

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**Estudos filogenéticos na superfamília
Loricarioidea (Teleostei: Siluriformes) com
base em seqüências do DNA nuclear e
mitocondrial**

Andréia Alves Soares

Prof. Dr. Claudio de Oliveira
Orientador

Botucatu – SP
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**Estudos filogenéticos na superfamília
Loricarioidea (Teleostei: Siluriformes) com
base em seqüências do DNA nuclear e
mitocondrial**

Andréia Alves Soares

Prof. Dr. Claudio de Oliveira
Orientador

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Zoologia.

Botucatu – SP
2008

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

Soares, Andréia Alves.

Estudos filogenéticos na superfamília Loricarioidea (Teleostei: Siluriformes)
com base em seqüências do DNA nuclear e mitocondrial / Andréia Alves Soares. –
Botucatu : [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Bióciências de Botucatu 2008.

Orientador: Claudio de Oliveira

Assunto CAPES: 20200008

1. Peixe - Filogenia 2. Peixe - Genética 3. Biologia molecular

CDD 597.15

Palavras-chave: DNA mitocondrial; DNA nuclear; Filogenia; Genética,
Loricarioidea; Siluriformes;

DEDICO

Aos meus pais, Francisca e Amador, pelo amor, carinho, confiança e por todo empenho que sempre fizeram e fazem pela minha formação e bem-estar.

AMO VOCÊS!!!

“Sabemos que o que fazemos é somente uma gota d’água no oceano. Mas, se não fizéssemos isso, essa gota faltaria”.

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo e por mais esta oportunidade.

Ao Prof. Dr. Claudio de Oliveira, pela orientação segura e competente, pelos valiosos ensinamentos, pela amizade e confiança, essenciais nesta etapa.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, pelos importantes ensinamentos, principalmente durante as disciplinas e cursos sobre Genética de Peixes.

Aos docentes do Departamento de Morfologia, em especial ao Claudio de Oliveira, Edmir Daniel Carvalho, Cesar Martins, Daniela Carvalho dos Santos e Virginia Sanches Uieda (Dept^o. de Zoologia), pela disponibilidade, atenção e aprendizado durante os estágios de docência.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes: Adrianinha, Carlos, Claudinha, Cristiane, Daniela, Emanuel, Fábio, Karina, Kelly, Luciana, Varvito, Luiz, Jefferson, Lessandra, Waldo, Márcio, Konrado, Marlon, Prof. Celso, Gustavo, Vanessa, Zeca, Patrícia, Gleisy, Ricardo Benine, Ricardo Paiva, Prof. Paulo, Tatiane, Marina, Elisa, Natália, Prof. Mauro, Prof. Ernesto, Guiodai, Ligia, Rita e Marisa, pelos auxílios e pelos vários momentos de descontração. Em especial ao Alex, pelos muitos ensinamentos e principalmente pela amizade.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite ao meu convite e pelas valiosas contribuições.

À CAPES, pela oportunidade de realizar o doutorado, de conhecer, aprender e desenvolver uma parte do projeto em outra instituição, o que só foi possível graças as bolsas concedidas.

Ao Dr. Eldredge Bermingham e a Dra. Oris Sanjur, pela oportunidade e ensinamentos durante o estágio no Smithsonian Tropical Research Institute (STRI), Panamá.

Aos funcionários do STRI: Grethel, Maribel, Carlos, Nímia e Karina, por toda ajuda. Em especial, a Gisela, pelo auxílio e amizade.

Aos amigos e colegas do STRI: Silane, Carlos, Mauricio, Andrew, Natalia, Melida, Fernando, Mande, Diana, Dorita, Andrés, Oscar, Paula, Gabriela, Edwin, Miryam, Ivania, Kecia, Eva, Luis Fernando e Matt, por toda ajuda, ensinamentos e por fazerem da minha estada no Panamá, momentos tão especiais!

A todos que auxiliaram na coleta dos animais utilizados neste estudo.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia: D. Tera, Sueli, D. Iolanda, Luciana, Vanda, Ricardo e Zé Eduardo, pelo agradável convívio. Em especial, ao Renato Devidé, pelos momentos de descontração e pela amizade.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação: Serginho, Maria Helena e Luciene, pelos vários esclarecimentos e prontidão em todas as solicitações.

Aos amigos e colegas do Departamento de Morfologia: Welcy, Danillo, Kbelo, Igor, Ana, Poletto, Heraldo, Irani, Zé Luis, Heleno e Juliana, pelos momentos de descontração.

Às amigas Luciane, Mara, Leidi, Adriane, Sandrinha, Ireni e Leda, por todo apoio, carinho e amizade.

Ao Edson Vitale, pelo carinho, atenção, paciência, ajuda, compreensão e pelo apoio incondicional em todas as etapas do doutorado.

À família Vitale, pela acolhida, apoio e pelos vários momentos de descontração. Em especial, a Zilda e João pelos deliciosos almoços familiares de domingo, que ajudaram a amenizar a saudade da minha família.

Aos meus pais Amador e Francisca, pessoas tão especiais, pelo amor incondicional que me dedicam!

À minha irmã Adriana, pela amizade, apoio e principalmente, por ser minha grande amiga!

Ao meu cunhado Joraci, pela amizade e apoio.

Aos meus sobrinhos, Bruno e Milena, por todo amor e alegrias que me proporcionam!

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

A superfamília Loricarioidea, o maior grupo de Siluriformes da região Neotropical, é composta por seis famílias: Astroblepidae, Callichthyidae, Loricariidae, Nematogenyidae, Scoloplacidae e Trichomycteridae. Estudos morfológicos têm sugerido que as famílias Trichomycteridae e Nematogenyidae formam um grupo monofilético que é irmão do clado formado pelas demais famílias. As famílias Astroblepidae e Loricariidae formam um grupo monofilético que é irmão de Scoloplacidae, e essas três famílias formam um grupo monofilético que é irmão de Callichthyidae. Com o objetivo de testar as hipóteses de relacionamento descritas acima, foram seqüenciados segmentos dos genes mitocondriais 16S rRNA ribossômico (16S), citocromo oxidase I (COI) e citocromo *b* (*cyt b*) e os genes nucleares codificadores de proteínas *recombination activating protein* (*rag1* e *rag2*), totalizando cinco genes de 48 espécies de Siluriformes, incluindo representantes de Diplomystidae, Nematogenyidae, Trichomycteridae, Callichthyidae, Scoloplacidae, Loricariidae e Astroblepidae. Ainda que as diferentes filogenias obtidas pelos métodos de máxima parcimônia não tenham sido todas congruentes, foi confirmada a monofilia de Loricarioidea, foi corroborado Nematogenyidae como grupo-irmão das demais famílias que constituem a superfamília Loricarioidea, bem como sua posição basal em relação aos demais Loricarioidea. Essas hipóteses haviam sido propostas em estudos morfológicos do grupo. Por outro lado, os dados moleculares sustentaram a existência de um clado formado pelas famílias Scoloplacidae e Callichthyidae que apareceram como grupo-irmão do clado formado pelas famílias Loricariidae, Trichomycteridae e Astroblepidae. Considerando as diferenças observadas entre as filogenias obtidas com dados morfológicos e moleculares conclui-se que uma ampliação dos dados (moleculares e morfológicos), será fundamental para um melhor entendimento das relações entre as famílias de Loricarioidea.

ABSTRACT

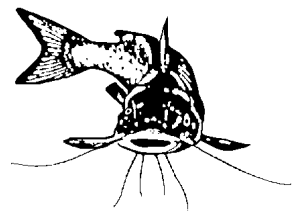
The superfamily Loricarioidea, the largest group of Siluriformes from the Neotropical region, is composed by six families: Astroblepidae, Callichthyidae, Loricariidae, Nematogenyidae, Scoloplacidae, and Trichomycteridae. Morphological studies suggested that the families Trichomycteridae and Nematogenyidae form a monophyletic group that is the sister group of the clade composed by the remained families. The families Astroblepidae and Loricariidae belong to a monophyletic group that is the sister group of Scoloplacidae, and these three families belong to a monophyletic group that is the sister group of Callichthyidae. To test the phylogenetic hypothesis related above segments of the mitochondrial genes 16S ribosomal RNA (16S), cytochrome oxidase I (COI) and cytochrome *b* (*cyt b*) and the nuclear genes coding the recombination activating protein (*rag1* e *rag2*) were sequenced, for 48 species of Siluriformes, including representatives of Diplomystidae, Nematogenyidae, Trichomycteridae, Callichthyidae, Scoloplacidae, Loricariidae, and Astroblepidae. The different phylogenies obtained when the data were analyzed individually or together were not identical the monophyly of Loricarioidea was confirmed and Nematogenyidae appear as the sister-group of the remained Loricarioidea. These hypothesis were previously suggest based on morphological studies. On the other hand, the molecular data suggest the existence of a clade composed by the families Scoloplacidae and Callichthyidae which is the sister-group of the clade composed by the families Loricariidae, Trichomycteridae, and Astroblepidae. Considering the differences observed among the phylogenies obtained with the present molecular data and those obtained with morphological data more data (morphological and molecular) are necessary for a better understanding of the relationship among the families of Loricarioidea.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Superordem Ostariophysi.....	1
1.2. Ordem Siluriformes.....	2
1.3. Superfamília Loricarioidea.....	5
1.4. Dados moleculares.....	7
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Materiais.....	18
3.2. Métodos	21
3.2.1. Isolamento de DNA genômico, amplificação e seqüenciamento.....	21
3.2.2. Extração de DNA com kit da DNeasy Tissue (Qiagen).....	21
3.2.3. Extração de DNA com kit da Wizard Genomic DNA Purification (Promega).....	22
3.2.4. Reação de amplificação.....	23
3.2.5. Visualização do DNA amplificado em gel de agarose.....	25
3.2.6. Purificação do produto da PCR com a enzima ExoSAP-IT.....	26
3.2.7. Purificação do produto da PCR com PEG.....	26
3.2.8. Reação de amplificação para o seqüenciamento de DNA.....	26
3.3. Purificação do DNA amplificado na reação de seqüenciamento e análise das amostras em seqüenciador ABI prism 37.....	27
3.4. Alinhamento das seqüências e análise filogenética.....	29
4. RESULTADOS	31
4.1. Gene 16S rRNA	33
4.1.1. Análise filogenética realizada pelo método de máxima parcimônia (MP), gene 16S rRNA.....	34
4.2. Gene citocromo oxidase I.....	36
4.2.1. Análise filogenética realizada pelo método de máxima parcimônia (MP), gene citocromo oxidase I.....	37
4.3. Gene citocromo <i>b</i>	39
4.3.1. Análise filogenética realizada pelo método de máxima parcimônia (MP), gene citocromo <i>b</i>	40
4.4. Gene <i>rag1</i>	42
4.4.1. Análise filogenética realizada pelo método de máxima parcimônia (MP), gene <i>rag1</i>	43
4.5. Gene <i>rag2</i>	45
4.5.1. Análise filogenética realizada pelo método de máxima parcimônia (MP), gene <i>rag2</i>	46
4.6. Análise combinada dos genes 16S r RNA, citocromo oxidase I, citocromo <i>b</i> , <i>rag1</i> e <i>rag2</i>	48

4.6.1. Análise filogenética realizada pelo método de máxima parcimônia (MP).....	49
5. DISCUSSÕES.....	51
5.1. Análises filogenéticas realizadas pelo método de máxima parcimônia (MP).....	51
5.2. Análises combinadas.....	52
6. CONCLUSÕES.....	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
8. ANEXOS.....	61

INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

1.1. Superordem Ostariophysi

A Sistemática, estudo das relações evolutivas entre os organismos, é a área da Biologia para a qual convergem todas as demais áreas. Considerando que a história evolutiva dos organismos está associada às mudanças climáticas e geográficas ocorridas durante a história do planeta, a elucidação das relações filogenéticas entre os seres vivos permite não só o estudo da sua evolução, como também é base para estudos biogeográficos e ecológicos (Futuyma, 1992).

O conhecimento acerca da diversidade biológica é o ponto de partida para todos os estudos básicos ou aplicados relacionados às ciências da vida e o reconhecimento de espécies, bem como a habilidade de nomeá-las, é fundamental para o estudo da ecologia, comportamento, evolução e todas as outras disciplinas relacionadas aos organismos (Savage, 1995).

A ictiofauna Neotropical de água-doce é bastante rica, incluindo, 71 famílias e 4.475 espécies reconhecidamente válidas, segundo o mais recente levantamento da diversidade de peixes de água doce das Américas do Sul e Central realizado por Reis *et al.* (2003). Além disso, estes autores estimam a existência de 6.000 espécies nos rios e lagos da região Neotropical, sendo que a estimativa disponível sobre a quantidade de peixes de água doce para todo o planeta é da ordem de 13.000 espécies. Schaefer (1998) calculou, em um levantamento das tendências históricas de descrição de espécies em Characidae e Loricariidae, que podiam existir aproximadamente 8.000 espécies de peixes de água doce neotropicais o que corresponderia 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 é um dos maiores grupos de Teleostei incluindo cerca de 25% das espécies de teleósteos e 75% da ictiofauna de água doce mundial (Fink e Fink, 1981). Espécies desse grupo estão distribuídas atualmente em cinco ordens, com um total de 63 famílias, cerca de 1.000 gêneros e 6.500 espécies

(Nelson, 2006). Os Ostariophysi compreendem duas séries: Anotoptysi, constituída pelos Gonorynchiformes, e Otophysi constituída pelos Cypriniformes, Characiformes, Gymnotiformes e Siluriformes (Fink e Fink, 1996). Os Otophysi compreendem um grupo de peixes ósseos diagnosticado pela presença do aparelho de Weber, um complexo formado por um conjunto de ossículos fundidos (*tripus*, *intercalarium*, *claustrum* e *scaphium*) que permitem a conexão da bexiga natatória com o ouvido interno (Burgess, 1989; Fink e Fink, 1996). Fink e Fink (1996) propõem a seguinte classificação para os Otophysi: Cypriniphysi, que inclui a ordem Cypriniformes, Characiphysi, incluindo os Characiformes, e Siluriphysi, que inclui duas ordens, Gymnotiformes e Siluriformes. Neste estudo, a análise filogenética das relações entre os grupos de Otophysi, estabelece Cypriniformes como grupo-irmão dos demais Otophysi e Characiformes como grupo-irmão de Siluriformes mais Gymnotiformes.

O monofiletismo de Gymnotiformes e Siluriformes, considerados grupos-irmãos, baseia-se em 16 sinapomorfias listadas em Fink e Fink (1996), sendo grande parte delas referentes à anatomia neural do sistema eletro-sensorial.

1.2. Ordem Siluriformes

Entre os Ostariophysi, Siluriformes é a ordem mais diversificada e amplamente distribuída, o que desperta grande interesse em ecólogos e biólogos evolucionistas e também é refletido em sua complexidade taxonômica, atualmente incluindo cerca de 35 famílias, 446 gêneros e 2.867 espécies segundo Nelson (2006) e 36 famílias, 478 gêneros e 3093 espécies segundo Ferraris (2007). O número de espécies de Siluriformes neotropicais conhecidas é de 1.648 espécies, divididas em 15 famílias (Reis *et al.*, 2003). Somente nos primeiros seis anos do século 21, 332 novas espécies de bagres foram descritas e entre estas o primeiro representantes de nove novos gêneros e uma nova família (Sullivan *et al.*, 2006). Estes números têm sido significativamente incrementados devido à contínua descoberta de novos táxons e famílias (Rodiles-Hernández *et al.*, 2005) e um melhor conhecimento das relações filogenéticas entre os grupos.

Com a inclusão de fósseis do Eoceno ou Oligoceno do Antártico (Grande e Eastman, 1986), representantes de Siluriformes podem ser encontrados em todos

os continentes (Nelson, 2006). Concentram-se principalmente nas regiões tropicais e neotropicais: na América do Sul, África, sul e sudeste da Ásia (Burgess, 1989; Teugels, 1996; Ferraris, 1998; de Pinna, 1998; Arratia *et al.*, 2003). Desta forma, sua distribuição parece ser limitada pela temperatura, uma vez que a maioria das espécies habita tanto regiões tropicais quanto neotropicais e, poucas são as espécies que alcançam o extremo sul da América do Sul ou o extremo norte da América do Norte (Nelson, 1994), como é o caso de *Diplomystes*, o silurídeo considerado o mais primitivo, o único que possui maxilar dentado e ocorre no extremo sul da América do Sul (de Pinna, 1998).

Embora a grande maioria dos peixes desta ordem seja encontrada em ambientes de água doce, duas famílias, Ariidae e Plotosidae possuem uma representação significativa de espécies primariamente marinhas (Burgess, 1989; de Pinna, 1998). Além disso, as famílias Pimelodidae, Pangasiidae, Aspredinidae e Auchenipteridae incluem algumas espécies estuarinas, que podem ainda, apresentar certa tolerância a ambientes marinhos (de Pinna, 1998).

Os Siluriformes são popularmente conhecidos no Brasil como “bagres”, “cascudos”, “armados”, “mandis”, “jaús” ou “pintados”. Apresentam uma grande variedade de formas, com inúmeras adaptações anatômicas, fisiológicas e comportamentais, ocupando um amplo espectro de nichos e ambientes. Possuem hábitos predominantemente crepusculares e noturnos, o que os leva a habitar, em geral, locais com águas turvas como o fundo dos rios e a permanecer entre rochas e a vegetação (Ferraris, 1998, 2007). São caracterizados principalmente por possuírem total ausência de escamas sobre o corpo, presença de barbilhões e freqüentemente acúleos fortes e pungentes à frente do primeiro raio das nadadeiras dorsal e peitorais (Alexander, 1965; Paxton e Eschmeyer, 1998). O corpo desprovido de escamas pode ser revestido por uma pele espessa, ou então, coberto total ou parcialmente com placas ósseas (Burgess, 1989). Geralmente possuem três pares de barbilhões providos com numerosas papilas táteis e gustativas, provavelmente utilizados para localizar alimentos no fundo e orientar sua natação (Alexander, 1965; Paxton e Eschmeyer, 1998). Os hábitos alimentares também são muito variados, com espécies herbívoras, planctófagas, carnívoras e onívoras. Além disso, há espécies com hábitos alimentares extremamente particulares como os representantes de duas subfamílias de Trichomycteridae, os Vandelliinae, que são hematófagos, se alimentam de sangue das brânquias de outros peixes (Kelley e Atz,

1964; Machado e Sazima, 1983) e os Stegophilinae, que são lepidófagos (“comedores de escamas”) (Nelson, 1994, 2006). Na Amazônia, Vandelliinae e Stegophilinae são popularmente conhecidos como “candirus”. A penetração acidental de Vandelliinae na uretra de humanos e outros mamíferos têm sido reportada há muitos anos (Gudger, 1930).

A enorme 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, 2002). Embora sua diversidade e distribuição atraiam um grande interesse, esses dois fatores provavelmente respondem pelo pequeno número de estudos sobre as relações entre os grandes grupos de Siluriformes (Britto, 2002). 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 simplesmente não embasadas. Entretanto, o autor ressalta que tais trabalhos não devem ser ignorados.

Apesar da importância científica e econômica (como importante item alimentar, pesca esportiva e principalmente na aquarofilia) dos Siluriformes, o grupo apresenta ainda inúmeros problemas sistemáticos e taxonômicos devido a sua ampla diversidade, sendo ainda a elucidação de relações filogenéticas entre os grupos de Siluriformes, o maior problema na sistemática de peixes (de Pinna, 1998). A própria classificação das famílias de Siluriformes ainda não é consensual, por exemplo, o número de famílias reconhecidas para a ordem é de 29 segundo Ferraris (1998), 33 para Teugels (1996) e Eschmeyer (1998), 34 para Nelson (1994), 35 segundo Ferraris e de Pinna (1999), Britto (2002) e Nelson (2006) e 36 segundo Ferraris (2007). Embora nos últimos anos notem-se progressos, a grande maioria dos estudos cladísticos sobre a filogenia dos Siluriformes é dedicada aos intra-relacionamentos de famílias de Siluriformes (Diogo, 2003). Não há dúvida sobre a monofilia de Siluriformes, como indicado por vários complexos anatômicos de sinapomorfias (Fink e Fink, 1981, 1996; Arratia *et al.*, 2003). Contudo, há cinco importantes trabalhos que atentam para uma análise filogenética abrangente entre as famílias de Siluriformes: Mo (1991), de Pinna (1993, 1998) e Britto (2002); os quais têm por base uma grande quantidade de caracteres morfológicos e Sullivan *et al.* (2006), que utilizou seqüências dos genes nucleares *rag1* e *rag2*. Entre os tópicos abordados por de Pinna (1998) em seu estudo sobre as relações

filogenéticas dos Siluriformes neotropicais (Figura 1), o autor apresenta uma comparação entre os resultados obtidos por Mo (1991) e por de Pinna (1993) concluindo que há uma 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.

O trabalho realizado por Britto (2002) contém uma extensa revisão de todos os trabalhos morfológicos realizados para a ordem, iniciados em épocas remotas com o de Aristóteles. Sua análise filogenética teve como base 331 caracteres morfológicos de representantes de todos os principais grupos da ordem Siluriformes, e indicou que algumas famílias formam agrupamentos polifiléticos, mas vários grupos tradicionais tiveram seu monofiletismo corroborado (Figura 2), concordando em parte com as hipóteses propostas por Mo (1991) e de Pinna (1993, 1998).

