência (IC)	0.3688
Índice de Homoplasia (HI)	0.6312
Índice de Retenção (IR)	0.6656
Índice de Consistência Rescalonado (RC)	0.2455

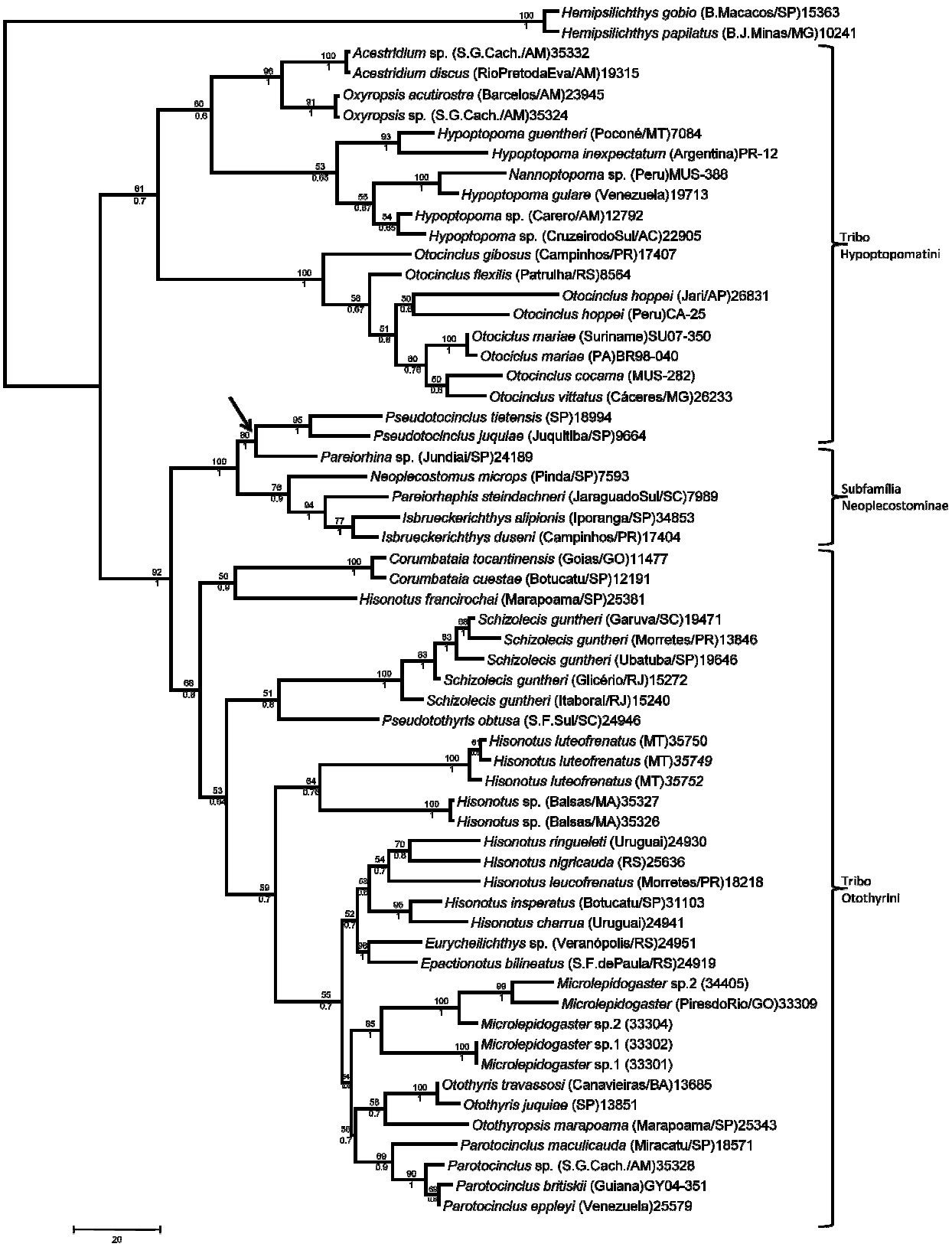

Figura 12. Árvore consenso por maioria derivada a partir da análise de Máxima Parcimônia e análise bayesiana para as espécies das subfamílias Hypoptopomatinae e Neoplecostominae baseada na matriz combinada dos genes 16S rRNA, Citocromo Oxidase I e F-Reticulon4. Os valores acima dos ramos representam os valores de bootstrap (1.000 réplicas) para a análise de Máxima Parcimônia e o número abaixo as probabilidades posteriores, que também servem de suporte aos clados. **Seta** mostra a relação de *Pseudotocinclus* com *Pareiorhina*.