Recentemente, Sullivan *et al.* (2006), analisou as relações entre as diversas famílias de Siluriformes, para isso, utilizou 110 espécies de bagres, representando 36 das 37 famílias. Analisou 3660 pares de bases dos genes nucleares *rag1* e *rag2*, confirmando a monofilia de Siluriformes, da maioria das famílias de Siluriformes, da superfamília Loricarioidea e de um número de grupos de multifamílias, alguns reconhecidos e outros novos. A superfamília Loricarioidea, da América do Sul, foi reconhecida como grupo-irmão de todos os outros bagres, os quais aparecem divididos em Diplomystidae e Siluroidea. Este resultado contrasta com hipóteses prevalentes que Diplomystidae é grupo-irmão de todos os outros bagres.

Entre as famílias de Siluriformes há muitas hipóteses de relações conflitantes ou incompletamente resolvidas que foram baseadas em morfologia ou moléculas e necessitam ser testadas com caracteres e espécies adicionais (Sullivan *et al.*, 2006).

1.3. Superfamília Loricarioidea

A superfamília Loricarioidea é o maior grupo monofilético de Siluriformes da região neotropical (de Pinna, 1998; Britto, 2002). Esta superfamília foi o primeiro grupo natural de famílias de Siluriformes reconhecido. Essa afinidade foi primeiramente proposta por Peyer (1922), com base na presença de odontódeos e na estrutura do primeiro raio da nadadeira peitoral. Além destes caracteres, de Pinna (1998) identificou mais dois que corroboram o monofiletismo da superfamília, que são: dentes mandibulares com cúspides bífidas e ramos anteriores do

basipterígio sem cartilagem nos adultos. De acordo, com a recente análise de Britto (2002), a presença dos ossículos do aparelho de Weber encapsulados mostrou-se um caráter exclusivo para Loricarioidea.

Atualmente a superfamília Loricarioidea é composta por seis famílias: Nematogenyidae (1 espécie), Trichomycteridae (201 espécies), Callichthyidae (177 espécies), Scoloplacidae (4 espécies), Astroblepidae (54 espécies) e Loricariidae (684 espécies) (de Pinna, 1998; Nelson, 2006). Dentro desse grupo estão os três maiores gêneros de Siluriformes: *Hypostomus*, *Corydoras* e *Trichomycterus*, além de um grande número de espécies de interesse econômico, principalmente como espécies ornamentais.

As hipóteses de relacionamento entre as famílias constituintes de Loricarioidea proposta por de Pinna (1998) e Britto (2002) mostram que as famílias Callichthyidae, Scoloplacidae, Astroblepidae e Loricariidae divergem de Nematogenyidae e Trichomycteridae, com a formação de dois grupos, um com Nematogenyidae como grupo-irmão de Trichomycteridae e o outro grupo com os demais membros da superfamília, tendo Loricariidae e Astroblepidae como grupos-irmãos. Na análise filogenética da ordem Siluriformes de Britto (2002), com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea, há um resumo histórico das descrições das relações de representantes da superfamília citando a existência de certa divergência entre a posição de Trichomycteridae e Nematogenyidae em relação às outras famílias de Loricarioidea, onde talvez Trichomycteridae fosse grupo-irmão dos demais Loricarioidea (Baskin, 1973; Schaefer & Lauder, 1986; Schaefer, 1990). Apesar de ter sido objeto de vários estudos, ainda hoje as sinapomorfias conhecidas para o grupo são poucas, como pode ser observado na Figura 3. Também, as filogenias apresentadas em de Pinna (1998) revelam que são relativamente poucas as hipóteses de relacionamento dentro das famílias de Loricarioidea.

1.4. Dados moleculares

O estudo das relações entre organismos tem recebido, nos últimos anos, um considerável impulso com o advento das técnicas de PCR (*polimerase chain reaction*) e de seqüenciamento de DNA. A possibilidade de obtenção de uma quantidade bastante grande de dados em um tempo relativamente curto tem

estimulado muitos pesquisadores a incluir em seus projetos de estudo análises de seqüências de DNA. Assim, por exemplo, no conjunto de trabalhos publicados no livro editado por Kocher e Stepien (1997) pode-se observar o amplo e versátil emprego das análises moleculares na elaboração de hipóteses de relacionamento em diversos níveis taxonômicos variando de populações locais até grandes grupos de peixes.

Entre os genes mais comumente seqüenciados estão os genes mitocondriais. O tamanho do genoma mitocondrial (mtDNA) é bastante variável, apresentando valores em torno de 16 quilobases (kb) nos vertebrados até 570 kb em algumas espécies de plantas (Lewin, 1994). Estudos extensivos realizados com o genoma mitocondrial de peixes têm mostrado que o mesmo é constituído por cerca de 17.000 pares de base, sendo que nesse genoma encontram-se os genes 12S e 16S do rRNA, 22 genes de tRNA, as subunidades I, II e III do citocromo *c*, a subunidade 6 da ATPase, o citocromo *b* e genes para seis subunidades da NADH (Miya *et al.*, 2003). Os únicos casos em que o genoma mitocondrial apresentou uma ordem diferente da usual para os peixes, foram observados entre representantes de algumas famílias de Anguilliformes (Inoue *et al.*, 2001).

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

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 foram publicados nos últimos anos mostrando a utilidade desses genes em estudos de diversos grupos de vertebrados como entre os peixes (Ortí e Meyer, 1996; Ortí, 1997; Lovejoy e Collete, 2001; Lavoué *et al.*, 2003; Calcagnotto *et al.*, 2005), répteis (Slowinski e Lawson, 2002), aves (Chubb, 2004) e mamíferos (Misawa e Janke, 2003; Teeling *et al.*, 2003; Delsuc *et al.*, 2003).

No estudo de Lavoué *et al.* (2003), uma filogenia para os peixes elétricos da superfamília Mormyroidea foi construída com base em dados dos genes nucleares *rag2* e *S7* e dos genes mitocondriais citocromo *b*, 12S e 16S rRNA. Os resultados obtidos foram bastante resolutivos na determinação dos padrões de relacionamento dentro da superfamília e foram bastante úteis na interpretação da evolução do sistema de eletrócitos nesses animais. Os autores concluem que os genes utilizados por eles podem ser bastante úteis em estudos sistemáticos em nível de subfamília nos peixes teleósteos.

A possibilidade de utilização de seqüências de DNA para construção de filogenias torna possível não só uma melhor interpretação da história evolutiva das espécies em si, como também permite a análise simultânea dos padrões evolutivos seguidos por outros caracteres, que por sua vez apresentam menor possibilidade de interpretação filogenética. Um exemplo desse tipo de utilização de dados de DNA está no trabalho de Alves-Gomes *et al.* (1995), onde a filogenia dos peixes da ordem Gymnotiformes foi reconstruída, tendo como base dados de mtDNA (parte das subunidades 12S e 16S do rRNA), assim como dados de morfologia e eletrofisiologia. Neste trabalho, os dados moleculares serviram para elaboração de uma nova hipótese filogenética, que se mostrou mais congruente com a possível evolução morfológica e fisiológica dos peixes desse grupo, permitindo inclusive aos autores a proposição da criação de uma nova família para essa ordem.

Recentemente as relações entre os gêneros da família Callichthyidae foram estudadas por Shimabukuro-Dias *et al.* (2004), utilizando seqüências de DNA mitocondrial (seqüências parciais dos genes 12S rRNA, 16S rRNA, ND4 e tRNA^{Ser} e a seqüência completa do gene tRNA^{His}), num total de aproximadamente 1.600 pares de base para 28 espécies. As filogenias obtidas confirmaram o monofiletismo da família Callichthyidae e das subfamílias Callichthyinae e Corydoradinae. Por outro lado, as relações entre os gêneros constituintes de cada subfamília foram bastante diferentes daquelas apresentadas por Reis (1998). Particularmente para a subfamília Callichthyinae, os estudos moleculares sugeriram um padrão de relação bastante diferente entre os gêneros (com alto suporte estatístico). Assim, o gênero *Callichthys* que era considerado o mais primitivo para a subfamília (Reis, 1998), aparece como grupo irmão de *Lepthoplosternum* e *Megalechis*. Já o gênero *Dianema*, que na hipótese apresentada por Reis (1998) apareceu como um dos gêneros mais derivados foi o grupo mais primitivo nas análises moleculares. O

estudo conjunto de dados morfológicos e moleculares, pesando-os igualmente, não alterou significativamente a filogenia obtida apenas com dados moleculares; por outro lado uma filogenia similar à proposta por Reis (1998) foi obtida somente quando os dados morfológicos receberam pesos 10 vezes superiores aos dados moleculares (Shimabukuro-Dias *et al.*, 2004).

Murphy e Collier (1997) apresentaram uma filogenia, com base em fragmentos do citocromo *b*, e dos genes para 12S rRNA e 16S rRNA, para as famílias Aplocheiloidei (África) e Rivulidae (América do Sul), que compreende várias espécies conhecidas como “peixes anuais”. A distribuição de espécies anuais nessa filogenia sugere que o anualismo surgiu no início da diferenciação desse grupo e parece ter sido perdido várias vezes nos gêneros que atualmente habitam ambientes aquáticos permanentes (Murphy e Collier, 1997). Em um trabalho recente desenvolvido por Koblmüller *et al.* (2004), com ciclídeos do grupo Ectodini, utilizando seqüências parciais de três genes mitocondriais (citocromo *b*, D-loop e ND2), os autores concluíram que o tipo de vida bentônica em substrato arenoso é uma característica primitiva para o grupo. Ainda segundo os autores, os resultados de seus estudos sugerem que os habitats rochosos foram colonizados independentemente em dois sub-grupos de Ectodini. O modo de reprodução dos peixes desse grupo parece ser também altamente plástico: com a estratégia de incubação oral por animais de ambos os sexos evoluindo uma vez no ancestral comum do grupo e sofrendo reversão pelo menos três vezes em sua história evolutiva ou com essa característica evoluindo pelo menos cinco vezes de forma independente a partir de ancestrais com incubação oral apenas nas fêmeas (Koblmüller *et al.*, 2004).

A elaboração de filogenias moleculares permite também testar hipóteses de relacionamento construídas com base em outros caracteres como os caracteres morfológicos. Assim, por exemplo, com base em dados de DNA (parte da seqüência do citocromo *b*), uma filogenia molecular foi elaborada para os peixes do gênero *Gambusia* (Lydeard *et al.*, 1995). A comparação dessa filogenia com outra baseada em dados morfológicos mostrou que elas eram incongruentes, o que levou os autores a propor uma terceira filogenia abrangendo os dados morfológicos e moleculares. Por outro lado, a comparação da filogenia resultante com filogenias elaboradas para dois outros gêneros de peixes, que apresentam praticamente os mesmos padrões de distribuição geográfica, permitiu identificar várias

incongruências quanto aos cladogramas de área obtidos. Assim, os autores concluíram que há a necessidade de construção de várias hipóteses filogenéticas, baseadas em diferentes conjuntos de caracteres, antes de se procurar interpretar a história evolutiva de um táxon ou de uma região.

Recentemente as relações entre as famílias de Loricarioidea foram investigadas por Miguel (2004), utilizando seqüências de DNA mitocondrial. Foram seqüenciados os genes mitocondriais das duas subunidades do RNA ribossômico (12S e 16S), os genes codificadores de duas subunidades da citocromo oxidase c (COI e COII) e de sete genes de RNA transportador, totalizando onze genes e seqüências que variaram em tamanho de 5360 a 5399 pares de bases. Foram analisadas dez espécies de Siluriformes, incluindo representantes de Diplomystidae, Cetopsidae, Aspredinidae, Amphiliidae, Nematogenyidae, Trichomycteridae, Callichthyidae, Scoloplacidae, Loricarioidea e Astroblepidae. Ainda que as diferentes filogenias obtidas pelos métodos de máxima parcimônia e máxima verossimilhança não tenham sido todas congruentes, foi confirmada a monofilia de Loricarioidea, foi confirmada a monofilia do clado formado por Amphiliidae e Loricarioidea e foi confirmada a posição basal de Trichomycteridae em relação aos demais Loricarioidea. Essas hipóteses haviam sido propostas em estudos morfológicos do grupo (Britto, 2002). Por outro lado, os dados moleculares sustentaram a existência de um clado formado pelas famílias Loricariidae e Callichthyidae que seria irmão do clado formado pelas famílias Nematogenyidae, Scoloplacidae e Astroblepidae (Figura 4). As espécies de Nematogenyidae e Scoloplacidae apareceram formando um grupo monofilético em grande parte das análises moleculares. Sullivan *et al.* (2006), utilizou seqüências do DNA nuclear para estudar as relações entre as famílias de Loricarioidea. Foram utilizadas 110 espécies de bagres. Os genes nucleares *rag1* e *rag2* foram seqüenciados, num total de 3660 pares de bases. Foi confirmada a monofilia de Loricarioidea, porém a relação entre Trichomycteridae, Nematogenyidae e o clado formado pelas demais famílias de Loricarioidea não foi determinada (Figura 5).

Considerando as diferenças observadas entre as filogenias obtidas com dados morfológicos e moleculares conclui-se que uma ampliação dos dados moleculares, com a análise de novos táxons, novas seqüências, incluindo genes nucleares, será fundamental para um melhor entendimento das relações entre as famílias de Loricarioidea.

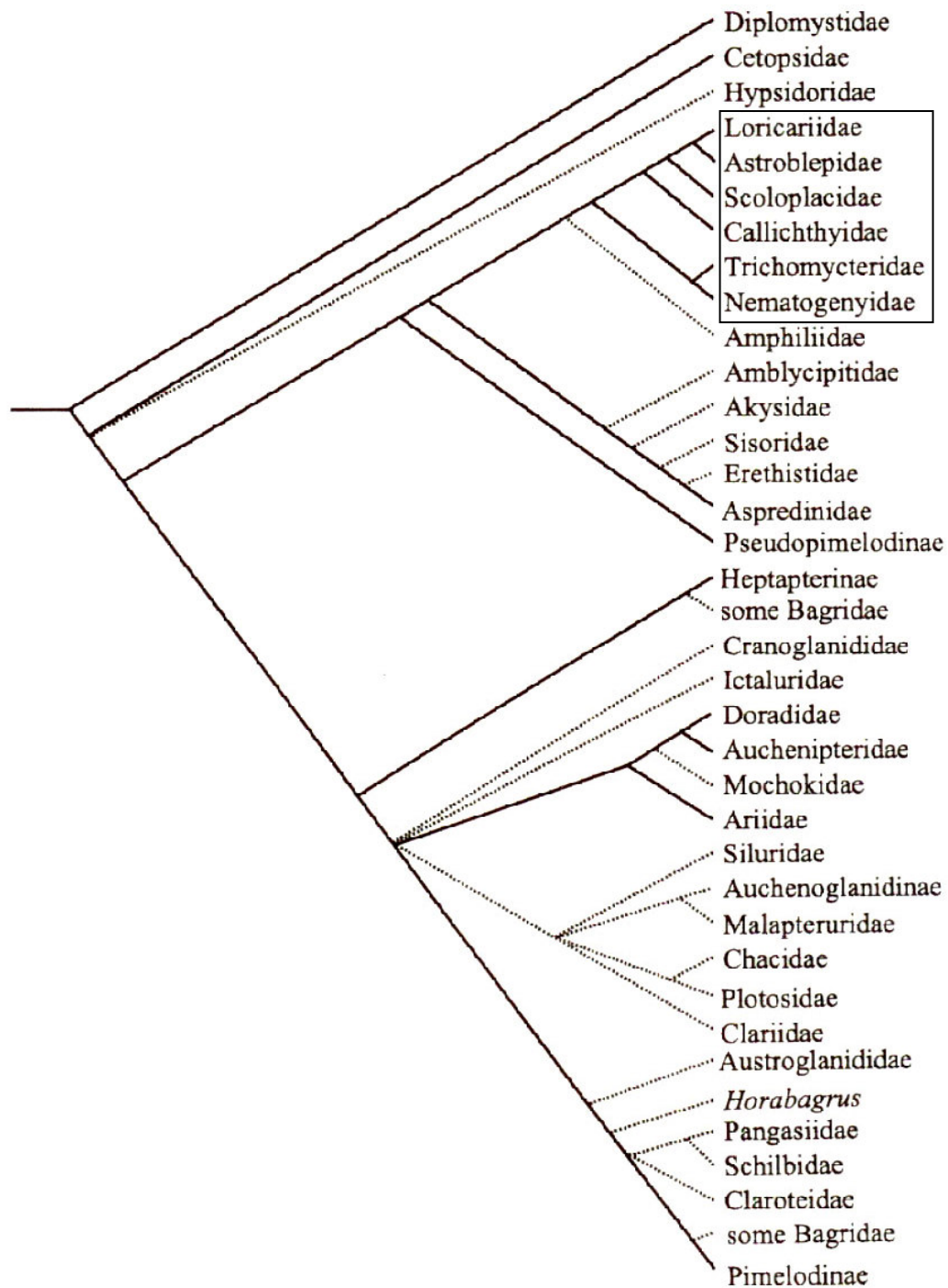


Figura 1. Cladograma expressando as relações entre os Siluriformes, proposto por de Pinna (1998). A partir de componente de informação combinada de Mo (1991), de Pinna (1993), Lundberg (1993) e de Pinna (1996). As linhas contínuas indicam os táxons que ocorrem no Neotrópico. Em destaque a superfamília Loricarioidea.

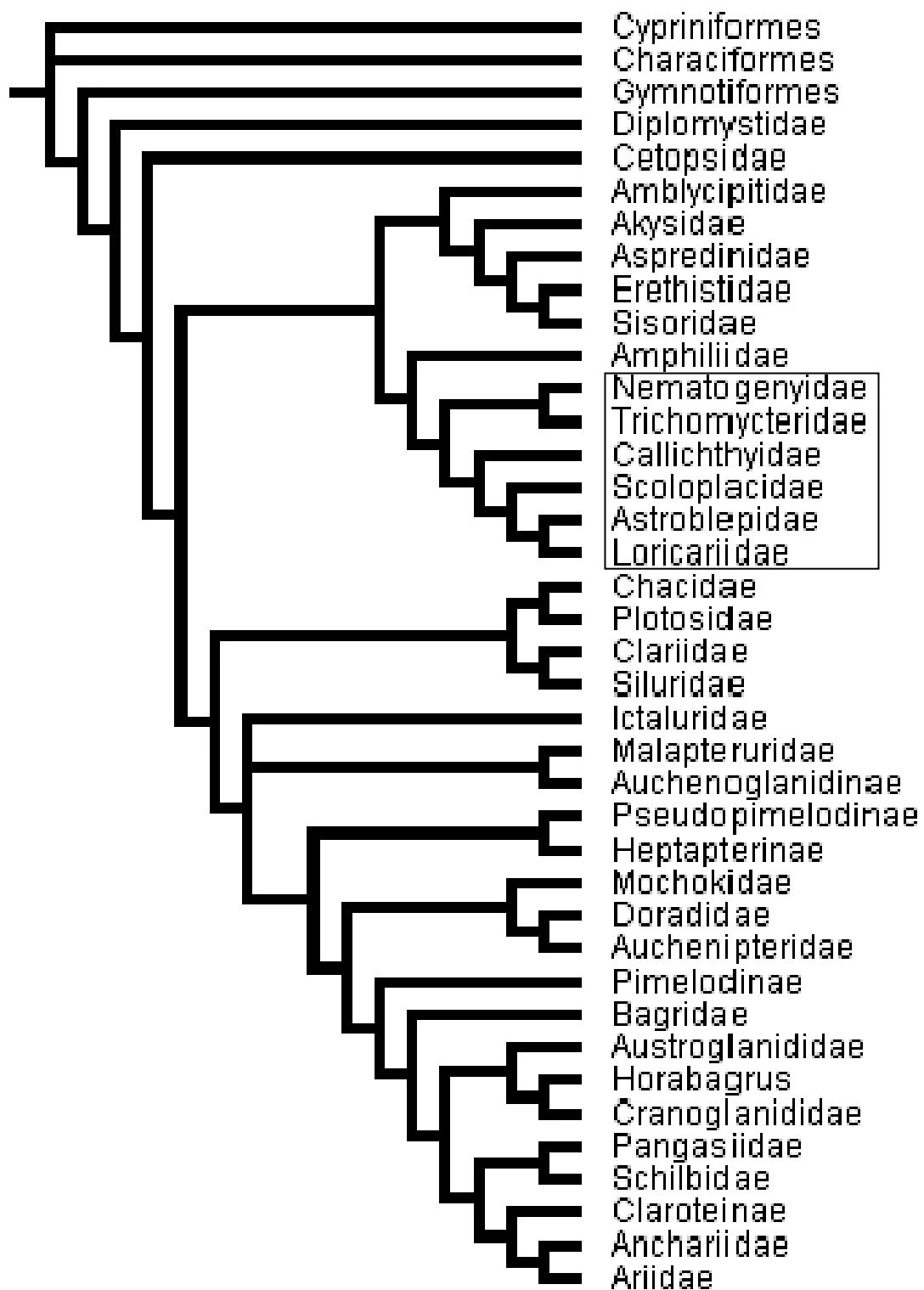


Figura 2. Filogenia proposta por Britto (2003) para a ordem Siluriformes. Em destaque a superfamília Loricarioidea.