6. DISCUSSÃO

Na discussão e conclusão do presente trabalho, assumiremos a terceira análise (matriz de genes combinados) como a topologia de consenso final objetivada em nosso estudo.

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que as duas subfamílias (Hypoptopomatinae e Neoplecostominae), que formam o grupo interno do presente trabalho, não são grupos-irmãos, uma vez que Neoplecostominae aparece dentro de Hypoptopomatinae, tornando essa última parafilética em todas as análises.

A tribo Hypoptopomatini é monofilética com apoio estatístico razoável. Os representantes do gênero *Acestridium* e *Oxyropsis* são grupos-irmãos e formam o grupo irmão dos representantes de *Hypoptopoma* + *Nannoptopoma* e, todo esse agrupamento irmão aos representantes do gênero *Otocinclus*. O gênero *Hypoptopoma* é parafilético devido à inclusão de *Nannoptopoma* sp. que agrupa-se junto com *Hypoptopoma gulare* com um apoio estatístico forte. O clado irmão para Hypoptopomatini é apoiado fortemente agrupando Neoplecostominae e Otothyrini.

A relação *Hypoptopoma* mais *Nannoptopoma* corrobora a proposta original de Schaefer (1998), encontrada posteriormente em Armbruster (2004) e Gauger & Buckup (2005). Schaefer (1998) apresenta também esse grupo diretamente relacionado ao gênero *Oxyropsis*, assim como em nossa topologia obtida. *Otocinclus* em posição basal dentro da tribo, como encontrado em nossos resultados, corrobora a posição para o gênero proposta de Schaefer (1998). Gauger & Buckup (2005) baseando-se em dados morfológicos corroboram tais relações propostas por Schaefer (1998) e encontradas no presente trabalho. A espécie *Niobichthys ferrarisi*, única presente dentro do gênero *Niobichthys*, não foi amostrada em nossas análises devido a sua dificuldade de captura por viver em uma restrita área de distribuição (Bacia do Rio

Negro, Venezuela). As análises morfológicas de Armbruster (2004) e Gauger & Buckup (2005) e a análise molecular do presente trabalho corroboram o monofiletismo da tribo Hypoptopomatini.

A subfamília Neoplecostominae é parafilética devido à inclusão de *Pseudotocinclus*, representante de Otothyrini. Este gênero está relacionado a *Pareiorhina*, com apoio estatístico significante. Duas outras linhagens estão presentes dentro do Neoplecostominae: o representante de *Neoplecostomus* em um lado e *Isbrueckerichthys* mais *Pareiorhaphis* no outro lado. As inter-relações entre essas três linhagens são suficientemente bem apoiados estatisticamente, diferente dos valores encontrados em Chiachio et al. (2008) onde a análise bayesiana apresenta uma tricotomia nessa mesma relação.

Com exceção do trabalho de Schaefer (1998), todos os demais estudos focados em relações filogenéticas, diretas ou não, em hypoptopomatíneos, assim como o presente trabalho, não corroboram o monofiletismo da tribo Otothyrini.

Em nossos resultados, a linhagem Otothyrini não é monofilética devido à exclusão de *Pseudotocinclus tietensis* e *Pseudotocinclus juquiae* que agruparam com os Neoplecostominae. Porém, todos os representantes de Otothyrini restantes formam um clado bem apoiado, no qual várias linhagens emergem. *Hisonotus francirochai,* que pertence a um gênero polifilético como mostrado aqui, agrupa-se com os dois representantes de *Corumbataia*. O próximo agrupamento de espécies é *Schizolecis guntheri* para o qual nós temos indivíduos que representam toda sua área de distribuição. *Pseudotothyris obtusa* vem próximo ao gênero *Schizolecis*, claramente separado do gênero *Otothyris*, como definido por Schaefer (1998), que tem uma posição mais derivada em nossa árvore, não corroborando as propostas filogenéticas já divulgadas anteriormente (Schaefer, 1998; Montoya-Burgos et al., 1998; Gauger & Buckup, 2005; Ribeiro et al., 2005).