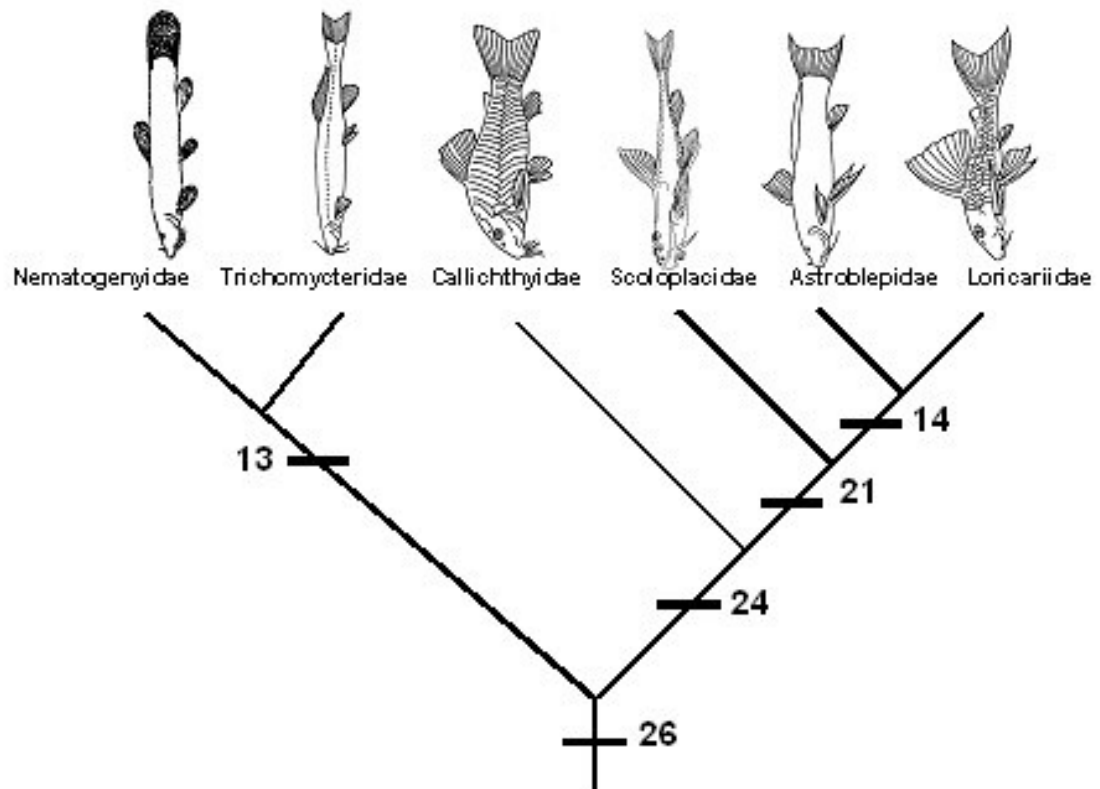


Figura 3. Cladograma mostrando as relações entre as famílias de Loricarioidea. Os retângulos pretos mostram o número de transformações de caracteres suportando cada ramo, segundo Britto (2003), modificado por Miguel (2004).

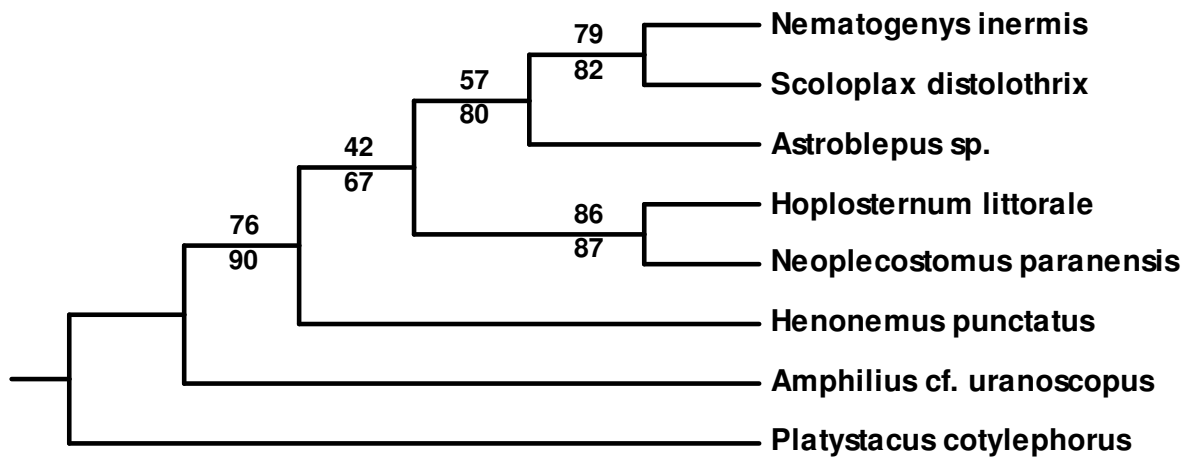


Figura 4. Árvore consenso de Máxima Parcimônia por Miguel (2004) para a superfamília Loricarioidea. Os números acima dos ramos são valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas. Utilizando os mesmos dados, mas com a proporção Tv/Ti 2:1, uma árvore idêntica é encontrada (TL= 6300, CI= 0,5880, HI= 0,4120, RI= 0,2890), e os números abaixo dos ramos correspondem aos seus valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas. *Amphilius* e *Platystacus* foram considerados grupo externo.

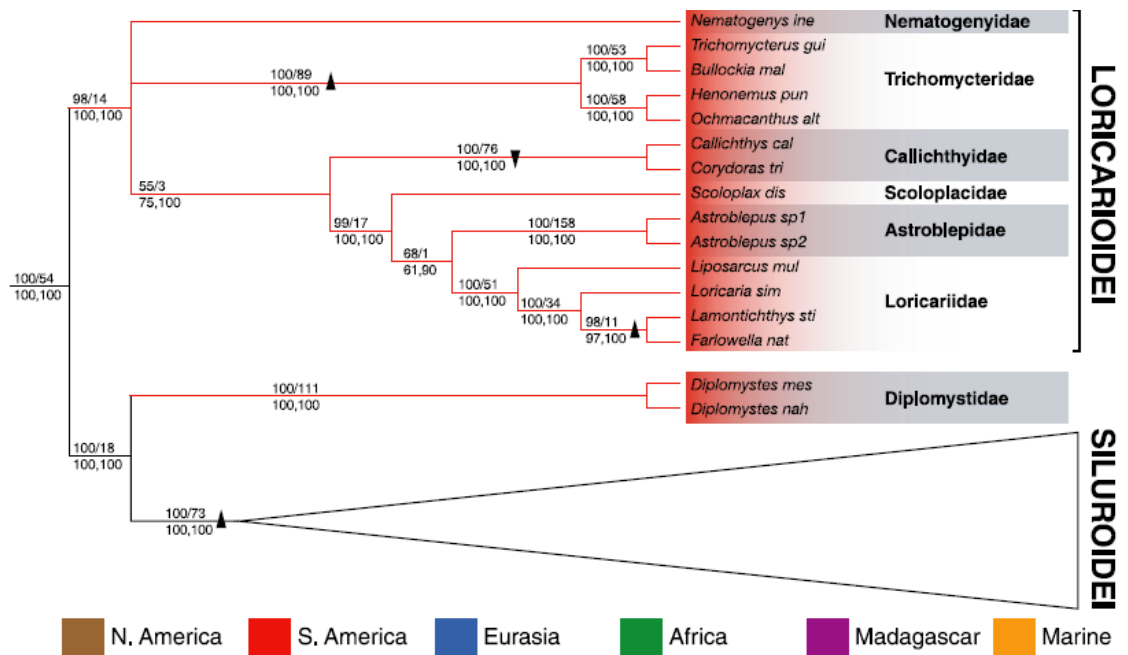
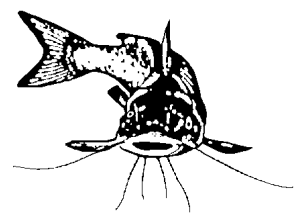


Figura 5. Filogenia de linhagens de Siluriformes, detalhes entre Loricarioidea e Diplomystidae, proposta por Sullivan *et al.* (2006). Subclados com suporte de ou acima da proporção de *bootstrap* 50%. Grupo externo omitido. Proporções do *bootstrap* da análise de Parcimônia e índice de decaimento (Bremer) são mostradas acima dos ramos. Proporções do *bootstrap* de Likelihood e Bayesiana, (probabilidades posterior, %) são mostradas abaixo. Sinapomorfias indicadas por triângulos pretos: para cima, deleção, para baixo, inserção. Distribuições dos táxons, continental ou marinha são indicadas por códigos à cores. Os nomes das espécies estão abreviados com as três primeiras letras.

OBJETIVOS



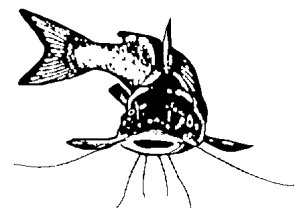
2. OBJETIVOS

O presente trabalho se insere em um projeto geral de estudo da superfamília Loricarioidea, intitulado “Filogenia e evolução de Loricarioidea: uma abordagem multidisciplinar”, cujo objetivo principal é ampliar o conhecimento sobre a diversidade e os padrões de relacionamento neste grupo.

Este trabalho, em particular, procura contribuir com a obtenção de um conjunto de caracteres moleculares tendo como base genes mitocondriais e nucleares de representantes de Loricarioidea, bem como de outras famílias de Siluriformes que servirão como grupos externos. Assim, os objetivos deste trabalho foram:

- 1.** Seqüenciar segmentos do genoma mitocondrial e nuclear de representantes das famílias Trichomycteridae, Nematogenyidae, Callichthyidae, Scoloplacidae, Astroblepidae e Loricariidae, principalmente as espécies consideradas mais primitivas, com o propósito de obter dados suficientes para elaborar e testar hipóteses de relacionamento entre as famílias dessa superfamília;
- 2.** Combinar os dados moleculares dos genes seqüenciados para elaboração de uma árvore de consenso para os táxons analisados.

MATERIAIS E MÉTODOS



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Foram coletados exemplares das seis famílias de Loricarioidea: Nematogenyidae, Trichomycteridae, Callichthyidae, Loricariidae, Astroblepidae e Scoloplacidae (Figura 6), em lagoas ou rios, em diferentes bacias hidrográficas das Américas do Sul e Central.

A espécie *Diplomystes camposensis* (Diplomystidae), foi utilizada como grupo externo em quase todas as análises, exceto na análise individual do gene *rag2*, que foi utilizado *Diplomystes mesembrinus*.

Os peixes foram identificados e depositados nas coleções de peixes e tecidos do Smithsonian Tropical Research Institute (STRI), Panamá, e do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP), Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Na Tabela 1 estão relacionados os exemplares utilizados neste estudo, assim como os locais de coleta e o número de catálogo da coleção onde estão depositados os exemplares.

Dos animais capturados foram retiradas amostras de tecidos, como fígado, músculo e brânquias. Os tecidos foram preservados em etanol 95% com 0,5µM de EDTA. Os exemplares foram fixados em formol 10% e estão conservados em álcool 70% para realização de estudos taxonômicos futuros.

Tabela 1: Exemplos utilizados nas análises filogenéticas e seus respectivos dados sobre localidade de coleta.

Família/Subfamília	Espécie	Lote	Local de Coleta
Grupo interno			
Astroblepidae	<i>Astroblepus longifilis</i>	STRI 01692	Rio Azucar-Bulebgand/Panamá (9,398330, -78,65694)
Astroblepidae	<i>Astroblepus longifilis</i>	STRI 01692	Rio Azucar-Bulebgand/Panamá (9,398330, -78,65694)
Astroblepidae	<i>Astroblepus trifasciatum</i>	STRI 06685	Rio Chagres/Panamá (9,360083, -79,32225)
Astroblepidae	<i>Astroblepus trifasciatum</i>	STRI 06686	Rio Chagres/Panamá (9,359639, -79,27878)
Astroblepidae	<i>Astroblepus trifasciatum</i>	STRI 01695	Rio Cana/Panamá (7, 750000, -77,68458)
Astroblepidae	<i>Astroblepus trifasciatum</i>	STRI 01690	Quebrada Bayano/Panamá (9,12, -78,36)
Astroblepidae	<i>Astroblepus sp.</i>	LBP 1352	Rio Jequetepeque/Peru (S 07°15'30.9" W 78°38'47.5")
Callichthyidae	<i>Hoplosternum punctatum</i>	STRI 01797	Rio Chucunaque/Panamá (8,629720, -77,92722)
Callichthyidae	<i>Dianema urostriata</i>	LBP 527	Alto Rio Negro/Amazonas/Brasil
Subfamília Ancistrinae			
Loricariidae	<i>Ancistrus spinosus</i>	STRI 01713	Rio Ipeti/Panamá (8,979440, -78,50556)
Loricariidae	<i>Ancistrus spinosus</i>	STRI 07103	Rio Santa Maria/Panamá (8,211120, -80,96622)
Loricariidae	<i>Ancistrus spinosus</i>	STRI 01716	Rio Membrillo Sina/Panamá (8,618300, -77,83110)
Loricariidae	<i>Ancistrus spinosus</i>	STRI 02003	Rio Pirre/Panamá (8,02351, -77,74069)
Loricariidae	<i>Ancistrus chagresi</i>	STRI 01711	Rio Aguas Claras/Panamá (9,25386111, -78,683583)
Loricariidae	<i>Ancistrus chagresi</i>	STRI 07103	Rio Guabal/Panamá (8,71352778, -80,597056)
Loricariidae	<i>Chaetostoma fischeri</i>	STRI 07104	Rio Chagres/Panamá (9,360083, -79,32225)
Loricariidae	<i>Chaetostoma fischeri</i>	STRI 01752	Rio Membrillo Sina/Panamá (8,618300, -77,83110)
Loricariidae	<i>Chaetostoma fischeri</i>	STRI 01772	Rio Aguas Claras/Panamá (9,25386111, -78,683358)
Loricariidae	<i>Chaetostoma fischeri</i>	STRI 01771	Rio Cana/Panamá (7,75, -77,684583)
Loricariidae	<i>Hemiancistrus aspidolepis</i>	STRI 02012	Rio Las Guias/Panamá (8,196170, -80,76569)
Loricariidae	<i>Hemiancistrus aspidolepis</i>	STRI 02013	Rio Iglesia/Panamá (8,423060, -78,00139)
Loricariidae	<i>Hemiancistrus aspidolepis</i>	STRI 02006	Rio Tabasara/Panamá (8,203850, -81,58612)
Loricariidae	<i>Lasiancistrus planiceps</i>	STRI 01805	Rio Chucunaque/Panamá (8,629720, -77,92722)
Loricariidae	<i>Lasiancistrus planiceps</i>	STRI 01814	Rio Balsas/Panamá (7,695990, -77,82633)
Loricariidae	<i>Lasiancistrus planiceps</i>	STRI 01803	Rio Mandinga/Panamá (9,469950, -79,12415)
Loricariidae	<i>Leptoancistrus canensis</i>	STRI 01833	Rio Cana/Panamá (7,750000, -77,68458)
Subfamília Loricariinae			
Loricariidae	<i>Crossoloricaria variegata</i>	STRI 01780	Rio Membrillo Sina/Panamá (8,618300, -77,83110)
Loricariidae	<i>Dasylicaria capetensis</i>	STRI 01783	Rio Membrillo Sina/Panamá (8,618300, -77,83110)
Loricariidae	<i>Dasylicaria capetensis</i>	STRI 01783	Rio Membrillo Sina/Panamá (8,618300, -77,83110)
Loricariidae	<i>Dasylicaria tuyrensis</i>	STRI 01616	Rio Tuirá/Panamá (8,062380, -77,58311)
Loricariidae	<i>Rineloricaria altipinnis</i>	STRI 01847	Rio Ipeti/Panamá (8,979440, -78,50556)
Loricariidae	<i>Rineloricaria altipinnis</i>	STRI 01846	Rio Chucunaque/Panamá (8,629720, -77,92722)
Loricariidae	<i>Rineloricaria altipinnis</i>	STRI 01851	Rio Membrillo/Panamá (8,625900, -77,81700)
Loricariidae	<i>Rineloricaria uracantha</i>	STRI 02326	Quebrada Bejuco/Panamá (8,532861, -82,42664)
Loricariidae	<i>Rineloricaria uracantha</i>	STRI 01844	Rio Mandinga/Panamá (9,469950, -79,12415)
Loricariidae	<i>Rineloricaria uracantha</i>	STRI 01844	Rio Mandinga/Panamá (9,469950, -79,12415)
Loricariidae	<i>Sturisoma panamense</i>	STRI 01874	Quebrada El Nance/Panamá (8,413167, -81,04850)
Loricariidae	<i>Sturisoma panamense</i>	STRI 01871	Rio Balsas/Panamá (7,695990, -77,82633)
Loricariidae	<i>Sturisoma panamense</i>	STRI 01864	Rio La Villa/Panamá (7,9016, -80,52356)
Loricariidae	<i>Sturisomatichthys citurensis</i>	STRI 01878	Rio Parti/Panamá (9,056000, -78,65950)
Loricariidae	<i>Sturisomatichthys citurensis</i>	STRI 01882	Rio Balsas/Panamá (7,695990, -77,82633)
Trichomycteridae	<i>Trichomycterus striatus</i>	STRI 05452	Rio Moreno/Panamá (8,779417, -80,53447)
Trichomycteridae	<i>Trichomycterus striatus</i>	STRI 07105	Rio Piedras/Panamá (9,301556, -79,33153)
Trichomycteridae	<i>Trichomycterus striatus</i>	STRI 01937	Rio Capeti/Panamá (8,057500, -77,58111)
Trichomycteridae	<i>Trichogenes longipinnis</i>	LBP 3862	Cachoeira do Amor/Brasil (S 23°21'06.8" W 44° 45'48.9")
Scolopacidae	<i>Scoloplax distolothrix</i>	LBP 1424	Rio Itiquira/Brasil (S 17°28'13" W 55°14'46.7")
Nematogenyidae	<i>Nematogenys inermis</i>	LBP 3105	Rio Andalién/Chile (S36°50.304" W 72°55.642')
Grupo externo			
Diplomystidae	<i>Diplomystes camposensis</i>	LBP 3106	Rio San Pedro/Chile (S 39°51'34.5" W 72°47'50.6")



Astroblepus sp.
Astroblepidae



Dianema urostriata
Callichthyidae



Nematogenys inermis
Nematogenyidae



Scoloplax empousa
Scoloplacidae



Sturisoma panamense
Loricariidae



Trichogenes longipinnis
Trichomycteridae

Figura 6: Alguns representantes da superfamília Loricarioidea.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Isolamento de DNA genômico, amplificação e seqüenciamento

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras de fígado, músculo ou brânquias, utilizando-se de duas metodologias de extração de DNA.

3.2.2. Extração de DNA com kit da DNeasy Tissue (Qiagen)

1. Cortar um pedaço de tecido (do tamanho de um grão de arroz);
2. Colocar o tecido em um tubo de 1.5ml contendo 200µl de “ATL” e 15µl de Proteinase K;
3. Colocar o tubo em banho-maria a 55°C por 1 hora ou mais, até que a proteína tenha digerido todo o tecido;
4. Adicionar 200µl de “AL” ao tubo e colocar em outro banho-maria a 70°C por 10 minutos;
5. A cada 4 minutos agitar os tubos (vórtex);
6. Após os 10 minutos, adicionar ao tubo 200µl de etanol 98%, misturar (vórtex) e transferir o líquido para a “coluna de Qiagen”;
7. Centrifugar a 6000rpm por 1 minuto a temperatura ambiente;
8. Descartar o líquido juntamente com o tubo coletor;
9. Colocar um novo tubo coletor e adicionar a coluna 500µl de “AW1”;
10. Centrifugar a 6000rpm por 1 minuto a temperatura ambiente;
11. Descartar o líquido juntamente com o tubo coletor;
12. Colocar um novo tubo coletor e adicionar a coluna 500µl de “AW2”;
13. Centrifugar a 13000rpm por 3 minutos a temperatura ambiente;
14. Descartar o líquido juntamente com o tubo coletor, colocar a coluna em um tubo de 1.5ml;
15. Adicionar a coluna 250µl de “AE” (tampão para preservar o DNA);
16. Centrifugar a 6000rpm por 1 minuto a temperatura ambiente;
17. Descartar a coluna;
18. Aliquotar 100µl de DNA e guardar na geladeira (-4°C, solução de trabalho), o restante do DNA guardar no freezer (-20°C, solução estoque);
19. Preparar um gel de agarose a 1% para quantificar e verificar a integridade do DNA.

3.2.3. Extração de DNA com kit da Wizard Genomic DNA Purification (Promega)

1. Pesar um pedaço de tecido entre 10 - 20mg (0,01 a 0,02g);
2. Colocar o tecido em um tubo de 1.5ml contendo 600µl de “Nuclei Lysis Solution” e 10µl de Proteinase K;
3. Fragmentar o tecido;
4. Incubar a 65°C por 1 hora, agitar o tubo por inversão de 15 em 15 minutos;
5. Adicionar 3µl de “RNase Solution” ao material lisado e agitar o tubo (vórtex);
6. Incubar o líquido a 37°C por 30 minutos;
7. Adicionar 200µl de “Protein Precipitation Solution” e misturar vigorosamente utilizando um vórtex em alta velocidade;
8. Deixar no gelo por 5 minutos;
9. Centrifugar a 16000rpm por 4 minutos a temperatura ambiente;
10. Transferir o sobrenadante (cerca de 600µl) para um tubo de 1.5ml contendo 600µl de etanol 100% e agitar o tubo por inversão;
11. Centrifugar a 16000rpm por 1 minuto a temperatura ambiente;
12. Descartar o líquido do tubo;
13. Adicionar ao tubo 600µl de etanol 70%;
14. Centrifugar a 16000rpm por 1 minuto a temperatura ambiente;
15. Descartar o líquido do tubo (etanol) e deixar o DNA secar por 15 minutos a 37°C;
16. De acordo com o tamanho do pellet adicionar ao tubo 100µl ou 50µl de “DNA Rhydration Solution” (para hidratar o DNA) e colocar na estufa a 65°C por 1 hora;
17. Preparar um gel de agarose a 1% para quantificar e verificar a integridade do DNA.

Após as extrações a quantidade de DNA foi avaliada por comparação com um marcador de peso molecular (Low DNA Mass - Invitrogen), com o programa Zoom Browser EX 5.6 Canon.

O gel de agarose foi corado com brometo de etídio.

3.2.4. Reação de amplificação

Para amplificar os fragmentos dos genes mitocondriais e nucleares das espécies do presente trabalho, utilizou-se a tecnologia da *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e *primers* universais (Tabela 2).

Tabela 2: Seqüências dos *primers* utilizados na amplificação dos diferentes genes.

Fragmento do Gene	Seqüência do <i>Primer</i> *	Referência
16S—ar	ACG CCT GTT TAT CAA AAA CAT	Palumbi (1996)
16S—br	CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T	Palumbi (1996)
COI—F	TGA ACC AAC CAG AAA GAC ATT GGC AC	Ward <i>et al.</i> (2005)
COI—R	TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA	Ward <i>et al.</i> (2005)
cyt <i>b</i> —GLU2	AAC CAC CGT TGT TAT TCA ACT A	Hardman e Page (2003)
cyt <i>b</i> —H16460	CGA yCT TCG GAT TAC AAG ACC G	Hardman e Page (2003)
<i>rag1</i> —1F	AGC TGT AGT CAG TAY CAC AAr ATG	Quenoiuille e Bermingham (2004)
<i>rag1</i> —9R	GTG TAG AGC CAG TGr TGY TT	Quenoiuille e Bermingham (2004)
<i>rag1</i> —3F	GGG TGA TGT CAG yGA GAA GCA	Quenoiuille e Bermingham (2004)
<i>rag1</i> —8R	CGC CAC ACA Ggy TTC ATC T	Quenoiuille e Bermingham (2004)
<i>rag2</i> —MHR1	TCA TCC TCC TCA Tck TCC TCw TTG TA	Hardman (2004)
<i>rag2</i> —MHF1	TGy TAT CTC CCA CCT CTG CGy TAC C	Hardman (2004)

* Sentido 5' → 3'

As amplificações foram realizadas em um termociclador MJ Research, INC, modelo PTC-200™ Programmable Thermal Controller, utilizando as seguintes reações:

Reagentes	Amplitaq ou Amplitaq Gold	pht
Água Milli-Q	13,0µl	16,95µl
Tampão 10X	2,5µl	2,5µl
dNTP (8mM)	2,5µl	1,5µl
MgCl ₂ (50mM)	2,25µl	0,75µl
<i>Primer Forward</i> (10µM)	1,25µl	0,6µl
<i>Primer Reverse</i> (10µM)	1,25µl	0,6µl
Taq (5U/µl)	0,25µl	0,1µl
DNA molde	2,0µl*	2,0µl*
Volume final	25,0µl	25,0µl

* Quantidade variável devido a concentração do DNA

Cada ciclo da técnica da PCR consiste, basicamente, da desnaturação, anelamento e extensão. Esses ciclos e condições variaram dependendo do *primer* e gene utilizados.

As condições de amplificação para os genes mitocondriais 16S e COI consistiram de: um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 180 segundos (s), seguido de 9 ciclos a 94 °C por 45 s, 55 °C por 45 s para anelamento dos *primers*, 72 °C por 60 s estendendo a cadeia, seguido de 29 ciclos com a temperatura de anelamento fixada em 53 °C e o período de extensão final a 72 °C por 300 s. Utilizamos as seguintes condições para o gene mitocondrial cyt *b*: 94 °C por 120 s,

seguido de 10 ciclos a 94 °C por 30 s, 53 °C por 45 s, 72 °C por 90 s, seguido de 24 ciclos a 58 °C e o período de extensão final a 72 °C por 300 s.

Para o gene nuclear *rag1* as condições de amplificação foram: 94 °C por 180 s, 9 ciclos a 94 °C por 45 s, 58 °C por 45 s, 72 °C por 105 s, com a redução de 0.5 °C na temperatura de anelamento por ciclo (de 58 °C para 53.5 °C), seguido de 29 ciclos sendo a temperatura de anelamento 56 °C e o período de extensão final a 72 °C por 300 s. Utilizamos as seguintes condições para o gene nuclear *rag2*: 94 °C por 60 s, 34 ciclos a 94 °C por 30 s, 57 °C por 30 s, 72 °C por 120 s e a extensão final a 72 °C por 600 s.

A Figura 7 mostra um esquema da molécula de mtDNA localizando as posições de alguns genes utilizados no presente estudo.

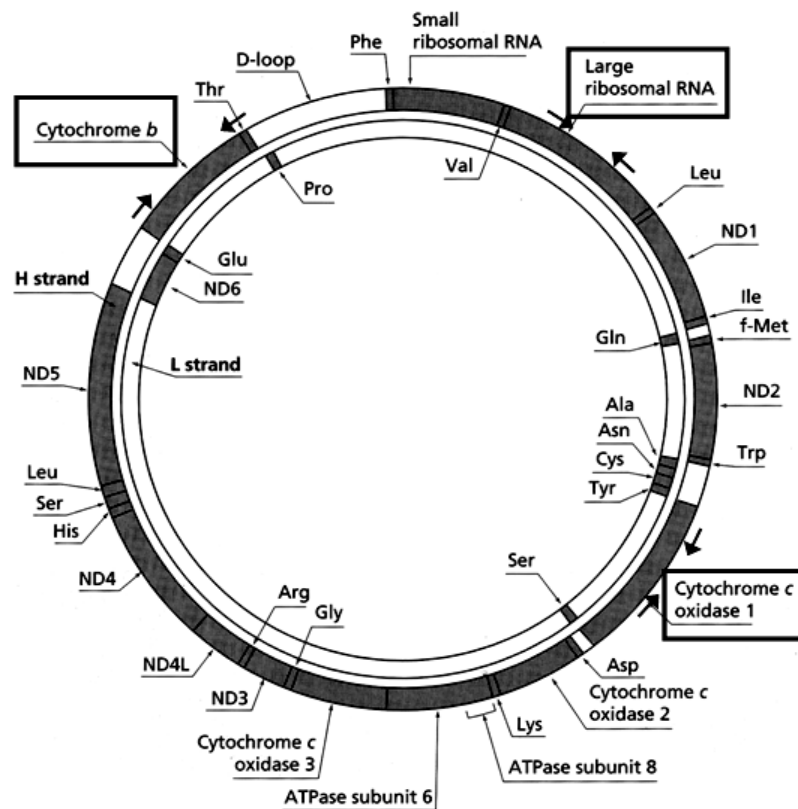


Figura 7. Esquema da molécula de mtDNA, mostrando a localização dos genes mitocondriais utilizados no presente estudo.

3.2.5 Visualização do DNA amplificado em gel de agarose

1. Preparar o gel de agarose a 1% (0,1g de agarose/1ml de tampão TAE 1x);
2. Colocar a agarose, ainda líquida, sobre a placa. Colocar o pente e esperar solidificar;
3. Retirar o pente e colocar a placa na cuba de eletroforese contendo TAE 1x, que deve cobrir completamente o gel de agarose;
4. Aplicar o *DNA Ladder 1 Kb Plus*, depois o produto da PCR, sendo 2 μ l da amostra + 3 μ l do corante *Blue Juice 10x*);
5. Corar com brometo de etídio (100mg/ml) por 3 minutos e descorar 10 minutos;
6. Fotografar em em câmera digital e analisar as bandas obtidas utilizando o programa Zoom Browser EX 5.6 Canon, tendo como base o marcador utilizado.

Com base nesses dados determinamos a quantidade de DNA de cada amostra para a realização da reação de seqüenciamento.

3.2.6. Purificação do produto da PCR com a enzima ExoSAP-IT

1. Transferir 5 μ l do produto da PCR para um tubo (tamanho variável, de acordo com o termociclador que será usado);
2. Adicionar ao produto da PCR 2 μ l de ExoSAP-IT;
3. Colocar o tubo em um termociclador e utilizar o seguinte programa: 37 °C por 30 minutos e 80 °C por 15 minutos;
4. Preparar um gel de agarose 1% para visualizar a qualidade da limpeza e quantificar o DNA.

3.2.7. Purificação do produto da PCR com PEG

Protocolo do PEG (PolyEthylene Glycol) desenvolvido por Travis Glenn, está disponível no endereço [http://www.uga.edu/srel/DNA_Lab/PEG_Precip"00.rtf](http://www.uga.edu/srel/DNA_Lab/PEG_Precip)

1. Em 25 μ l do produto da PCR, adicionar 25 μ l do PEG;
2. Misturar bem os produtos (pipetando várias vezes);
3. Incubar a 37 °C por 30 minutos;
4. Centrifugar a 14000rpm por 15 minutos a temperatura ambiente;
5. Remover o sobrenadante por aspiração;
6. Adicionar 63 μ l de etanol 80% gelado;
7. Esperar por 2 minutos;

8. Centrifugar a 14000rpm por 1 minuto a temperatura ambiente;
9. Remover o sobrenadante por aspiração;
10. Repetir os passos 6 ao 9;
11. Secar o produto da PCR em estufa a 37 °C por cerca de 10 minutos;
12. Eluir em 12,5µl de TE 1x.
13. Preparar um gel de agarose 1% para visualizar a qualidade da limpeza e quantificar o DNA.

3.2.8. Reação de amplificação para o seqüenciamento de DNA

Os *primers* utilizados na reação da PCR de seqüenciamento foram os mesmos das reações de amplificação (Tabela 2), na mesma concentração de 10µM. Para cada espécie foram feitas reações utilizando cada um dos *primers* forward (F) e reverse (R) dos diferentes genes.

Para cada amostra a ser seqüenciada preparamos a seguinte reação:

Pré-Mix (kit)	2µl
<i>Primer</i> F ou R	2µl
DNA	Até 5µl
Água Milli-Q	xµl
Volume total	9µl

As condições da PCR de seqüenciamento foram: um ciclo inicial de denaturação a 95 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 95 °C por 45 segundos, 50 °C por 30 segundos para anelamento dos *primers* e 60 °C por 2 minutos, estendendo a cadeia.

3.3. Purificação do DNA amplificado na reação de seqüenciamento e análise das amostras em seqüenciador ABI prism 377

Após o final da amplificação procedeu-se, como descrito abaixo, a reação de retirada dos dideoxinucleotídeos não incorporados no DNA.

1. Adicionar 1µl de acetato de sódio 1,5M/EDTA 250MM e 80µl de etanol 95% gelado em cada tubo contendo o produto de seqüenciamento;

2. Misturar no vórtex rapidamente e centrifugar a 4 °C por 30 minutos a 14.000rpm;
3. Remover o sobrenadante por aspiração;
4. Adicionar 400µl de etanol 70% gelado;
5. Centrifugar a 14000rpm por 10 minutos;
6. Descartar o sobrenadante por aspiração manter o material protegido da luz e secá-lo por cerca de 1 hora na estufa a 37 °C. O *pellet* seco pode ficar guardado por até 2 meses a 4 °C protegido da luz.

As amostras amplificadas e purificadas foram analisadas em um seqüenciador automático ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Perking-Elmer) de acordo com os procedimentos a seguir:

1. Lavar as placas com detergente Extran 1%, enxaguar bem (aproximadamente 10 minutos) com água da torneira quente e, em seguida, enxaguar com 2 litros de água Milli-Q a 85 °C. Colocar em suporte adequado para secagem;
2. Colocar o cassete de montagem da placa sobre a bancada e sobre este a placa anterior. Sobre as bordas da placa anterior, colocar os espaçadores e, em seguida, colocar a placa posterior. As anotações contidas nas placas devem ficar voltadas para fora;
3. Alinhar as placas e deslizá-las até o encaixe de recorte da placa anterior com os pinos localizados nas extremidades do cassete;
4. Fechar as presilhas e colocar o adaptador onde será encaixada a seringa contendo o gel de poliacrilamida;
5. Preparar o gel de poliacrilamida (5% Long Ranger, 6M Uréia, TBE 1X) como segue:

Uréia	18µl
Água Milli-Q	25ml
Long Ranger 50%	5ml
TBE 10X	5ml
Persulfato de amonio	250µl
TEMED	35µl

6. Misturar os quatro primeiros reagentes, filtrar em membrana com poros de $\leq 0,45\mu\text{m}$ e adicionar o persulfato e o TEMED;

7. Misturar suavemente a solução e transferi-la para uma seringa de 50ml que deve ser imediatamente encaixada ao adaptador de aplicação do gel para preenchimento das placas previamente preparadas;
8. Aplicar o gel entre as placas e colocar o pente invertido na extremidade superior das mesmas (lado oposto da aplicação do gel);
9. Esperar no mínimo 1 hora e 30 minutos para a total polimerização do gel;
10. Remover o pente e lavar as placas sem retirá-las do cassete. As placas deverão estar completamente limpas, sem restos de poliacrilamida ou fragmentos de papéis utilizados para a limpeza e secagem;
11. Preparar 1,5 litros de TBE 1X para encher as cubas anódica e catódica;
12. Colocar a cuba de cor bege na parte de baixo do seqüenciador, encaixar o cassete contendo as placas no seqüenciador e fechar as presilhas;
13. Fechar a porta do seqüenciador e fazer um *Plate check* das placas para verificar se elas estão limpas;
14. Encher as cubas com o tampão TBE 1X. Não ultrapassar os limites marcados como máximo;
15. Iniciar a pré-corrída para a estabilização do meio e para atingir a temperatura de 51 °C;
16. Durante a pré-corrída ressuspender as amostras em 4,0µl de tampão de carregamento (Formamida:Blue Dextran – 5:2). Passar os tubos pelo vórtex e denaturar as amostras por 5 minutos a 95 °C. Colocá-las imediatamente no gelo após a denaturação;
17. Após 10 minutos de corrída, aplicar 40µl de tampão de carregamento no gel. Fechar a porta e esperar 2 minutos. Abrir a porta e retirar o excesso de corante com a seringa cheia de tampão de corrída;
18. Colocar o pente de modo que toque todo o gel ao mesmo tempo, deslizando-o de forma que não se incline. IntroduzÍ-lo apenas 2mm no gel. Depois de introduzido, o pente não pode ser removido, pois ocasionará vazamento das amostras;
19. Aplicar 0,8µl da amostra nos pocinhos ímpares;
20. Fechar a porta do seqüenciador, esperar 3 minutos e aplicar o restante das amostras nos pocinhos pares, evitando assim que as amostras se misturem;
21. Cancelar a pré-corrída;
22. Verificar o número de linhas, o tamanho da placa, a matriz adequada, o número de horas de corrída e importar a lista de amostras;

23. Iniciar a corrida;

24. Após o término da corrida (7 horas), posicionar as linhas sobre as amostras que aparecem na imagem do gel.

3.4. Alinhamento das seqüências e análise filogenética

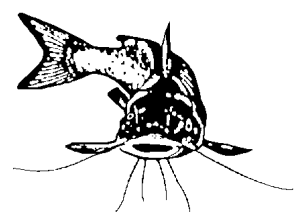
As seqüências foram alinhadas usando o usando o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) implementado no programa DAMBE versão 4.0.65 (Xia & Xie, 2001) BIOEDIT (Hall, 1999).

A variação e o padrão de substituição de nucleotídeos e a distância genética foram examinadas utilizando-se o programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2001). A saturação de nucleotídeos foi analisada plotando-se o número absoluto de transições (Ti) e transversões (Tv) contra os valores de distância genética como uso do programa DAMBE versão 4.0.65 (Xia e Xie, 2001). O programa Modeltest (Posada e Crandall, 1998) foi utilizado para selecionar o modelo de substituição nucleotídica que melhor se ajustava aos dados obtidos.

As análises filogenéticas baseadas pelo método de máxima parcimônia (MP) foram realizadas com o programa MEGA versão 3.0 (Kumar *et al.*, 2004). As filogenias obtidas foram testadas utilizando o método de *bootstrap*, com 1000 réplicas (Felsenstein, 1985) e o índice de decaimento de Bremer (Bremer, 1998). As análises probabilísticas (bayesianas) foram realizadas com o programa MrBayes 3.1 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001). As árvores de máxima parcimônia foram geradas usando as proporções Ti/Tv de 1:1 e 1:2 e considerando os *gaps* como dados perdidos.

As árvores de consenso foram produzidas com programa TreeExplorer implementado no programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2001). As análises filogenéticas dos dados moleculares seguiram as recomendações de Swofford *et al.*, (1996), Nei e Kumar (2000) e Felsenstein (2004).

RESULTADOS



4. RESULTADOS

Foram seqüenciados segmentos dos genes mitocondriais de uma subunidade do RNA ribossômico (16S), o gene codificador da citocromo oxidase I (COI), o gene citocromo *b* (*cyt b*) e os genes nucleares codificadores de proteínas recombination activating protein (*rag1* e *rag2*), totalizando cinco genes (Tabela 3). As seqüências dos animais *Scoloplax distolothrix* e *Diplomystes mesembrinus* (*rag2*), foram obtidas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), como mostra a Tabela 4. O alinhamento final de todas as amostras seqüenciadas resultou em uma matriz com 4784 caracteres (Anexo).

Tabela 3: Amostras seqüenciadas no presente estudo (assinaladas com “X”). 16S= gene rRNA ribossômico 16S; COI= citocromo oxidase I; *cyt b*= citocromo *b*; *rag1*= *recombination activating protein 1*; *rag2*= *recombination activating protein 2*.