Os membros restantes de Otothyrini apresentam a seguinte ordem de ramificação: uma linhagem bem apoiada formada por *Hisonotus luteofrenatus* e *H.* sp. (Balsas/MA), seguido de uma linhagem moderadamente bem apoiada que agrupam os demais representantes de *Hisonotus*, irmãos de um clado formado por *Eurycheilichthys* mais *Epactionotus*. *H. francirochai* não se apresenta juntamente com esses representantes de seu gênero agrupando-se com *Corumbataia* à base de Otothyrini. Em seguida, encontramos um clado fortemente suportado para todas as linhagens de *Microlepidogaster* e, finalmente, irmão de *Otothyropsis marapoama* mais o gênero monofilético *Otothyris* e, todo esse clado, irmão das quatro espécies de *Parotocinclus* analisadas no presente estudo. O monofiletismo do gênero *Parotocinclus* encontrado em nossos resultados não corroboram as análises feitas por Lehmann (2006) e Gauger & Buckup (2005) que o relata como um gênero polifilético.

Em nenhuma de nossas análises o gênero *Hisonotus* aparece monofilético apontando a necessidade de revisão para o gênero. Azpelicueta & Almirón (2007) e Britski & Garavello (2003, 2007) afirmavam que a definição de gênero para o grupo ainda está insuficientemente definida e possivelmente *Hisonotus* seja polifilético, como evidenciado em nossos resultados. Chiachio et al. (2008) testaram estatisticamente o monofiletismo deste gênero baseados em suas matrizes de dados moleculares. Os testes topológicos realizados pelos autores rejeitaram significativamente o estado monofilético de *Hisonotus* ($P < 0.05$).

Nossos resultados filogenéticos mostram que o monofiletismo de Hypoptopomatinae é rompido pela inclusão do Neoplecostominae. Esta inclusão, que é bem apoiada estatisticamente pelo teste de *bootstrap* e análise de probabilidades posteriores, desafia a hipótese atual e representa uma mudança dentro da sistemática de Loricariidae. Algo um pouco semelhante a esse novo cenário já havia sido encontrado por Montoya-Burgos et al. (1998) quando baseado em genes mitocondriais

12S e 16S rRNA **(Figura 3)**. Trabalhando com caracteres anatômicos osteológicos, Armbruster (2004) propôs agrupamentos diferentes destas duas subfamílias, com Hypoptopomatinae alojada dentro de Neoplecostominae. Outro estudo osteológico mostra que Hypoptopomatinae e Neoplecostominae estão estritamente relacionados devido à presença compartilhada de costelas modificadas (Britto e Moreira, 2002). Dessa maneira, tanto dados moleculares quanto morfológicos apóiam essa íntima relação entre os membros das subfamílias Hypoptopomatinae e Neoplecostominae.

Chiachio et al. (2008), em um trabalho englobando 16 dos 17 gêneros de Hypoptopomatinae, através de dados moleculares, não corroboraram a hipótese de monofiletismo de Hypoptopomatinae, também rompida pela inclusão da subfamília Neoplecostominae. Para avaliar se os levantamentos moleculares rejeitam as hipóteses atualmente aceitas e baseadas em análises morfológicas, os autores executam testes topológicos tentando confrontar possibilidades filogenéticas alternativas. Num primeiro teste forçam o monofiletismo de Hypoptopomatinae como grupo irmão de Neoplecostominae e, esta hipótese é rejeitada significativamente ($P < 0.05$). Testam então uma segunda hipótese alternativa na qual o Hypoptopomatinae é alojada dentro de Neoplecostominae, como proposto por Armbruster (2004). A melhor topologia possível que aceitaria esta hipótese como correta foi obtida executando uma procura de máxima verossimilhança (ML) onde forçam a topologia impondo uma suposição mínima. Esta topologia alternativa também é rejeitada significativamente por todos os testes realizados pelos autores ($P < 0.05$). A fim de se esclarecer a sistemática de Loricariidae quanto as suas subfamílias, Chiachio et al. (2008) então, baseando-se em seus dados moleculares e evidências morfológicas reveladas pela técnica de Raio-X, sugerem a elevação das duas tribos de Hypoptopomatinae ao nível de subfamília: Hypoptopomatini torna-se Hypoptopomatinae e Otothyrini se torna Otothyrinae, uma nova subfamília. Onde encontramos Otothyrinae como o grupo mais relacionado a

Neoplecostominae (Chiachio et al., 2008), assim como encontrado no presente trabalho e em Montoya-Burgos et al. (1998).

Para manter o estado monofilético da nova subfamília Otothyrinae foi necessário excluir *Pseudotocinclus* da antiga tribo Otothyrini que passa a fazer parte da subfamília Neoplecostominae, como o grupo irmão de *Pareiorhina*. Montoya-Burgos et al. (1998) já haviam encontrado essa mesma relação ao analisar sequências de rRNA mitocondrial **(Figura 3)**. Em nossas análises, quer seja baseada apenas em dados mitocondriais, nucleares ou conjuntamente, em todas as topologias, o gênero *Pseudotocinlus* apresenta-se dentro de Neoplecostominae e intimamente relacionado a *Pareiorhina* sempre com alto suporte estatístico, corroborando os dados encontrados em Chiachio et al. (2008). Resultados semelhantes foram encontrados para essa mesma relação em Cramer et al. (2008), baseando-se em sequências parciais do gene Citocromo Oxidase I, porém os autores não discutem essa topologia encontrada em seus resultados. Armbruster (2004) mesmo encontrando a ligação entre Neoplecostominae e a antiga Hypoptopomatinae não acredita em tal relação direta, embora mostre diversas sinapomorfias para a união do grupo em questão que não estão presentes em outros loricariídeos examinados em seu trabalho.

Para manter *Pseudotocinclus* dentro de Neoplecostominae ausente da nova Otothyrinae, Chiachio et al. (2008) usando um scanner de Raio-X, realizam reconstruções tridimensionais de *Pseudotocinclus tietensis*, *Pareiorhina* e outros representantes de Neoplecostominae e Otothyrinae, a fim de se levantar caracteres diagnósticos que justificassem tal nova associação. As reconstruções tridimensionais do esqueleto peitoral de duas espécies de Otothyrinae mostram que a lâmina ventral do coracóide forma uma forte blindagem peitoral com duas aberturas antero-medianas pequenas. O osso do cleitro só é visível na parte mais mediana do esqueleto peitoral. Em *Pseudotocinclus tietensis*, a região peitoral é ventralmente coberta por diversas

pequenas placas ósseas dérmicas antero-parcialmente fundidas, separadas na área posterior e na barriga. Também mostram que o cleitro é claramente visível e ventralmente exposto devido à ausência de placas dérmicas cobrindo a região anterior do esqueleto peitoral, uma situação bem diferente das duas espécies de Otothyrinae analisadas pelos autores (Chiachio et al., 2008). Em *Pareiorhina rudolphi*, o táxon mais próximo a *Pseudotocinclus*, os autores mostram que a região peitoral está totalmente livre de placas dérmicas ósseas e, portanto, o esqueleto peitoral é completamente visível pelas reconstruções tridimensionais realizadas (Chiachio et al., 2008) (ver em **ANEXOS**).

Os estudos moleculares realizados no presente trabalho trazem importantes informações acerca das relações para esses interessantes grupos de peixes loricariídeos, tendo em vista que diversos trabalhos já haviam sido realizados levantando problemas existentes na sistemática de Hypoptopomatinae e Neoplecostominae. Por outro lado, tais trabalhos pouco concluíam ou afirmavam qual, ou quais, grupos deveriam ser considerados subfamílias, já que por vezes, se admitíssemos determinado grupo nesse nível, automaticamente negaríamos o mesmo estado taxonômico do outro.

7. CONCLUSÃO

As análises aqui realizadas visando ao melhor conhecimento sobre as relações filogenéticas da subfamília Hypoptopomatinae e seus táxons diretamente relacionados permitiram concluir que:

1. Sequências parciais dos genes mitocondriais 16S rRNA e Citocromo oxidase I não permitem uma completa resolução das inter-relações para loricariídeos, pois os ramos internos geralmente são curtos, a ordem de alguns ramos não é clara para alguns taxa e a análise de *bootstrap* revela um fraco suporte para muitos grupos de gênero. Mas em termos de inter-relações entre os gêneros próximos, o suporte estatístico foi bastante satisfatório;
2. O gene nuclear F-Reticulon4 é um importante marcador filogenético desde níveis interespecíficos até níveis um pouco superiores;
3. A subfamília Hypoptopomatinae não se trata de um grupo monofilético, como definido e acreditado desde a sua descrição original, o que pôde ser evidenciado pelas diferentes formas de análises realizadas no presente trabalho e pelo suporte estatístico encontrado nas mesmas;
4. A tribo Hypoptopomatini é um táxon notadamente monofilético;
5. Os gêneros *Pseudotocinclus*, *Isbrueckerichthys*, *Corumbataia*, *Schizolecis*, *Otothyris*, *Microlepidogaster*, *Parotocinclus*, *Otocinclus*, *Oxyropsis* e *Acestridium* formam unidades monofiléticas;
6. O gênero *Hisonotus* apresenta reais problemas relacionados à sua sistemática e taxonomia e necessita de um estudo direcionado em sua revisão;
7. Neoplecostominae é um grupo monofilético, quando incluímos *Pseudotocinclus*, estritamente relacionado à tribo Otothyrini;