Espécie	Lote	Registro	Genes				
			16S	COI	<i>cyt b</i>	<i>rag1</i>	<i>rag2</i>
Grupo Interno							
<i>Astroblepus longifilis</i>	STRI 01692	3800	x	x	x	x	x
<i>Astroblepus longifilis</i>	STRI 01692	3803	x	x	x	x	x
<i>Astroblepus trifasciatum</i>	STRI 06685	15201	x	x	x	x	x
<i>Astroblepus trifasciatum</i>	STRI 06686	16248	x	x	x	x	x
<i>Astroblepus trifasciatum</i>	STRI 01695	11582	x	x	x	x	x
<i>Astroblepus trifasciatum</i>	STRI 01690	2673	x	x	x	x	x
<i>Astroblepus sp.</i>	LBP 1352	11453	x	x	x	x	
<i>Hoplosternum punctatum</i>	STRI 01797	3566	x	x	x	x	x
<i>Dianema urostriata</i>	LBP 527	7113	x	x	x	x	
<i>Ancistrus spinosus</i>	STRI 01713	3655	x	x	x	x	x
<i>Ancistrus spinosus</i>	STRI 07103	87	x	x	x	x	x
<i>Ancistrus spinosus</i>	STRI 02003	240	x	x	x	x	x
<i>Ancistrus spinosus</i>	STRI 01716	6772	x	x	x	x	x
<i>Ancistrus chagresi</i>	STRI 01711	12311	x	x	x	x	x
<i>Ancistrus chagresi</i>	STRI 07103	12885	x	x	x	x	x
<i>Chaetostoma fischeri</i>	STRI 07104	16203	x	x	x	x	x
<i>Chaetostoma fischeri</i>	STRI 01752	6706	x	x	x	x	x
<i>Chaetostoma fischeri</i>	STRI 01772	12274	x	x	x	x	x
<i>Chaetostoma fischeri</i>	STRI 01771	11581	x	x	x	x	x
<i>Hemiancistrus aspidolepis</i>	STRI 02012	3436	x	x	x	x	x
<i>Hemiancistrus aspidolepis</i>	STRI 02013	3485	x	x	x	x	x
<i>Hemiancistrus aspidolepis</i>	STRI 02006	70	x	x	x	x	x
<i>Lasiancistrus planiceps</i>	STRI 01805	3526	x	x	x	x	x
<i>Lasiancistrus planiceps</i>	STRI 01814	6961	x	x	x	x	x
<i>Lasiancistrus planiceps</i>	STRI 01803	1646	x	x	x	x	x
<i>Leptoancistrus canensis</i>	STRI 01833	11580	x	x	x	x	x
<i>Crossoloricaria variegata</i>	STRI 01780	6781	x	x	x	x	x
<i>Dasylicaria capetensis</i>	STRI 01783	6711	x	x	x	x	x
<i>Dasylicaria capetensis</i>	STRI 01783	6712	x	x	x	x	x
<i>Dasylicaria tuyrensis</i>	STRI 01616	4140	x	x	x	x	x
<i>Rineloricaria altipinnis</i>	STRI 01847	3630	x	x	x	x	x
<i>Rineloricaria altipinnis</i>	STRI 01846	3589	x	x	x	x	x
<i>Rineloricaria altipinnis</i>	STRI 01851	6757	x	x	x	x	x
<i>Rineloricaria uracantha</i>	STRI 02326	13382	x	x	x	x	x
<i>Rineloricaria uracantha</i>	STRI 01844	1317	x	x	x	x	x
<i>Rineloricaria uracantha</i>	STRI 01844	1662	x	x	x	x	x
<i>Sturisoma panamense</i>	STRI 01874	11132	x	x	x	x	x
<i>Sturisoma panamense</i>	STRI 01871	6958	x	x	x	x	x
<i>Sturisoma panamense</i>	STRI 01864	1033	x	x	x	x	x
<i>Sturisomatchthys citurensis</i>	STRI 01878	909	x	x	x	x	x
<i>Sturisomatchthys citurensis</i>	STRI 01882	6959	x	x	x	x	x
<i>Trichomycterus striatus</i>	STRI 05452	15314	x	x	x	x	x
<i>Trichomycterus striatus</i>	STRI 07105	16298	x	x	x	x	x
<i>Trichomycterus striatus</i>	STRI 01937	4135	x	x	x	x	x
<i>Trichogenes longipinnis</i>	LBP 3862	22406	x	x	x	x	
<i>Scoloplax distolothrix</i>	LBP 1424	12514	x	x	x		
<i>Nematogenys inermis</i>	LBP 3105	19764	x	x	x		
Grupo externo							
<i>Diplomystes camposensis</i>	LBP 3106	19770	x	x	x	x	

Tabela 4: Seqüências do gene *rag2*= *recombination activating protein 2* obtidas do GenBank, e seu respectivo código de acesso

Espécie	Código de acesso
<i>Scoloplax distolothrix</i>	DQ 492323
<i>Diplomystes mesembrinus</i>	DQ 492316

4.1. Gene 16S rRNA

Foram obtidas seqüências do gene mitocondrial 16S rRNA de 47 exemplares das seis famílias que compõem a superfamília Loricarioidea e uma espécie da família Diplomystidae, utilizada como grupo externo. O tamanho das seqüências do gene 16S rRNA variou de 458 pb em *Nematogenys inermis* (animal 19764) a 585 pb em *Trichomycterus striatus* (animais 4135 e 15314) e *Astroblepus longifilis* (animal 3803) com um valor médio de 568 pb. Com o alinhamento e a correção manual dessas seqüências obteve-se uma matriz com 599 caracteres sendo 355 deles conservados, 242 variáveis e 170 filogeneticamente informativos para as análises de parcimônia. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 1,4. A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 32,2% de adenina (A), 23,7% de citosina (C), 21,4% de guanina (G) e 22,7% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de $d = 0,100 \pm 0,008$, segundo o modelo de Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Uma análise gráfica foi realizada através da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) indica que não há saturação nestes nucleotídeos (Figura 8).

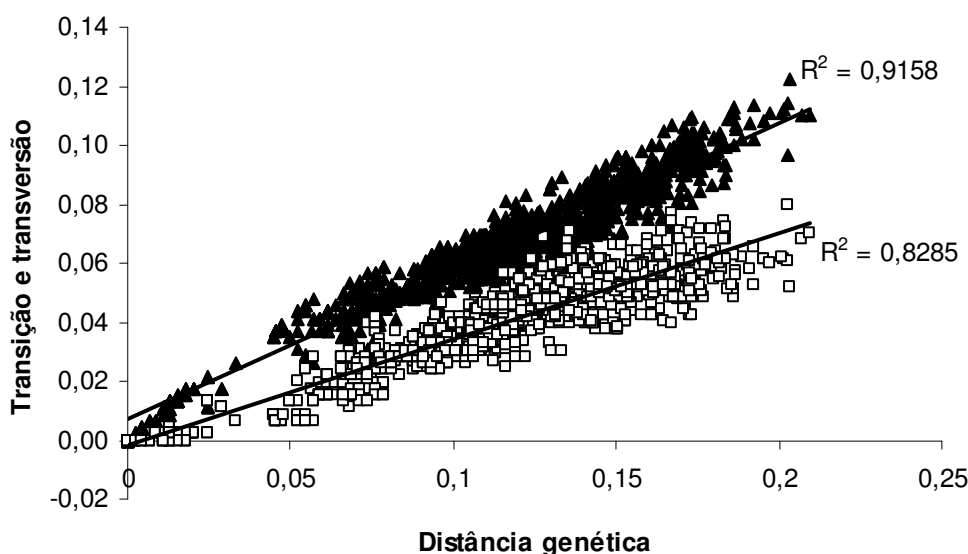


Figura 8. Gráfico mostrando a frequência de transições (triângulos) e transversões (quadrados) em relação à distância genética (modelo Kimura-2-parâmetros), para o gene 16S rRNA.

4.1.1. Análise filogenética realizada pelo método de máxima parcimônia (MP), gene 16S rRNA

As análises heurísticas, utilizando o método de máxima parcimônia, foram realizadas considerando as seqüências dos 48 animais utilizados no presente estudo. Os dados obtidos resultaram em uma matriz com 599 pb. Os *gaps* internos foram considerados como dados pertencentes às seqüências. A árvore consenso obtida está representada na Figura 9. *Diplomystes camposensis* foi considerado grupo externo nesta análise. Foram considerados os valores de *bootstrap* iguais ou acima de 50%.

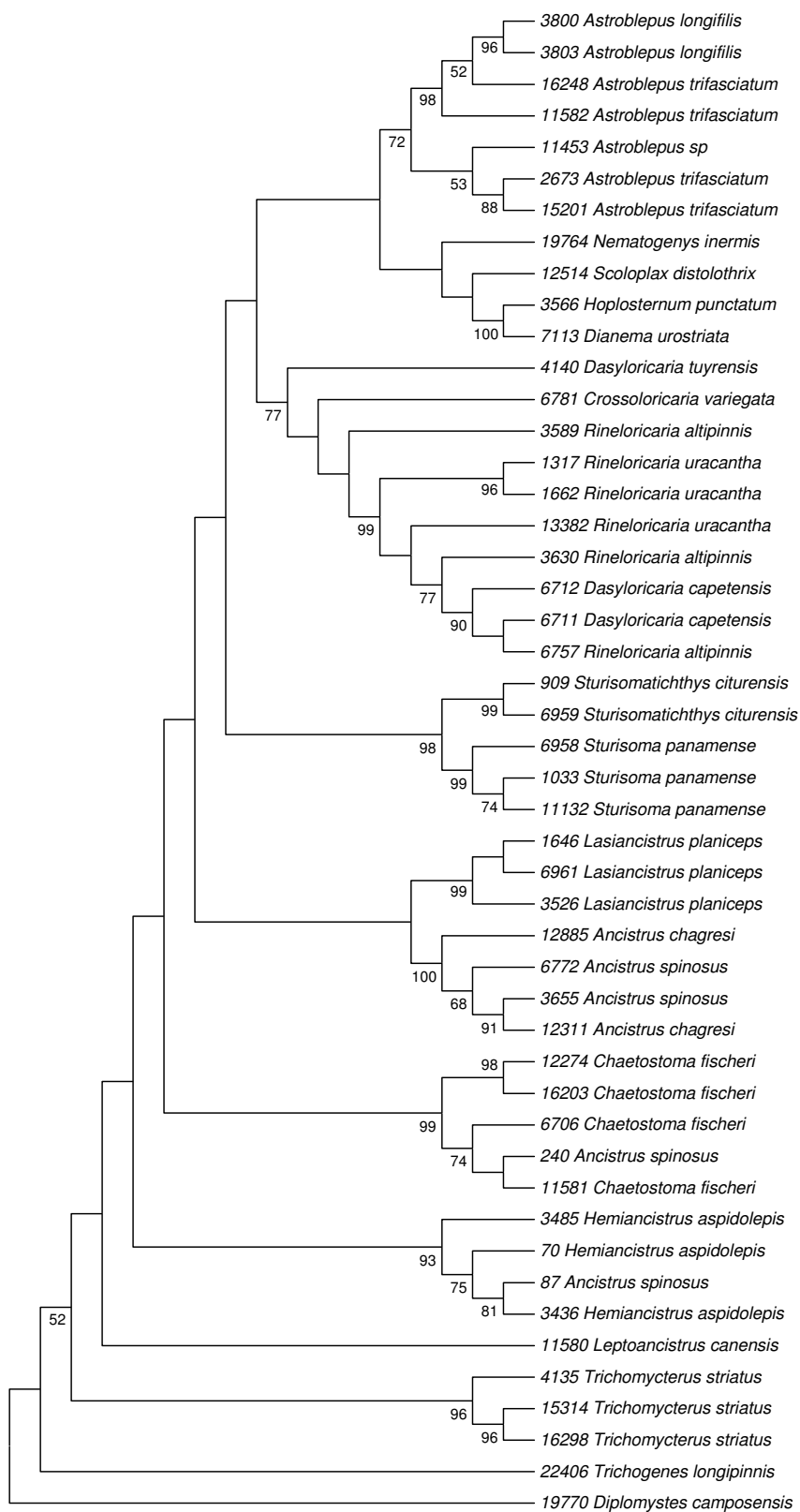


Figura 9. Árvore consenso de MP para o gene 16S produzida quando todos os sítios (599 pb) foram usados, proporção Tv/Ti 1:1 e considerando os *gaps* internos como dados pertencentes à seqüência (TL= 668, CI= 0.5210 e RI= 0.7693). Os números abaixo dos ramos são valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas. *Diplomystes* foi considerado grupo externo nesta análise.

4.2. Gene citocromo oxidase I

Foram obtidas seqüências do gene mitocondrial citocromo oxidase I de 47 exemplares das seis famílias que compõem a superfamília Loricarioidea e uma espécie da família Diplomystidae, utilizada como grupo externo. O tamanho das seqüências do gene citocromo oxidase I variou de 616 pb em *Nematogenys inermis* (animal 19764) a 687 pb em *Hemiancistrus aspidolepis* (animais 70, 3436 e 3485), *Ancistrus spinosus* (animais 87, 240, 3655 e 6772), *Ancistrus chagresi* (animais 12311 e 12885), *Sturisoma panamense* (animal 1033), *Rineloricaria uracantha* (animais 1317, 1662 e 13382), *Rineloricaria altipinnis* (animais 3589, 3630 e 6757), *Lasiancistrus planiceps* (animais 1646, 3526 e 6961), *Astroblepus trifasciatum* (animais 2673, 11582, 15201 e 16248), *Trichomycterus striatus* (animais 4135, 15314 e 16298), *Dasyloricaria tuyrensis* (animal 4140), *Dasyloricaria capetensis* (animal 6711), *Chaetostoma fischeri* (animais 6706, 11581, 12274 e 16203), *Crossoloricaria variegata* (animal 6781), *Sturisomatichthys citurensis* (animal 6959), *Leptoancistrus canensis* (animal 11580), *Nematogenys inermis* (animal 19764), *Diplomystes camposensis* (animal 19770) e *Trichogenes longipinnis* (animal 22406), com um valor médio de 677 pb. Com o alinhamento e a correção manual dessas seqüências obteve-se uma matriz com 687 caracteres sendo 384 conservados, 303 variáveis e 262 filogeneticamente informativos para as análises de parcimônia. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 1,2. A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 25,4% de adenina (A), 25,8% de citosina (C), 17,8% de guanina (G) e 31,0% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de $d = 0,197 \pm 0,012$, segundo o modelo de Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Uma análise gráfica foi realizada através da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) indica que não há saturação nestes nucleotídeos (Figura 10).

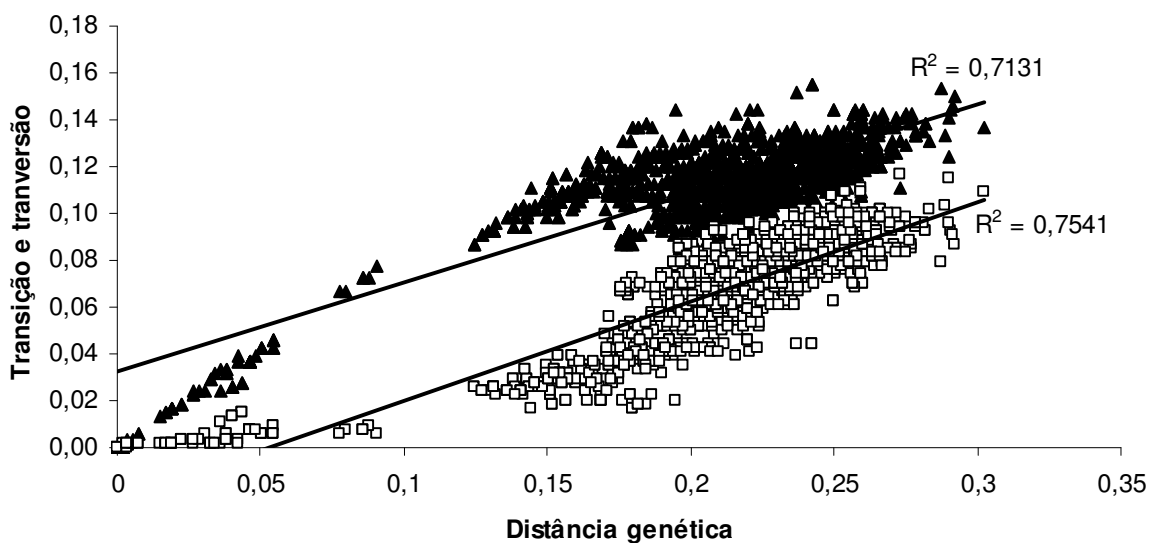


Figura 10. Gráfico mostrando a freqüência de transições (triângulos) e transversões (quadrados) em relação à distância genética (modelo Kimura-2-parâmetros), para o gene citocromo oxidase I.

4.2.1. Análise filogenética realizada pelo método de máxima parcimônia (MP), gene citocromo oxidase I

As análises heurísticas, utilizando o método de máxima parcimônia, foram realizadas considerando as seqüências dos 48 animais utilizados no presente estudo. Os dados obtidos resultaram em uma matriz com 687 pb. Não foram observados *gaps* internos. A árvore consenso obtida está representada na Figura 11. *Diplomystes camposensis* foi considerado grupo externo nesta análise. Foram considerados os valores de *bootstrap* iguais ou acima de 50%.

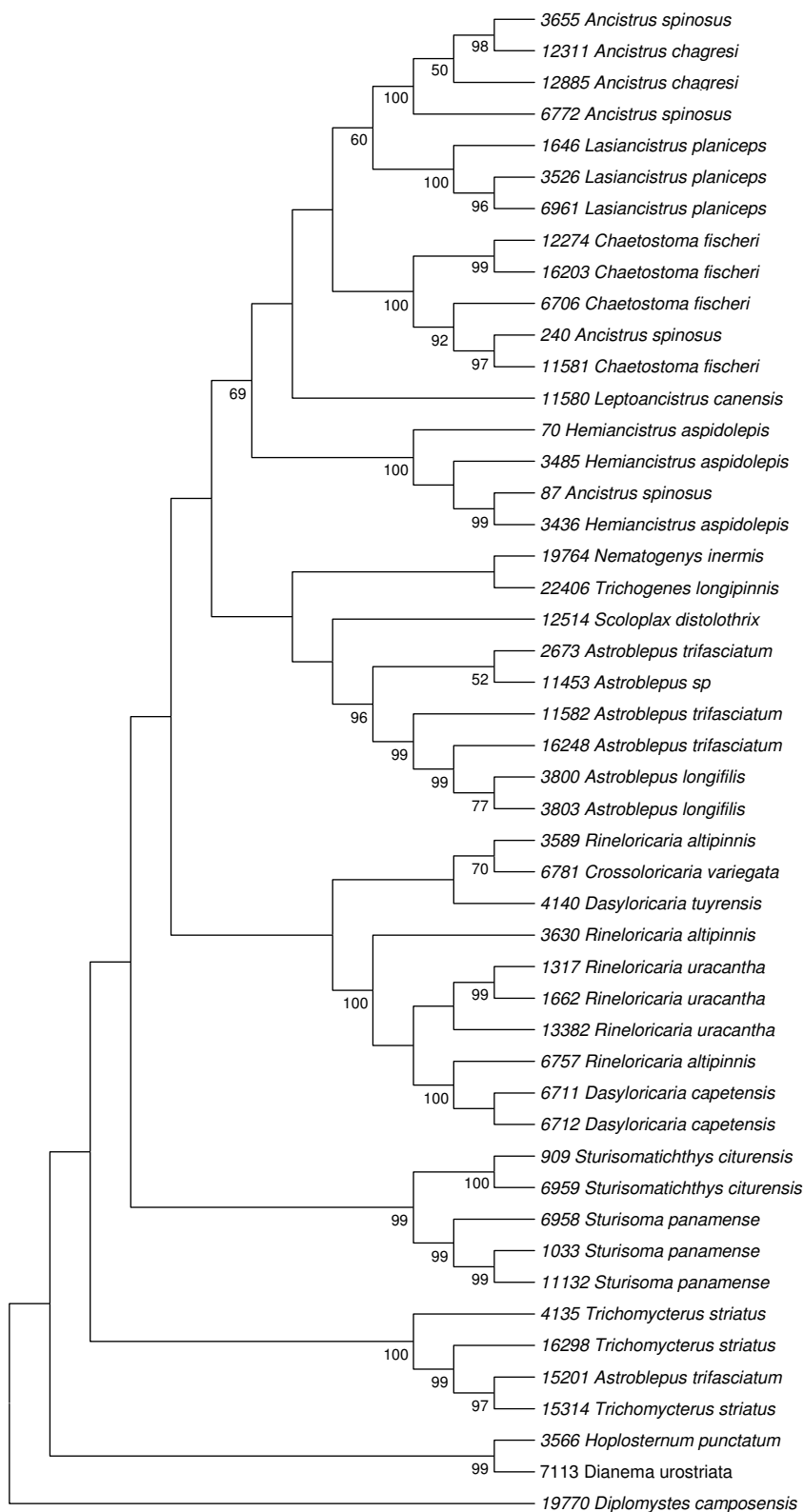


Figura 11. Árvore consenso de MP para o gene citocromo oxidase I produzida quando todos os sítios (687 pb) foram usados e proporção Tv/Ti 1:1 (TL= 1545, CI= 0.3281 e RI= 0.7023). Os números abaixo dos ramos são valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas. *Diplomyestes* foi considerado grupo externo nesta análise.

4.3. Gene citocromo *b*

Foram obtidas seqüências do gene mitocondrial citocromo *b* de 47 exemplares das seis famílias que compõem a superfamília Loricarioidea e uma espécie da família Diplomystidae, utilizada como grupo externo. O tamanho das seqüências do gene citocromo *b* variou de 801 pb em *Astroblepus* sp. (animal 11453) a 1114 pb em *Hemiancistrus aspidolepis* (animais 70, 3436 e 3485), *Ancistrus spinosus* (animais 87, 240, 3655 e 6772), *Ancistrus chagresi* (animais 12311 e 12885), *Sturisomatichtys citurensis* (animais 909 e 6959), *Sturisoma panamense* (animais 1033, 6958 e 11132), *Rineloricaria uracantha* (animais 1317, 1662 e 13382), *Rineloricaria altipinnis* (animais 3589, 3630 e 6757), *Lasiancistrus planiceps* (animais 1646, 3526 e 6961), *Astroblepus trifasciatum* (animais 2673, 11582, 15201 e 16248), *Astroblepus longifilis* (animais 3800 e 3803), *Trichomycterus striatus* (animais 4135, 15314 e 16298), *Dasyloricaria tuyrensis* (animal 4140), *Chaetostoma fischeri* (animais 6706, 11581, 12274 e 16203), *Dasyloricaria capetensis* (animais 6711 e 6712), *Crossoloricaria variegata* (animal 6781), *Leptoancistrus canensis* (animal 11580) e *Nematogenys inermis* (animal 19764), com um valor médio de 1104 pb. Com o alinhamento e a correção manual dessas seqüências obteve-se uma matriz com 1114 caracteres sendo 513 deles conservados, 601 variáveis e 510 filogeneticamente informativos para as análises de parcimônia. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 0,6. A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 28,8% de adenina (A), 28,1% de citosina (C), 13,8% de guanina (G) e 29,3% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de $d = 0,221 \pm 0,010$, segundo o modelo de Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Uma análise gráfica foi realizada através da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) indica que não há saturação nestes nucleotídeos (Figura 12).