8. A tribo Otothyrini não é um grupo monofilético e apresenta-se mais relacionada a Neoplecostominae do que Hypoptopomatini;
9. As novas topologias propostas em Chiachio et al. (2008) são corroboradas ainda que aumentemos os números de táxons analisados e/ou o número de genes em nossa matriz de dados.

8. REFERÊNCIAS

ALJANABI, S.M.; MARTINEZ, I. (2001). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, Oxford University Press, Vol. 25, 22: 4692:4693.

AMORIM, D.S. (2002). Fundamentos de Sistemática Filogenética. *Holos Editora*, Ribeirão Preto, SP, 156p.

ARMBRUSTER, J.W. (1997). Phylogenetic relationships of the sucker-mouth armored catfishes (Loricariidae) with particular emphasis on the Ancistrinae, Hypostominae, and the Neoplecostominae. *Unpublished Ph.D. Thesis*, University of Illinois, Urbana-Champaing.

ARMBRUSTER, J.W. (2004). Phylogenetic relationships of the sucker-mouth armored catfishes Loricariidae with particular emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 141: 1-80.

ARRATIA, G.; KAPOOR, B.G.; CHARDON, M.; DIOGO, R. (2003). Catfishes. 2 vol., *Playmouth: Science Publishers*, 844 pp.

AZPELICUETA, M.; ALMIRÓN, A.E. (2007). *Hisonotus hungy* sp. n. (Siluriformes, Loricariidae), a new species from arroyo Tirica, Misiones, Argentina. *Revue Suisse de Zoologie*, 114: 591-598.

BRITSKI, H.A.; GARAVELLO, J.C. (2003). *Hisonotus insperatus*: new species, from the upper Rio Paraná basin (Pisces: Ostariophysi: Loricariidae). *Copeia*, 588-593.

BRITSKI, H.A.; GARAVELLO, J.C. (2007). Description of two new species of the genus *Hisonotus* EIGENMANN and EIGENMANN, 1889, from upper Rio Tapajós, Mato Grosso State, Brazil (Pisces: Ostariophysi: Loricariidae). *Brazilian Journal of Biology*, 67: 631-637.

BRITSKI, H.A. (1997). Descrição de um novo gênero de Hypoptopomatinae, com duas espécies novas (Siluriformes, Loricariidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 40 (15): 231–255

BRITTO, M.R.; MOREIRA, C.R. (2002). *Otocinclus tapirape*: a new hypoptopomatine catfish from central Brazil (Siluriformes: Loricariidae). *Copeia*, 1063-1069.

BRITTO, M.R. (2003). Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea Teleostei: Ostariophysi. *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, São Paulo. 512 pp.

BURGESS, W.E. (1989). An Atlas of Freshwater and Marine Catfishes. A Preliminary Survey of Siluriformes. *T.F.H. Publications*, Neptune, NJ.

CALCAGNOTTO, D. (2004). Taxas de evolução e o relógio molecular. In: Matioli, S.T. ed.. *Biologia Molecular e Evolução*. Holos Editora, Ribeirão Preto, 51-63.

CHANG, Y.C.; HUNAG, F.L.; LO, T.B. (1994). The complete nucleotide sequence and gene organization of carp *Cyprinus carpio* mitochondrial genome. *Journal Molecular Evolution*. 38:, 138-155.

CHIACHIO, M.C.; OLIVEIRA, C.; MONTOYA-BURGOS, J.I. (2008). Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49: 606-617.

COSTEDOAT, C.; CHAPPAZ, R.; BARASCUD, B.; GUILLARD, O.; GILLES, A. (2006). Heterogeneous colonization pattern of European Cyprinids, as highlighted by the dace complex Teleostei: Cyprinidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41: 127-148.

CRAMER, C.A.; LIEDKE, A.M.R.; BONATTO, L.S.; REIS, R.E. (2008). The phylogenetic relationship of the Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae) as inferred from mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences. *Bulletin of Fish Biology*, 9, 51-59.

CRESPI, B.J.; FULTON, M.J. (2004). Molecular systematics of Salmonidae: combined nuclear data yields a robust phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 658-679.

DERIJST, E. (1996). Note on the type species of the mailed catfish genus *Hemipsilichthys* Miranda-Ribeiro, (1918) (Pisces: Siluriformes; Loricariidae), with the introduction of Isbrueckerichthys nom. nov. *Aquarium Wereld*, 49: 62–64.

DIEKMANN, H.; KLINGER, M.; OERTLE, T.; HEINZ, D.; POGODA, H.M.; SCHWAB, M.E.; STUERMER, C.A.O. (2005). Analysis of the reticulon gene family demonstrates the absence of the neurite growth inhibitor Nogo-A in fish. *Molecular Biology and Evolution,* 22: 1635–1648.

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, pp.353-384.

DOIUCHI, R.; NAKABO, T. (2006). Molecular phylogeny of the stromateoid Wshes Teleostei: Perciformes inferred from mitochondrial DNA sequences and compared with morphology-based hypotheses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39:, 111-123.

EFRON, B. (1979). Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Annals Stat.*, 7: 1.26.

EVERS, H.G.; SEIDEL, I. (2005). Catfish Atlas – South American Catfishes of the Families Loricariidae, Cetopsidae, Nematogenyidae and Trichomycteridae, Vol. 1, 1st. edition, *Natural History and Pet Books*. 943p.

FELSENSTEIN, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, Lawrence, 39: 783-791.

FERRARIS, C.J. (2007). Checklist of carfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, 1418: 1-628.

FINK, S.V.; FINK, W.L. (1981). Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). *Zool. J. Linn. Soc. Lond.*, 72: 297-353.

FINK, S.V.; FINK, W.L. (1996). Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). In: Stiassny, M.L.J.; Parenti, L.R.; Johnson, G.D. (Eds). *Interrelationships of fishes*. San Diego: Academic Press, pp.209-49.

GAUGER, M.F.W.; BUCKUP, P.A. (2005). Two new species of Hypoptopomatinae from the rio Paraíba do Sul basin, with comments on the monophyly of *Parotocinclus* and the Otothyrini (Siluriformes: Loricariidae). *Neotropical Ichthyology,* 3(4): 509-518.

HALL, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* Philadelphia, 41: 95-98.

HARDMAN, M. (2004). The phylogenetic relationships among *Noturus* catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) as inferred from mitochondrial gene cytochrome b and nuclear recombination activing gene 2. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30: 395-408.

HARDMAN, M. (2005). The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome *b* sequences; the search for the ictalurid

sister taxon (Otophysi: Siluriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 700-720.

HENNIG, W. (1950). Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik. Deutsche Zentralverlag, Berlin.HILLIS, D.M. *et al.*, (1996). Nucleic Acids IV: sequencing and cloning. In: HILLIS< D.M. MORITZ, C. MABLE, B.K. EDS.. *Molecular Systematics. Sunderland: Sinauer*, 321-381.

HOWES, G.J. (1983). The cranial muscles of loricarioid catfish, their homologies and value as taxonomic characters (Teleostei: Siluroidei). Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.), 45(6): 309-45. HUBERT, N. BONILLO, C. PAUGY, D. (2005). Early divergence among the Alestidae Teleostei, Ostariophyses, Characiformes: Mitochondral evidences and congruence with morphological data. *Comptes rendus - Biologies*, 328: 477-491.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.

JOHANSEN, S.; BAKKE, I. (1996). The complete mitochondrial DNA sequence of Atlantic cod, *Gadus morhua*: relevance to taxonomic studies among codfish. *Molecular Marine Biol. Biotechnol,* 5: (203-214.

JONDEUNG, A.; SANGTHONG, P.; ZARDOYA, R. (2007). The complete mitochondrial DNA sequence of the Mekong giant catfish *Pangasianodon gigas*, and the phylogenetic relationships among Siluriformes. *Gene*, 387, 1-2: 49-57.

KEITH, P.; GALEWSKI, T.; CATTANEO-BERREBI, G.; HOAREAU, T.; BERREBI, P. (2005). Ubiquity of *Sicyopterus lagocephalus* Teleostei: Gobioidei and phylogeography of the genus *Sicyopterus* in the Indo-Pacific area inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 721-732.