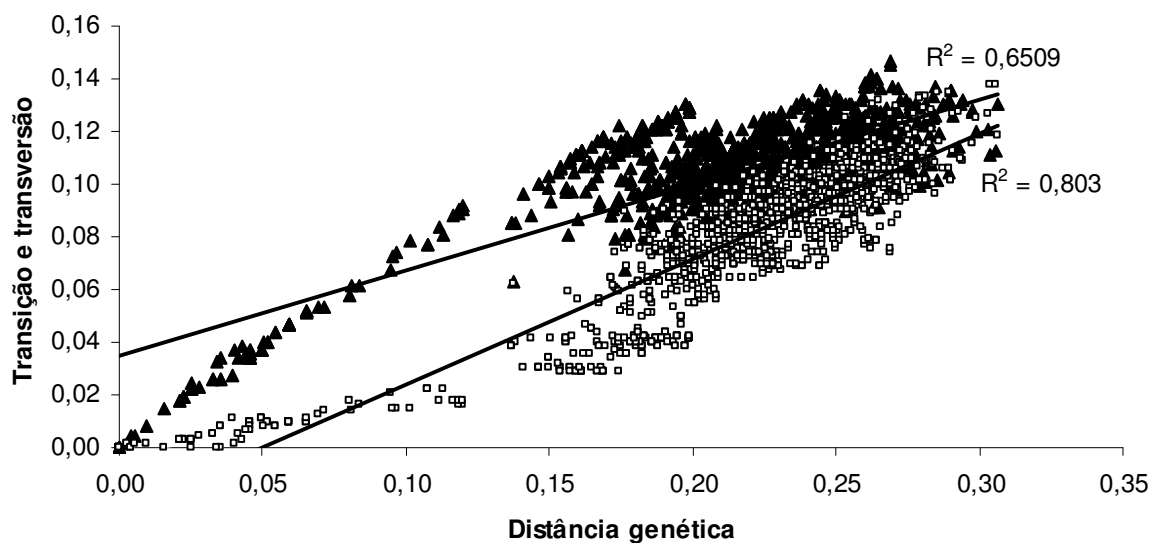


Figura 12. Gráfico mostrando a freqüência de transições (triângulos) e transversões (quadrados) em relação à distância genética (modelo Kimura-2-parâmetros), para o gene citocromo *b*.

4.3.1. Análise filogenética realizada pelo método de máxima parcimônia (MP), gene citocromo *b*

As análises heurísticas, utilizando o método de máxima parcimônia, foram realizadas considerando as seqüências dos 48 animais utilizados no presente estudo. Os dados obtidos resultaram em uma matriz com 1114 pb. Não foram observados *gaps* internos. A árvore consenso obtida está representada na Figura 13. *Diplomystes camposensis* foi considerado grupo externo nesta análise. Foram considerados os valores de *bootstrap* iguais ou acima de 50%.

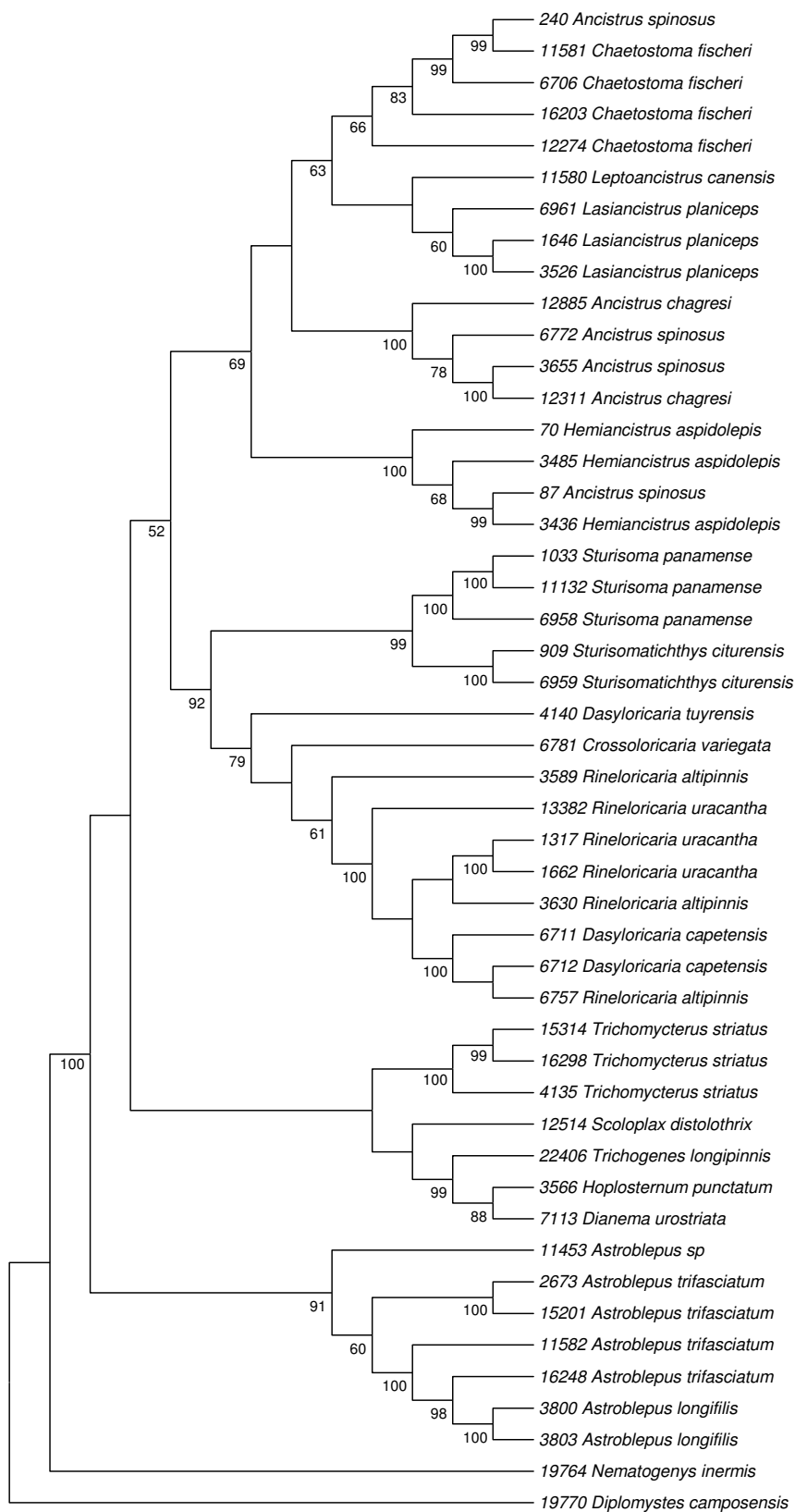


Figura 13. Árvore consenso de MP para o gene citocromo *b* produzida quando todos os sítios (1114 pb) foram usados e proporção Tv/Ti 1:1 (TL= 2940, CI= 0.3445 e RI= 0.6858). Os números abaixo dos ramos são valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas. *Diplomystes* foi considerado grupo externo nesta análise.

4.4. Gene *rag1*

Foram obtidas seqüências do gene nuclear *rag1* de 45 exemplares das seis famílias que compõem a superfamília Loricarioidea e uma espécie da família Diplomystidae, utilizada como grupo externo. O tamanho das seqüências do gene *rag1* variou de 1414 pb em *Ancistrus spinosus* (animal 87), *Sturisoma panamense* (animal 1033) e *Chaetostoma fischeri* (animal 11581) a 1459 pb em *Dianema urostriata* (animal 7113), com um valor médio de 1454 pb. Com o alinhamento e a correção manual dessas seqüências, obteve-se uma matriz com 1459 caracteres sendo 915 deles conservados, 542 variáveis e 451 filogeneticamente informativos para as análises de parcimônia. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 1,6. A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 27,2% de adenina (A), 21,4% de citosina (C), 26,3% de guanina (G) e 25,1% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de $d = 0,097 \pm 0,005$, segundo o modelo de Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Uma análise gráfica foi realizada através da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) indica que não há saturação nestes nucleotídeos (Figura 14).

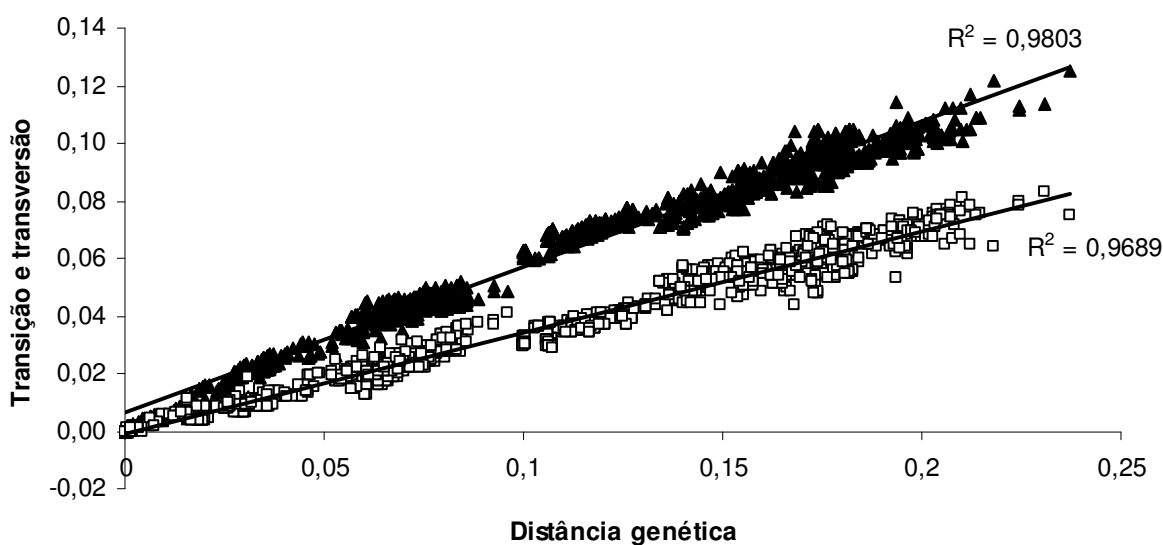


Figura 14. Gráfico mostrando a freqüência de transições (triângulos) e transversões (quadrados) em relação à distância genética (modelo Kimura-2-parâmetros), para o gene *rag1*.

4.4.1. Análise filogenética realizada pelo método de máxima parcimônia (MP), gene *rag1*

As análises heurísticas, utilizando o método de máxima parcimônia, foram realizadas considerando as seqüências dos 46 animais utilizados no presente estudo. Os dados obtidos resultaram em uma matriz com 1459 pb. Não foram observados *gaps* internos. A árvore consenso obtida está representada na Figura 15. *Diplomystes camposensis* foi considerado grupo externo nesta análise. Foram considerados os valores de *bootstrap* iguais ou acima de 50%.

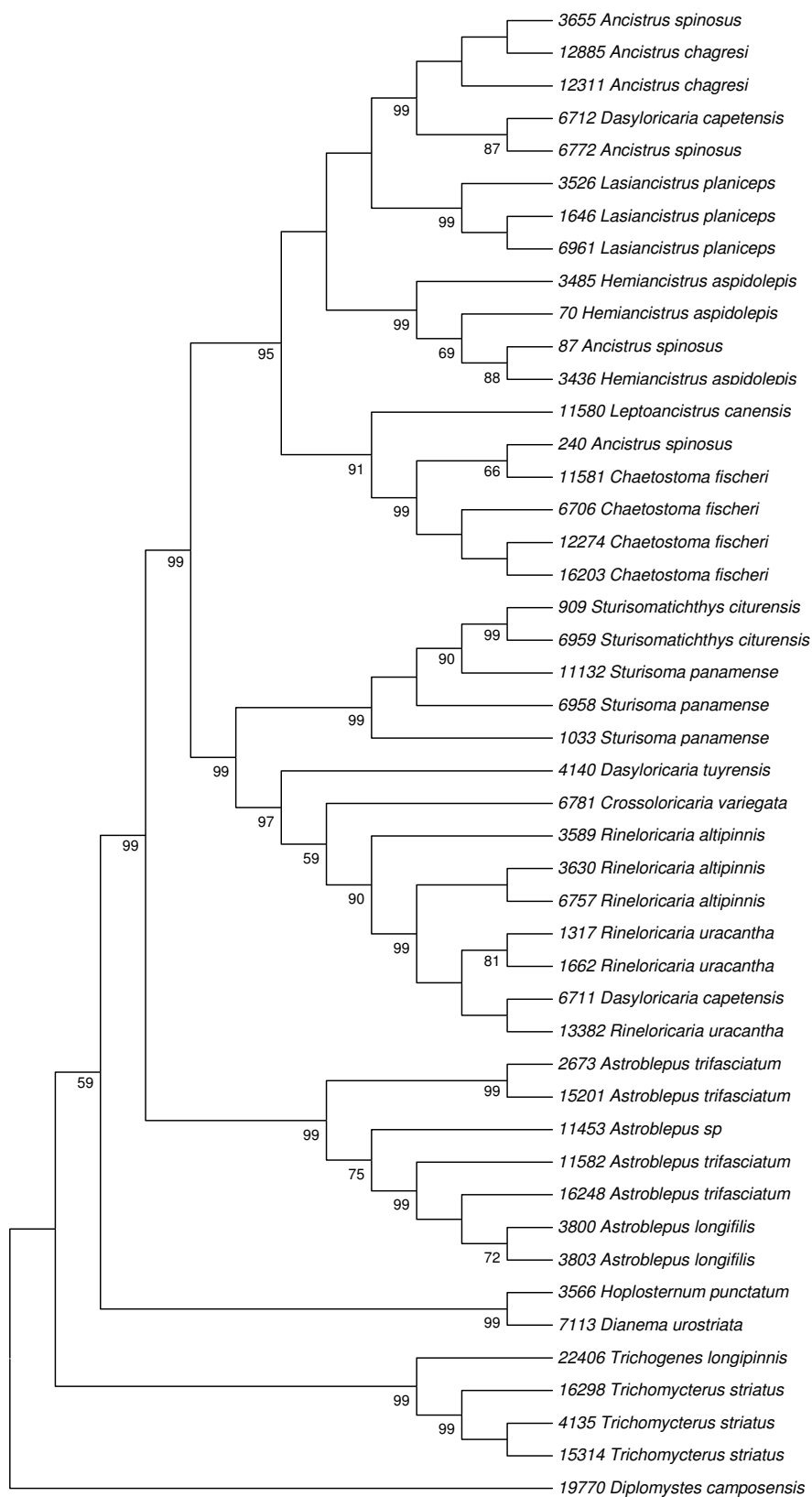


Figura 15. Árvore consenso de MP para o gene *rag1* produzida quando todos os sítios (1459 pb) foram usados e proporção Tv/Ti 1:1 (TL= 1079, CI= 0.6470 e RI= 0.8774). Os números abaixo dos ramos são valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas. *Diplomyestes* foi considerado grupo externo nesta análise.

4.5. Gene *rag2*

Foram obtidas seqüências do gene nuclear *rag2* de 42 exemplares das seis famílias que compõem a superfamília Loricarioidea e duas seqüências, animais *Scoloplax distolothrix* e *Diplomystes mesembrinus* foram obtidas do GenBank. O tamanho das seqüências do gene *rag2* foi de 925 pb em todos os animais, ver Tabelas 3 e 4. Com o alinhamento e a correção manual dessas seqüências, obteve-se uma matriz com 925 caracteres sendo 565 deles conservados, 360 variáveis e 266 filogeneticamente informativos para as análises de parcimônia. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 1,6. A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 25,6% de adenina (A), 24,7% de citosina (C), 24,5% de guanina (G) e 25,2% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de $d = 0,101 \pm 0,006$, segundo o modelo de Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Uma análise gráfica foi realizada através da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) indica que não há saturação nestes nucleotídeos (Figura 16).

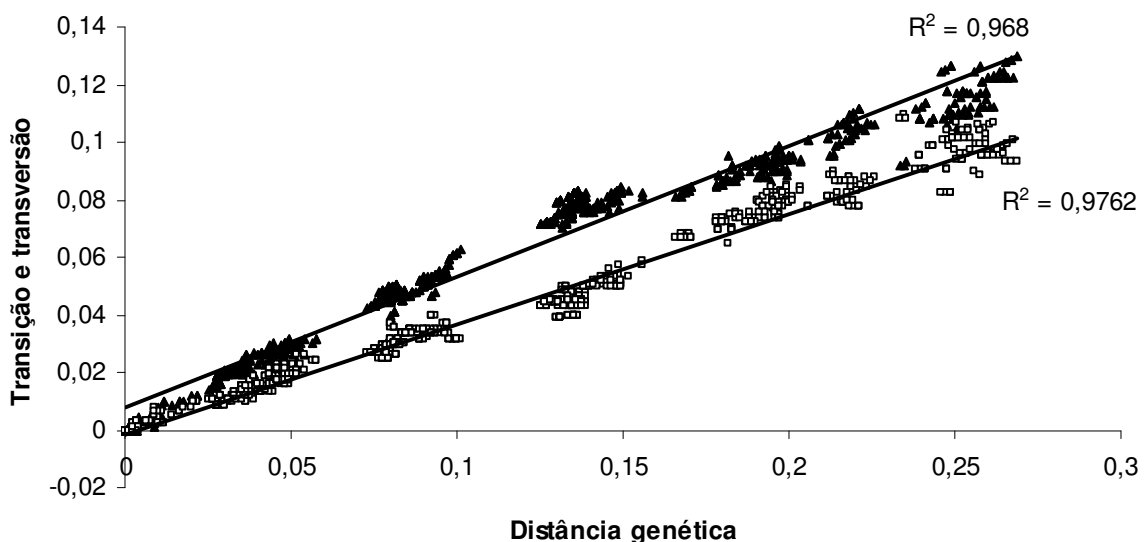


Figura 16. Gráfico mostrando a freqüência de transições (triângulos) e transversões (quadrados) em relação à distância genética (modelo Kimura-2-parâmetros), para o gene *rag2*.

4.5.1. Análise filogenética realizada pelo método de máxima parcimônia (MP), gene *rag2*

As análises heurísticas, utilizando o método de máxima parcimônia, foram realizadas considerando as seqüências dos 42 animais seqüenciados no presente estudo e duas seqüências obtidas do GenBank. Os dados obtidos resultaram em uma matriz com 925 pb. Não foram observados *gaps* internos. A árvore consenso obtida está representada na Figura 17. *Diplomystes mesembrinus* foi considerado grupo externo nesta análise. Foram considerados os valores de *bootstrap* iguais ou acima de 50%.

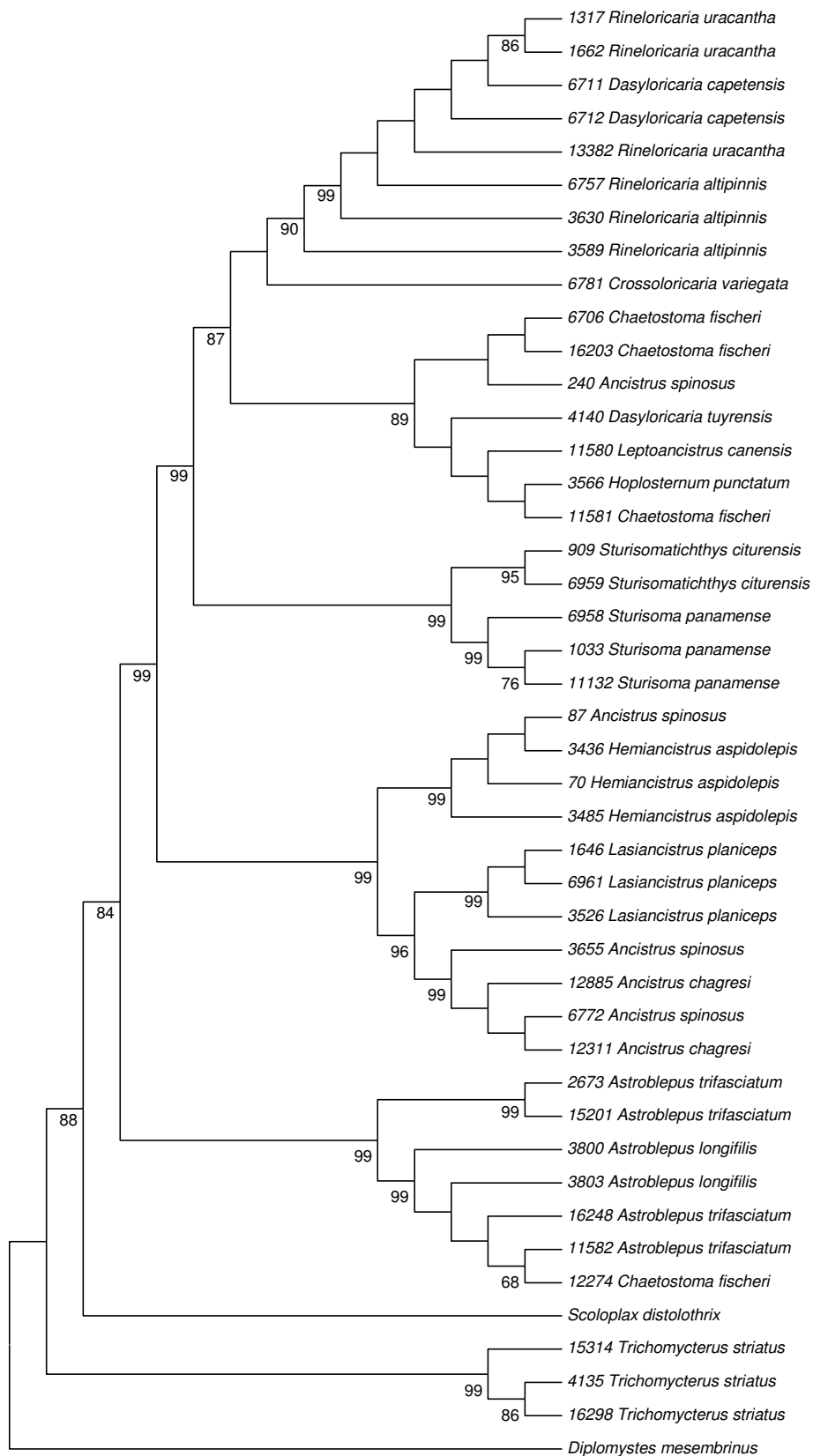


Figura 17. Árvore consenso de MP para o gene *rag2* produzida quando todos os sítios (925 pb) foram usados e proporção Tv/Ti 1:1 (TL= 610, CI= 0.7344 e RI= 0.9196). Os números abaixo dos ramos são valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas. *Diplomyestes* foi considerado grupo externo nesta análise.