KOCHER, T.D.; THOMAS, W.K.; MEYER, A.; EDWARDS, S.V.; PÄÄBO, S.; VILLABLANCA, F.X.; WILSON, A.C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci*, USA, 86: 6196-6200.

KURIIWA, K.; HANZAWA, N.; YOSHINO, T.; KIMURA, S.; NISHIDA, M. (2007). Phylogenetic relationships and natural hybridization in rabbitfishes Teleostei: Siganidae inferred from mitochondrial and nuclear DNA analyses, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, doi:, 10.1016/j.ympev.2007.04.018.

LAVOUE, S. ; SULLIVAN, J.P. ; HOPKINS, C.D. (2003). Phylogenetic utility of the first two íntrons of the S7 ribosomal protein gene in African electric fishes (Mormyroidea: Teleostei) and congruence with other molecular markers. *Biol. J. Linn. Soc*. 78: 273-292.

LAVOUÉ, S.; MIYA, M.; SAITOH, K.; SHIGURO, N.B.; NISHIDA, M. (2007). Phylogenetic relationships among anchovies, sardines, herrings and their relatives Clupeiformes, inferred from whole mitogenome sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43: 1096-1105.

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.

LEHMANN, P.A. (2006). Anatomia e relações filogenéticas da família Loricariidae (Ostariophysi: Siluriformes) com ênfase na subfamília Hypoptopomatinae. *Tese de Doutorado*, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, RS, 430 pp.

LOVEJOY, N.R.; COLLETE, B.B. (2001). Phylogenetic relationships of new world needlefishes (Teleostei: Belonidae) and the biogeography of transitions between marine and freshwater habitats. *Copeia*, 324-338.

MONTOYA-BURGOS, J.I.; MULLER, S.; WEBER, C.; PAWLOWSKI, J. (1998). Phyologenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) based on mitochondrial rRNA gene sequences. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, C.A.S. eds. *Phylogeny and classification of neotropical fishes.* Porto Alegre: EDIPUCRS, 363-374.

MOYER, G.R.; BURR, B.M.; KRAJEWSKI, C. (2004). Phylogenetic relationships of thorny catfishes (Siluriformes: Doradidae) inferred from molecular and morphological data*. Zool. J. Linnean Soc*., 140: 551–575.

NEAR, T.J.; BOLNICK, D.I.; WAINWRIGHT, P.C. (2004). Investigating phylogenetic relationships of sunfishes and black basses (Actinopterygii: Centrarchidae) using DNA sequences from mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32: 344-357.

NEI, M.; KUMAR, S. (2000). Molecular evolution and phylogenetics. *Oxford University Press*, New York, USA.

NELSON, J S. (1994). Fishes of the World. New York: *John Wiley and Sons*, 3rd edn., 600 pp.

NELSON, J.S. (2006). *Fishes of the world*. New York: John Wiley and Sons, 4rd edn.

NICHOLS, J.T. (1919). Um novo gênero de cascudos da família Loricariidae. *Revista do Museu Paulista*, 11: 533-535.

NYLANDER, J.A.A. (2004). MrModeltest 2.2**:** Programa distribuído livremente pelo autor no site http://www.abc.se/~nylander/.

PALUMBI, S.R. (1996). Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. Pp. (205-247. In: Hills, D.M. Moritz, C. Mable, B. Eds.. *Molecular Systematics*, 2nd ed. Sinauer Associates, *Inc. Sunderland, Massachusetts*, 655 pp.

PÉREZ, G.A.C.; IÍBAN, O.; ORTÍ, G.; BERMINGHAM, E.; DOADRIO, I.; ZARDOYA. R. (2007). Phylogeny and biogeography of 91 species of heroine cichlids Teleostei: Cichlidae based on sequences of the cytochrome *b* gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43: 91-110.

de PINNA, M.C.C. (1993). Higher-level phylogeny of Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi), with a new classification of the order. *Unpublished Ph.D. Dissertation*, University of New York, New York. 482p.

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). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, 279-330 pp.

POSADA, D.; CRANDALL, K.A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.

PRAMUK, J.B.; GROSE, M.J.; CLARKE, A.L.; GREENBAUM, E.; BONACCORSO, E.; GUAYASAMIN, J.M.; SMITH-PARDO, A.H.; BENZ, B.W.; HARRIS, B.R.; SIEGFREID, E.; REID, Y.R.; HOLCROFT-BENSON, N.; WILEY, E.O. (2007). Phylogeny of finescale shiners of the genus *Lythrurus* Cypriniformes: Cyprinidae inferred from four mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 287-297.