4.6. Análise combinada dos genes 16S rRNA, citocromo oxidase I, citocromo *b*, *rag1* e *rag2*

Foram obtidas seqüências dos genes mitocondriais 16S rRNA, citocromo oxidase I e citocromo *b* e dos genes nucleares *rag1* e *rag2* de exemplares das seis famílias que compõem a superfamília Loricarioidea e de um representante da família Diplomystidae, *Diplomystes camposensis*, num total de 48 animais. O tamanho das seqüências combinadas de todos os genes seqüenciados neste estudo variou de 2188 pb em *Nematogenys inermis* (animal 19764) a 4768 pb em *Trichomycterus striatus* (animais 4135 e 15314), com um valor médio de 4552 pb. Com o alinhamento e a correção manual dessas seqüências, obteve-se uma matriz com 4784 pares de bases, sendo 2814 deles conservados, 1969 variáveis e 1654 filogeneticamente informativos para a análise de máxima parcimônia. Os *gaps* internos foram tratados como dados ausentes. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 1,0. A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 28,7% de adenina (A), 25,3% de citosina (C), 18,1% de guanina (G) e 27,9% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de $d = 0,146 \pm 0,003$, segundo o modelo de Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Uma análise gráfica foi realizada através da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) indica que não há saturação nestes nucleotídeos (Figura 18).

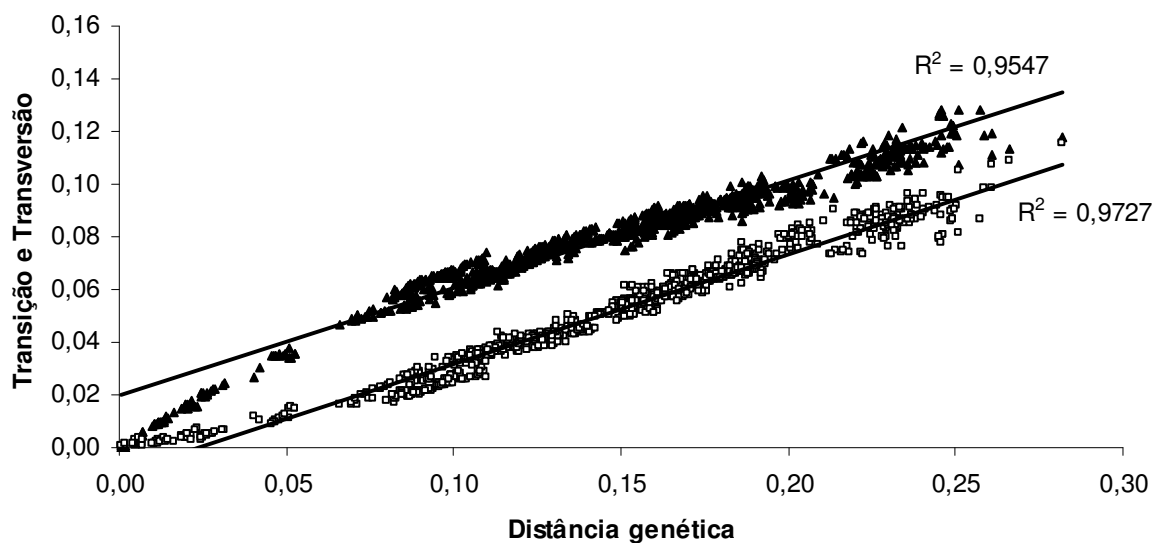


Figura 18. Gráfico mostrando a freqüência de transições (triângulos) e transversões (quadrados) em relação à distância genética (modelo Kimura-2-parâmetros), para o consenso entre as espécies com os genes mitocondriais 16S rRNA, citocromo oxidase I e citocromo *b* e os genes nucleares *rag1* e *rag2* analisados em conjunto.

4.6.1. Análise filogenética realizada pelo método de máxima parcimônia (MP)

As análises heurísticas, utilizando o método de máxima parcimônia, foram realizadas considerando os 48 animais seqüenciados durante o presente estudo. Os dados obtidos resultaram em uma matriz com 4784 pb. Os *gaps* foram considerados como dados ausentes. *Diplomystes camposensis* foi considerado grupo externo nesta análise. A árvore consenso obtida está representada na Figura 19. Foram considerados os valores de *bootstrap* iguais ou acima de 50%.

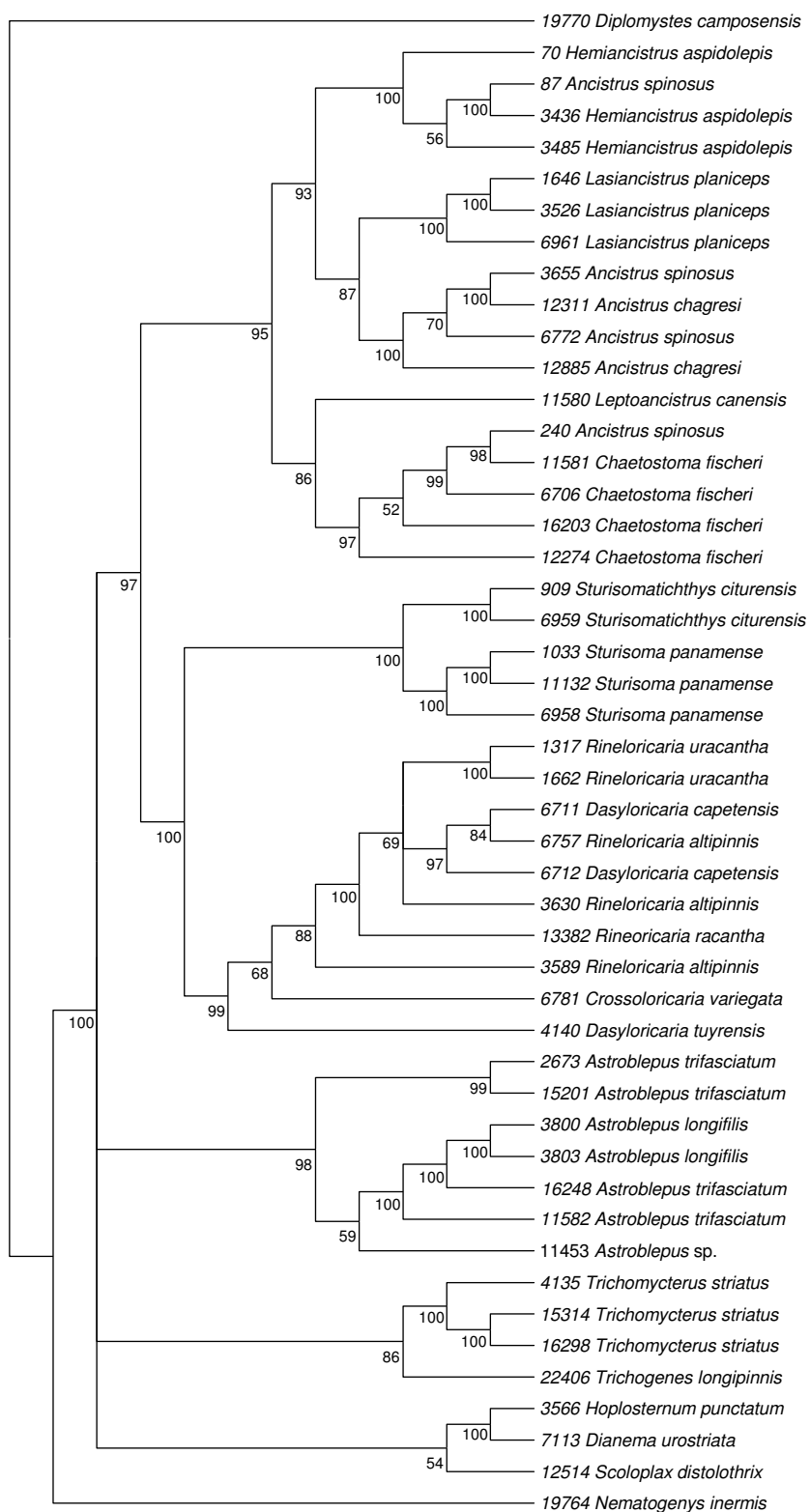
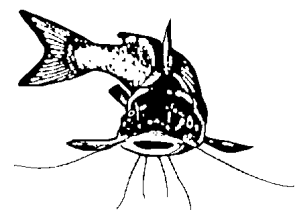


Figura 19. Árvore consenso de MP para os genes mitocondriais 16S rRNA, COI e *cyt b* e os genes nucleares *rag1* e *rag2* produzida quando todos os sítios (4784 pb) foram usados, proporção Tv/Ti 1:1 e considerando os *gaps* como dados pertencentes à seqüência (TL= 7200, CI= 0.4033 e RI= 0.7314). Os números abaixo dos ramos são os valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas.

DISCUSSÕES



5. DISCUSSÕES

A análise das seqüências do gene mitocondrial 16S dos peixes estudados evidenciou que sua composição de bases é rica em adenina (A), uma tendência comum dentro do grupo (Alves-Gomes *et al.*, 1995) e também em lagartos (Reeder, 1995) e serpentes (Parkinson, 1999). Da mesma forma, a composição de nucleotídeos do gene *cyt b* é típica dos genes mitocondriais codificadores de proteínas na maioria dos vertebrados (Lydeard e Toe, 1997). Nota-se também que a composição de bases dos genes mitocondriais segue uma tendência anti-G, o que não é observado nos genes nucleares (Zhang e Hewitt, 1996) estudados em outras espécies de peixes (Murph e Collier, 1999; Hrbek *et al.*, 2002).

As análises da distância média entre pares de seqüências mostram valores de $d= 0,100$ para o gene 16S rRNA, $d= 0,197$ para o gene COI, $d= 0,221$ para o gene *cyt b*, $d= 0,097$ para o gene *rag1*, $d= 0,101$ para o gene *rag2* e $d= 0,146$ para todos os genes em conjunto, indicando que os dados devem conter informação filogenética suficiente para o estudo das relações entre as famílias de Loricarioidea (Nei e Kumar, 2001). Além disso, os resultados das análises das transições e transversões em relação à distância genética indicam a ausência de saturação para todos os genes estudados.

5.1. Análises filogenéticas realizadas pelo método de máxima parcimônia (MP)

A análise da evolução de cada gene 16S, COI, *cyt b*, *rag1* e *rag2* foi realizada utilizando-se o método de máxima parcimônia. Os dados obtidos incluíram representantes das seis famílias de Loricarioidea e da família Diplomystidae. *Diplomystes camposensis* foi utilizado como grupo externo nas análises dos genes, 16S, COI, *cyt b* e *rag1*. Para o gene *rag2* foi utilizado *Diplomystes mesembrinus*. A família Diplomystidae foi utilizada como grupo externo nas análises considerando que a mesma é amplamente aceita como a mais primitiva da ordem Siluriformes (de Pinna, 1993; de Pinna, 1998; Britto, 2002, Hardman, 2005) ou, alternativamente, grupo-irmão de Loricarioidea (Sullivan *et al.*, 2006). A topologia das árvores obtidas por meio das análises dos genes mitocondriais e nucleares foram distintas, a relação observada entre as famílias foi diferente das atualmente aceitas para o grupo (de Pinna, 1998; Britto, 2002). As árvores obtidas com os genes mitocondriais

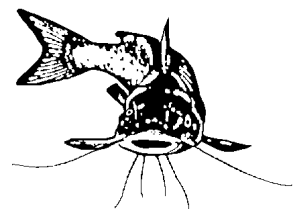
16S, COI e *cyt b* (Figuras 9, 11 e 13) apresentaram elevado suporte estatístico em seus nós internos. Já as árvores obtidas por meio de análises dos genes nucleares *rag1* e *rag2* (Figuras 15 e 17) apresentaram elevado suporte estatístico em seus nós mais externos, pois as condições nas organelas celulares são diferentes daquelas encontradas no núcleo, portanto as taxas de evolução dos genes em cada compartimento são independentes (Lewin, 1994). A árvore com maiores valores de *bootstrap* foi obtida por meio de análises do gene *rag2*.

5.2. Análises combinadas

Na tentativa de resolver as relações entre os Loricarioidea e seus grupos-irmãos foi realizada uma análise pelo método de máxima parcimônia com todos os genes combinados. *Diplomystes camposensis* representante da família Diplomystidae, foi considerado grupo externo. Os resultados obtidos na filogenia consenso (Figura 19) representam uma série de hipóteses sobre as relações entre as diversas famílias que constituem a superfamília Loricarioidea. Algumas dessas hipóteses já foram propostas em estudos prévios, sendo aqui confirmadas, como o monofilismo da superfamília Loricarioidea sustentado por altos valores de *bootstrap*, corroborando os trabalhos anteriores realizados com dados morfológicos (de Pinna, 1998; Britto, 2002) e dados moleculares (Miguel, 2004; Sullivan *et al.*, 2006). Nenhuma análise resultou em uma topologia idêntica a proposta com base em dados morfológicos por de Pinna (1998) e Britto (2002) para Loricarioidea. A família Nematogenyidae apareceu como grupo-irmão de todas as outras famílias que compõem a superfamília Loricarioidea, sendo também confirmada sua posição basal em relação às demais famílias de Loricarioidea. A família Scoloplacidae apareceu como grupo-irmão de Callichthyidae. O clado formado pelas famílias Scoloplacidae e Callichthyidae apareceram como grupo-irmão do clado formado pelas famílias Trichomycteridae, Astroblepidae e Loricariidae. Os dados moleculares do presente estudo não sustentaram a hipótese de um clado formado pelas famílias Trichomycteridae e Nematogenyidae como proposta por de Pinna (1998) e Britto (2002). As diferenças entre as topologias obtidas com dados moleculares e aquelas propostas com base em dados morfológicos podem estar associadas ao uso de espécies não representativas da evolução das famílias. Nesse sentido, a ampliação do conjunto de dados moleculares com a análise de mais espécies (principalmente

espécies mais primitivas dentro das famílias) e com outras seqüências de DNA serão fundamentais para se testar melhor as atuais hipóteses de relacionamento dentro de Loricarioidea.

CONCLUSÕES

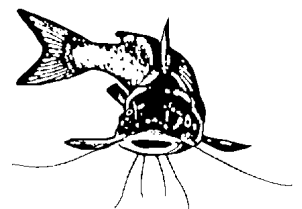


6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que:

- 1.** Os dados moleculares corroboram a hipótese de monofilia da superfamília Loricarioidea.
- 2.** Os dados moleculares apontam Nematogenyidae como grupo-irmão de todas as demais famílias de Loricarioidea.
- 3.** Scoloplacidae apareceu como grupo-irmão de Callichthyidae.
- 4.** Loricariidae, Astroblepidae e Trichomycteridae formaram um grupo monofilético sendo Trichomycteridae grupo irmão do clado formado pelas demais famílias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, R.M. (1965). Structure and function in catfish. *J. Zool.*, 148: 88-152.
- Alves-Gomes, J., Ortí, G., Haygood, M., Heiligenberg, W., Meyer, A. (1995). Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Mol. Biol. Evol.*, 12: 298-318.
- Arratia, G., Kapoor, B.G., Chardon, M., Diogo, R. (2003). *Catfishes*. 2 vol., Plymouth: Science Publishers, 844 pp.
- Baskin, J. N. (1973). Structure and relationships of the Trichomycteridae. Tese de Doutorado, City University of New York, New York, 389 pp.
- Bremer, K. (1988). The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution*, 42: 795-803.
- Britto, M.R. (2002). Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysi). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual 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., Schaefer, S.A., DeSalle, R. (2005). Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 36: 135-163.
- Chubb, A.L. (2004). New nuclear evidence for the oldest divergence among neognath birds: the phylogenetic utility of ZENK (i). *Mol. Biol. Evol.*, 30: 140-151.
- Delsuc, F., Stanhope, M.J., Douzery, E.J.P. (2003). Molecular systematics of armadillos (Xenartha, Dasypodidae): contribution of maximum likelihood and Bayesian analyses of mitochondrial and nuclear genes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 28: 261-275.
- de Pinna, M.C.C. (1993). Higher level phylogeny of Siluriformes, with a new classification of the order (Teleostei, Ostariophysi). Tese de Doutorado, The City University of New York, New York.
- 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.
- 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.

- Eschmeyer, W.N. (1998). Catalog of fishes. 3 Vol. California Academy of Science, California.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Felsenstein, J. (2004). Inferring phylogenies. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 664 pp.
- Ferraris, C.J. (1998). Catfishes and knifefishes. In: Encyclopedia of fishes (Paxton, J.R., Eschmeyer, W.N., eds.). 2a. ed., Academic Press, San Diego, pp. 106-112.
- Ferraris, C.J.; de Pinna, M.C.C. (1999). Higher-level names for catfishes (Actinopterygii: Ostariophysii: Siluriformes). *Proc. Calif. Acad. Sci.*, 51: 1-17.
- Ferraris, C.J. (2007). Checklist of catfishes, 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.
- Futuyma, D.J. (1992). *Biologia Evolutiva*. 2 ed., Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, Ribeirão Preto.
- Grande, L., Eastman, J.T. (1986). A review of Antarctic ichthyofaunas in the light of new fossil discoveries. *Paleontology*, 29(1): 113-137.
- Glenn, T. PEG Precipitation of PCR products. (acessado em 03/10/2006: <http://www.uga.edu/srel/DNA Lab/PEG Precip'00.rtf>)
- Gudger, E.W. (1930). *The Candiru – The only vertebrate parasite of man*. Paul B. Hoeber, New York, xvii:120pp.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Sump. Ser.*, 41: 95-98.
- Hardman, M. (2004). The phylogenetic relationships among *Noturus* catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) as inferred from mitochondrial gene cytochrome *b* and nuclear recombination activating gene 2. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 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). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 37: 700-720.
- Hardman, M., Page, L.M. (2003). Phylogenetic relationships among bullhead catfishes of the genus *Ameiurus* (Siluriformes: Ictaluridae). *Copeia*, 2003 (1): 20-33.
- Hrbek, T., Küçük, F., Frickey, T., Stölting, K.N., Wildekamp, R.H., Meyer, A. (2002). Molecular phylogeny and historical biogeography of the *Aphanius* (Pisces, Cyprinodontiformes) species complex of central Anatolia, Turkey. *Mol. Phylogenet. Evol.* 25, 125-137.

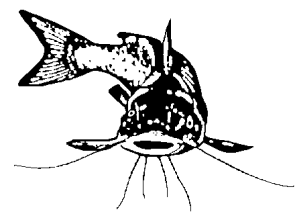
- Huelsenbeck, J.P., Roquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17: 754-755.
- Inoue, J.G., Miya, M., Tsukamoto, K., Nishida, M. (2001). A mitogenetic perspective on the basal teleostean phylogeny: resolving higher-level relationships with longer DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 20: 275-285.
- Kelley, W. A., Atz, J.W. (1964). A pygidiid catfish that can suck blood from goldfish. *Copeia* 1964: 702-704.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 111-120.
- Koblmüller, S., Salzburger, W., Sturmbauer, C. (2004). Evolutionary relationships in the sand-dwelling cichlid lineage of lake Tanganyika suggest multiple colonization of rocky habitats and convergent origin of biparental mouthbrooding. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 58: 79-96.
- Kocher, T.D., Stepien, C.A. (1997). *Molecular Systematics of Fishes*. Academic Press, London, U.K.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M. (2001) MEGA2.1: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Distribuído pelos autores. *Bioinformatics* (submitted).
- Lavoué, S., Sullivan, J.P., Hopkins, C.D., (2003). Phylogenetic utility of the first two introns 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.
- Lewin, B. (1994). *Genes V*. Oxford University Press Inc., New York, 1272 p.
- Lovejoy, N.R., Collete, B.B. (2001). Phylogenetic relationships of new world needlefishes (Teleostei: Belontiidae) and the biogeography of transitions between marine and freshwater habitats. *Copeia* 2001, 324-338.
- Lydeard, C., Wooten, M.C. e Meyer, A. (1995). Molecules, morphology, and area cladograms: a cladistic and biogeographic analysis of *Gambusia* (Teleostei: Poeciliidae). *Syst. Biol.*, 44: 221-236.
- Lydeard, C., Roe, K.J. (1997). The phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome *b* gene for inferring relationships among actinopterygian fishes. In: Kocher, T.D., Stepien, C.A. (Eds.), *Molecular Systematics of Fishes*. Academic Press, New York, pp. 285-303.
- Machado, F.A., Sazima, I. (1983). Comportamento alimentar do peixe hematófago *Branchioica bertonii* (Siluriformes, Trichomycteridae). *Ciência e Cultura*, 35: 344-348.
- Miguel, E.R. (2004). Estudos filogenéticos na superfamília Loricarioidea (Teleostei: Siluriformes) com base em seqüências do DNA mitocondrial. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Misawa, K., Janke, A. (2003). Revisiting the Glires concept-phylogenetic analysis of nuclear sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 320-327.