QUENOUILLE, B.; BERMINGHAM, E.; PLANES, S. (2004). Molecular systematics of the damselfishes (Teleostei: Pomacentridae): Bayesian phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 66–88.

RANNALA, B.; YANG, E.Z. (1996). Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, 43: 304–311.

REIS, R. E.; SCHAEFER, S.A. (1998). New Cascudinhos from southern Brazil: Systematics, endemism, and relationships (Siluriformes, Loricariidae, Hypoptopomatinae). *Am. Mus. Novitates*, 3254: 1-25.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS-JR, C.J. (2003). Checklist of the freshwater fishes of South and Central. Porto Alegre: EDIPUCRS. 742 pp.

RIBEIRO, A.C.; CARVALHO, M.; MELO, A.L.A. (2005). Description and relationships of *Otothyropsis marapoama*, a new genus and species of Hypoptopomatinae catfish Siluriformes: Loricariidae from Rio Tietê basin, southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 34: 489–498.

RODRIGUEZ, F.; OLIVER, J.L.; MARÍN, A.; MEDINA, R. (1990). The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal Theorical Biological*, 142: 485-501.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.

RÜBER, L.; BRITZ, R.; KULLANDER, S.O.; ZARDOYA, R. (2004). Evolutionary and biogeographic patterns of the Badidae (Teleostei: Perciformes) inferred from mitochondrial and nuclear data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32: 1010-1022.

SABAJ, M.H.; PAGE, L.M.; LUNDBERG, J.G.; FERRARIS, C.J.; ARMBRUSTER, J.W.; FRIEL, J.P.; MORRIS, P.J. 2004. *All Catfish Species Inventory Website.* Internet address: <http://clade.acnatsci.org/allcatfish>.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3ª ed. *Cold Spring Harbor Laboratory*, New York , 999 pp.

SCHAEFER, S.A. (1987). Osteology of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus) with a phylogenetic analysis of the loricariid subfamilies (Pisces: Siluroidei). *Contributions in Scince, Natural History Museum of Los Angeles Country*, 394: 1-31.

SCHAEFER, S.A. (1991). Phylogenetic analysis of the loricariid subfamily Hypoptopomatinae (Pisces: Siluroidei: Loricariidae), with comments on generic diagnoses and geographic distribution. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 102: 1-41.

SCHAEFER, S.A. (1998). Conflict and resolution: Impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos Siluriformes: 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). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, 375–400.

SHIMABUKURO-DIAS, C.K.; OLIVEIRA, C.; REIS, R.E.; FORESTI, F. (2004). Molecular phylogeny of the armoured catfish family Callichthydae Ostariophysi, Siluriformes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32:, 152-163.

SLOSS, B.L.; BILLINGTON, N.; BURR, B.M. (2004). A molecular phylogeny of the Percidae Teleostei, Perciformes based on mitochondrial DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32: 545-562.

SULLIVAN, J.P.; LUNDBERG, J.G.; HARDMAN, M. (2006). A phylogenetic analysis of the major groups of catWshes Teleostei: Siluriformes using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41: 636-662.

SWOFFORD, D.L. (2002). PAUP* - Phylogenetic analysis using parsimony *and other methods. Version 4.0b10. *Sinauer Associates*, Sunderland, Massachusetts.

TANG, Q.; LIU, H.; MAYDEN, R.; XIONG, B. (2006). Comparison of evolutionary rates in the mitochondrial DNA cytochrome *b* gene and control region and their implications for phylogeny of the Cobitoidea Teleostei: Cypriniformes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39: 347-357.

TEUGELS, G.G. (1996). Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei); an overview. *Aquat. Living Resour.*, 9: 9-34.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.

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). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, 1-11 pp.

XIA, X.; XIE, Z. (2001). DAMBE – Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Journal of Heredity* , New York, 92: 371-373.

YAN, R.; SHI, Q.; HU, X.; ZHOU, X. (2006). Reticulon proteins: emerging players in neurodegenerative diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences,* 63: 877–889.

YOKOYAMA, R.; GOTO, A. (2005). Evolutionary history of freshwater sculpins, genus *Cottus* Teleostei Cottidae and related taxa, as inferred from mitochondrial DNA phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36: 654-668.

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.