- Miya, M., Takeshima, H., Endo, H., Ishiguro, N.B. et al. (2003). Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26: 121-138.
- Mo, T. (1991). *Anatomy, Relationships and Systematics of the Bagridae (Teleostei: Siluroidei) – With a Hypothesis of Siluroid Phylogeny*. Theses Zoologicae 17. Koeltz Scientific Books, Königstein.
- Murphy, W.J., Collier, G.E. (1997). A molecular phylogeny for Aplocheiloid fishes (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): the role of vicariance and the origins of annualism. *Mol. Biol. Evol.*, 14: 790-799.
- Murphy, W.J.; Thomerson, J.E.; Collier, G.E. (1999). Phylogeny of the neotropical killifish family Rivulidae (Cyprinodontiformes, Aplocheiloidei) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 13: 289-301.
- Nei, M., Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York, USA.
- Nelson, J.S. (1994). *Fishes of the world*. 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Nelson, J.S. (2006). *Fishes of the world*. 4rd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Orti, G. Meyer, A. (1996). Molecular evolution of ependymin and the phylogenetic resolution of early divergences among euteleost fishes. *Mol. Biol. Evol.*, 13: 556-573.
- Orti, G. Meyer, A. (1997). The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Syst. Biol.*, 46: 75-100.
- 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.
- Parkinson, C.L. (1999). Molecular systematics and biogeographical history of pitvipers as determined by mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Copeia* 1999, 576-586.
- Paxton, J.R., Eschmeyer, W.N. (1998). *Encyclopedia of fishes*. 2a. ed., Academic Press, San Diego.
- Peyer, B. (1922). Über die Flossenstacheln der Welse und Panzerwelse, sowie des Karpfens. *Morph. Jahrb.* 51: 493-554.
- Posada, D., Crandall, K.A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Quenouille, B., Bermingham, E., Planes, S. (2004). Molecular systematics of the damselfishes (Teleostei: Pomacentridae): Bayesian phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 31: 66-88.
- Reeder, T.W. (1995). Phylogenetic relationships among phrynosomatid lizards as inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences: substitutional bias and

- information content of transitions relative to transversions. *Mol. Phylogenet. Evol.* 4, 203-222.
- Reis, R.E. (1998). Anatomy and phylogenetic analysis of the neotropical callichthyid catfishes (Ostariophysi, Siluriformes). *Zool. J. Linn. Soc.* 124, 105-168.
- Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris Jr., C.J. (2003). Check list of the freshwater fishes of South America. Porto Alegre: Edipucrs, 729 pp.
- Rodiles-Hernández, R., Hendrickson, D.A., Lundberg, J.G., Humphries, J.M., (2005). *Lacantunia enigmatica*, (Teleostei: Siluriformes) a new and phylogenetically puzzling freshwater fish from Mesoamerica. *Zootaxa.*, 1000: 1-24.
- Savage, J.M. (1995). Systematics and the biodiversity crisis. *BioScience*, 45: 637-679.
- Schaefer, S.A. (1990). Anatomy and relationships of the scoloplacid catfishes. *Proc. Acad. Nat. Sci. Phil.*, 142: 167-210.
- Schaefer, S.A. (1998). Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). IN: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes.* (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S., eds). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, pp. 375-400.
- Schaefer, S.A., Lauder, G.V. (1986). Historical transformation of functional design: evolutionary morphology of feeding mechanisms in loricarioid catfishes. *Syst. Zool.*, 35: 489-508.
- Shimabukuro-Dias, C.K., Oliveira, C., Reis, R.E., Foresti, F. (2004). Molecular phylogeny of the armored catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32: 152-163.
- Slowinski, J.B., Lawson, R. (2002). Snake phylogeny: evidence from nuclear and mitochondrial genes. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 194-202.
- Sullivan, J.P., Lundberg, J.G., Hardman, M. (2006). A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 41: 636-662.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J., Hillis, D.M. (1996). Phylogenetic inference. IN: *Molecular Systematics.* (Hillis, D.M, Moritz, C., Mable, B.K., eds). Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, USA, 407-514 pp.
- Teeling, E.C., Madsen, O., Murphy, W.J., Springer, M.S., O'Brien, S.J. (2003). Nuclear gene sequences confirm an ancient link between New Zealand's short-tailed bat and South American noctilionoid bats. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 308-319.
- 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.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D.N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 360: 1847-1857.
- Xia, X., Xie, Z. (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity* 92, 371-373.
- Zhang, D.-X., Hewitt, G.M., (1996). Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends Ecol. Evol.* 11, 247-251.

ANEXOS



11581_Chaetostoma_fischeri
11582_Astroblepus_trifasciatum
12274_Chaetostoma_fischeri
12311_Ancistrus_chagresi
12514_Scoloplax_distolothrix
12885_Ancistrus_chagresi
13382_Rineloricaria_uranantha
15201_Astroblepus_trifasciatum
15314_Trichomycterus_striatus
16203_Chaetostoma_fischeri
16248_Astroblepus_trifasciatum
16298_Trichomycterus_striatus
19764_Nematogenys_inermis
19770_Diplomyctes_composensis
22406_Trichogenes_longipinnis

0070_Hemiancistrus_aspidolepis
87_Ancistrus_spinosis
240_Ancistrus_spinosis
909_Sturisomatichthys_citirensis
1033_Sturisoma_panamense
1317_Rineloricaria_uranantha
1646_Lasiancistrus_planiceps
1662_Rineloricaria_uranantha
2673_Astroblepus_trifasciatum
3436_Hemiancistrus_aspidolepis
3485_Hemiancistrus_aspidolepis
3526_Lasiancistrus_planiceps
3566_Hoplosternum_punctatum
3589_Rineloricaria_altipinnis
3630_Rineloricaria_altipinnis
3655_Ancistrus_spinosis
3800_Astroblepus_longifilis
3803_Astroblepus_longifilis
4135_Trichomycterus_striatus
4140_Dasylicaria_tuyrensis
6706_Chaetostoma_fischeri
6711_Dasylicaria_capetensis
6712_Dasylicaria_capetensis
6757_Rineloricaria_altipinnis
6772_Ancistrus_spinosis
6781_Crossoloricaria_variegata
6958_Sturisoma_panamense
6959_Sturisomatichthys_citirensis
6961_Lasiancistrus_planiceps
7113_Dianema_urostriata
11132_Sturisoma_panamense
11453_Astroblepus_sp
11580_Leptoancistrus_canensis
11581_Chaetostoma_fischeri
11582_Astroblepus_trifasciatum
12274_Chaetostoma_fischeri
12311_Ancistrus_chagresi
12514_Scoloplax_distolothrix
12885_Ancistrus_chagresi
13382_Rineloricaria_uranantha
15201_Astroblepus_trifasciatum
15314_Trichomycterus_striatus
16203_Chaetostoma_fischeri
16248_Astroblepus_trifasciatum
16298_Trichomycterus_striatus
19764_Nematogenys_inermis
19770_Diplomyctes_composensis
22406_Trichogenes_longipinnis

0070_Hemiancistrus_aspidolepis
87_Ancistrus_spinosis
240_Ancistrus_spinosis
909_Sturisomatichthys_citirensis
1033_Sturisoma_panamense
1317_Rineloricaria_uranantha
1646_Lasiancistrus_planiceps
1662_Rineloricaria_uranantha
2673_Astroblepus_trifasciatum
3436_Hemiancistrus_aspidolepis
3485_Hemiancistrus_aspidolepis
3526_Lasiancistrus_planiceps
3566_Hoplosternum_punctatum
3589_Rineloricaria_altipinnis
3630_Rineloricaria_altipinnis
3655_Ancistrus_spinosis
3800_Astroblepus_longifilis
3803_Astroblepus_longifilis
4135_Trichomycterus_striatus
4140_Dasylicaria_tuyrensis
6706_Chaetostoma_fischeri
6711_Dasylicaria_capetensis
6712_Dasylicaria_capetensis
6757_Rineloricaria_altipinnis
6772_Ancistrus_spinosis
6781_Crossoloricaria_variegata
6958_Sturisoma_panamense
6959_Sturisomatichthys_citirensis
6961_Lasiancistrus_planiceps
7113_Dianema_urostriata
11132_Sturisoma_panamense
11453_Astroblepus_sp
11580_Leptoancistrus_canensis
11581_Chaetostoma_fischeri
11582_Astroblepus_trifasciatum
12274_Chaetostoma_fischeri
12311_Ancistrus_chagresi
12514_Scoloplax_distolothrix
12885_Ancistrus_chagresi
13382_Rineloricaria_uranantha
15201_Astroblepus_trifasciatum
15314_Trichomycterus_striatus
16203_Chaetostoma_fischeri
16248_Astroblepus_trifasciatum
16298_Trichomycterus_striatus
19764_Nematogenys_inermis
19770_Diplomyctes_composensis
22406_Trichogenes_longipinnis

0070_Hemiancistrus_aspidolepis
87_Ancistrus_spinosis
240_Ancistrus_spinosis
909_Sturisomatichthys_citirensis
1033_Sturisoma_panamense
1317_Rineloricaria_uranantha
1646_Lasiancistrus_planiceps
1662_Rineloricaria_uranantha
2673_Astroblepus_trifasciatum
3436_Hemiancistrus_aspidolepis
3485_Hemiancistrus_aspidolepis
3526_Lasiancistrus_planiceps
3566_Hoplosternum_punctatum
3589_Rineloricaria_altipinnis
3630_Rineloricaria_altipinnis
3655_Ancistrus_spinosis
3800_Astroblepus_longifilis
3803_Astroblepus_longifilis
4135_Trichomycterus_striatus
4140_Dasylicaria_tuyrensis
6706_Chaetostoma_fischeri
6711_Dasylicaria_capetensis
6712_Dasylicaria_capetensis
6757_Rineloricaria_altipinnis
6772_Ancistrus_spinosis
6781_Crossoloricaria_variegata
6958_Sturisoma_panamense
6959_Sturisomatichthys_citirensis
6961_Lasiancistrus_planiceps
7113_Dianema_urostriata
11132_Sturisoma_panamense
11453_Astroblepus_sp
11580_Leptoancistrus_canensis
11581_Chaetostoma_fischeri
11582_Astroblepus_trifasciatum
12274_Chaetostoma_fischeri
12311_Ancistrus_chagresi
12514_Scoloplax_distolothrix
12885_Ancistrus_chagresi
13382_Rineloricaria_uranantha
15201_Astroblepus_trifasciatum
15314_Trichomycterus_striatus
16203_Chaetostoma_fischeri
16248_Astroblepus_trifasciatum
16298_Trichomycterus_striatus

4135_Trichomycterus_striatus
4140_Dasylicaria_tuyrensis
6706_Chaetostoma_fischeri
6711_Dasylicaria_capetensis
6712_Dasylicaria_capetensis
6757_Rineloricaria_altipinnis
6772_Ancistrus_spinosus
6781_Crossoloricaria_variegata
6958_Sturisoma_panamense
6959_Sturisomatichthys_citirensis
6961_Lasiancistrus_planiceps
7113_Dianema_urostriata
11132_Sturisoma_panamense
11453_Astroblepus_sp
11580_Leptoancistrus_canensis
11581_Chaetostoma_fischeri
11582_Astroblepus_trifasciatum
12274_Chaetostoma_fischeri
12311_Ancistrus_chagresi
12514_Scoloplax_distolothrix
12885_Ancistrus_chagresi
13382_Rineloricaria_urantha
15201_Ancistrus_trifasciatum
15314_Trichomycterus_striatus
16203_Chaetostoma_fischeri
16248_Astroblepus_trifasciatum
16298_Trichomycterus_striatus
19764_Nematostenes_inermis
19770_Diplomyetes_compensis
22406_Trichogenes_longipinnis

0070_Hemiancistrus_aspidolepis
87_Ancistrus_spinosus
240_Ancistrus_spinosus
909_Sturisomatichthys_citirensis
1033_Sturisoma_panamense
1317_Rineloricaria_urantha
1646_Lasiancistrus_planiceps
1662_Rineloricaria_urantha
2673_Astroblepus_trifasciatum
3436_Hemiancistrus_aspidolepis
3485_Hemiancistrus_aspidolepis
3526_Lasiancistrus_planiceps
3566_Hoplosternum_punctatum
3589_Rineloricaria_altipinnis
3630_Rineloricaria_altipinnis
3655_Ancistrus_spinosus
3800_Astroblepus_longifilis
3803_Astroblepus_longifilis
4135_Trichomycterus_striatus
4140_Dasylicaria_tuyrensis
6706_Chaetostoma_fischeri
6711_Dasylicaria_capetensis
6712_Dasylicaria_capetensis
6757_Rineloricaria_altipinnis
6772_Ancistrus_spinosus
6781_Crossoloricaria_variegata
6958_Sturisoma_panamense
6959_Sturisomatichthys_citirensis
6961_Lasiancistrus_planiceps
7113_Dianema_urostriata
11132_Sturisoma_panamense
11453_Astroblepus_sp
11580_Leptoancistrus_canensis
11581_Chaetostoma_fischeri
11582_Astroblepus_trifasciatum
12274_Chaetostoma_fischeri
12311_Ancistrus_chagresi
12514_Scoloplax_distolothrix
12885_Ancistrus_chagresi
13382_Rineloricaria_urantha
15201_Ancistrus_trifasciatum
15314_Trichomycterus_striatus
16203_Chaetostoma_fischeri
16248_Astroblepus_trifasciatum
16298_Trichomycterus_striatus
19764_Nematostenes_inermis
19770_Diplomyetes_compensis
22406_Trichogenes_longipinnis

0070_Hemiancistrus_aspidolepis
87_Ancistrus_spinosus
240_Ancistrus_spinosus
909_Sturisomatichthys_citirensis
1033_Sturisoma_panamense
1317_Rineloricaria_urantha
1646_Lasiancistrus_planiceps
1662_Rineloricaria_urantha
2673_Astroblepus_trifasciatum
3436_Hemiancistrus_aspidolepis
3485_Hemiancistrus_aspidolepis
3526_Lasiancistrus_planiceps
3566_Hoplosternum_punctatum
3589_Rineloricaria_altipinnis
3630_Rineloricaria_altipinnis
3655_Ancistrus_spinosus
3800_Astroblepus_longifilis
3803_Astroblepus_longifilis
4135_Trichomycterus_striatus
4140_Dasylicaria_tuyrensis
6706_Chaetostoma_fischeri
6711_Dasylicaria_capetensis
6712_Dasylicaria_capetensis
6757_Rineloricaria_altipinnis
6772_Ancistrus_spinosus
6781_Crossoloricaria_variegata
6958_Sturisoma_panamense
6959_Sturisomatichthys_citirensis
6961_Lasiancistrus_planiceps
7113_Dianema_urostriata

3803_Astroblepus_longifilis
4135_Trichomycterus_striatus
4140_Dasylicaria_tuyrensis
6706_Chaetostoma_fischeri
6711_Dasylicaria_capetensis
6712_Dasylicaria_capetensis
6757_Rineloricaria_altipinnis
6772_Ancistrus_spinusos
6781_Crossoloricaria_variegata
6958_Sturisoroma_panamense
6959_Sturisoromatichthys_citirensis
6961_Lasiancistrus_planiceps
7113_Dianema_urostriata
11132_Sturisoroma_panamense
11453_Astroblepus_sp
11580_Leptoancistrus_canensis
11581_Chaetostoma_fischeri
11582_Astroblepus_trifasciatum
1274_Chaetostoma_fischeri
12311_Ancistrus_chagresi
12514_Scoloplax_distolothrix
12885_Ancistrus_chagresi
13382_Rineloricaria_uracantha
15201_Astroblepus_trifasciatum
15314_Trichomycterus_striatus
16203_Chaetostoma_fischeri
16248_Astroblepus_trifasciatum
16298_Trichomycterus_striatus
19764_Nematogenys_inermis
19770_Diplomystes_camposensis
22406_Trichogenes_longipinnis

0070_Hemiancistrus_aspidolepis
87_Ancistrus_spinusos
240_Ancistrus_spinusos
909_Sturisoromatichthys_citirensis
1033_Sturisoroma_panamense
1317_Rineloricaria_uracantha
1646_Lasiancistrus_planiceps
1662_Rineloricaria_uracantha
2673_Astroblepus_trifasciatum
3436_Hemiancistrus_aspidolepis
3485_Hemiancistrus_aspidolepis
3526_Lasiancistrus_planiceps
3566_Hoplosternum_punctatum
3589_Rineloricaria_altipinnis
3630_Rineloricaria_altipinnis
3655_Ancistrus_spinusos
3800_Astroblepus_longifilis
3803_Astroblepus_longifilis
4135_Trichomycterus_striatus
4140_Dasylicaria_tuyrensis
6706_Chaetostoma_fischeri
6711_Dasylicaria_capetensis
6712_Dasylicaria_capetensis
6757_Rineloricaria_altipinnis
6772_Ancistrus_spinusos
6781_Crossoloricaria_variegata
6958_Sturisoroma_panamense
6959_Sturisoromatichthys_citirensis
6961_Lasiancistrus_planiceps
7113_Dianema_urostriata
11132_Sturisoroma_panamense
11453_Astroblepus_sp
11580_Leptoancistrus_canensis
11581_Chaetostoma_fischeri
11582_Astroblepus_trifasciatum
1274_Chaetostoma_fischeri
12311_Ancistrus_chagresi
12514_Scoloplax_distolothrix
12885_Ancistrus_chagresi
13382_Rineloricaria_uracantha
15201_Astroblepus_trifasciatum
15314_Trichomycterus_striatus
16203_Chaetostoma_fischeri
16248_Astroblepus_trifasciatum
16298_Trichomycterus_striatus
19764_Nematogenys_inermis
19770_Diplomystes_camposensis
22406_Trichogenes_longipinnis

0070_Hemiancistrus_aspidolepis
87_Ancistrus_spinusos
240_Ancistrus_spinusos
909_Sturisoromatichthys_citirensis
1033_Sturisoroma_panamense
1317_Rineloricaria_uracantha
1646_Lasiancistrus_planiceps
1662_Rineloricaria_uracantha
2673_Astroblepus_trifasciatum
3436_Hemiancistrus_aspidolepis
3485_Hemiancistrus_aspidolepis
3526_Lasiancistrus_planiceps
3566_Hoplosternum_punctatum
3589_Rineloricaria_altipinnis
3630_Rineloricaria_altipinnis
3655_Ancistrus_spinusos
3800_Astroblepus_longifilis
3803_Astroblepus_longifilis
4135_Trichomycterus_striatus
4140_Dasylicaria_tuyrensis
6706_Chaetostoma_fischeri
6711_Dasylicaria_capetensis
6712_Dasylicaria_capetensis
6757_Rineloricaria_altipinnis
6772_Ancistrus_spinusos
6781_Crossoloricaria_variegata
6958_Sturisoroma_panamense
6959_Sturisoromatichthys_citirensis
6961_Lasiancistrus_planiceps

1033_Sturisoma_panamense	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGGTCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAATTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
1317_Rineloricaria_uracantha	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
1646_Lasiancistrus_planiceps	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
1662_Rineloricaria_uracantha	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
2673_Astroblepus_trifasciatum	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
3436_Hemiancistrus_aspidolepis	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
3485_Hemiancistrus_aspidolepis	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
3526_Lasiancistrus_planiceps	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
3566_Hoplosternum_punctatum	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
3589_Rineloricaria_altipinnis	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
3630_Rineloricaria_altipinnis	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
3655_Ancistrus_spinosus	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
3800_Astroblepus_longifilis	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
3803_Astroblepus_longifilis	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
4135_Trichomycterus_striatus	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
4140_Dasylicaria_tuyrensis	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
6706_Chaetostoma_fischeri	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
6711_Dasylicaria_capetensis	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
6712_Dasylicaria_capetensis	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
6757_Rineloricaria_altipinnis	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
6772_Ancistrus_spinosus	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
6781_Crossoloricaria_variegata	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
6958_Sturisoma_panamense	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
6959_Sturisomatichthys_citirensis	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
6961_Lasiancistrus_planiceps	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
7113_Dianema_urostriata	??
11132_Sturisoma_panamense	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
11453_Astroblepus_sp	??
11580_Leptoancistrus_canensis	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
11581_Chaetostoma_fischeri	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
11582_Astroblepus_trifasciatum	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
12274_Chaetostoma_fischeri	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
12311_Ancistrus_chagresi	??
12514_Scoloplax_distolothrix	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
12885_Ancistrus_chagresi	??
13382_Rineloricaria_uracantha	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
15201_Astroblepus_trifasciatum	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
15314_Trichomycterus_striatus	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
16203_Chaetostoma_fischeri	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
16248_Astroblepus_trifasciatum	AAGAATCCACTGAATTTGAGGATTCAGCTCCCTCCTAGAGGATTCAGAAGAAGCTATACTTTGGACGTGAACCCACATGAAATGGAGT
16298_Trichomycterus_striatus	??
19764_Nematogenys_inermis	??
19770_Diplomystes_camposensis	??
22406_Trichogenes_longipinnis	??