

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

GLEISY SEMENCIO AVELINO DOS SANTOS

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS ESPÉCIES DE *LEPORINUS*
(OSTARIOPHYSI: CHARACIFORMES: ANOSTOMIDAE) DAS
BACIAS DO PRATA E SÃO FRANCISCO**

MESTRADO

ORIENTADOR: Prof. Dr. CLAUDIO DE OLIVEIRA

Botucatu – SP
2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

GLEISY SEMENCIO AVELINO DOS SANTOS

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS ESPÉCIES DE *LEPORINUS*
(OSTARIOPHYSI: CHARACIFORMES: ANOSTOMIDAE) DAS
BACIAS DO PRATA E SÃO FRANCISCO**

Dissertação apresentada ao Departamento de Morfologia do Instituto de Bociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu, para a obtenção do título de MESTRE em Ciências Biológicas, área de concentração: Zoologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. CLAUDIO DE OLIVEIRA

Botucatu – SP
2007

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meu
marido Márcio Éder, que
jamais deixou de acreditar
em mim.

PEGADAS NA AREIA

Uma noite, sonhei que caminhava ao longo de uma praia acompanhado por Deus.

Durante a caminhada, muitas cenas da minha vida se foram projetando numa tela do céu.

Conforme ia passando cada uma dessas cenas, notava que se formavam pegadas na areia.

Às vezes apareciam dois pares de pegadas, em outras somente aparecia um par.

Preocupou-me, porque notei que durante as cenas que refletiam etapas tristes da minha vida, só podia ver um par de pegadas na areia.

Então, disse a Deus:

“Senhor, Tu me prometeste que, se Te seguisse, Tu caminharias sempre a meu lado. Não obstante, notei que durante os momentos mais difíceis da minha vida, somente havia um par de pegadas na areia. Por que, quando mais necessitava de Ti, não caminhavas a meu lado?”

O Senhor me respondeu:

“Às vezes em que viste só um par de pegadas na areia, filho meu, foi quando te levava em Meus braços.”

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai, que me acompanha em todas as etapas da minha vida e por ter me ajudado a cumprir mais uma delas.

Ao Márcio Éder, meu amor, pelo seu apoio, incentivo e companheirismo em todos os momentos.

Aos meus pais, Jair e Helena e as minhas irmãs, Luciana e Karina, que a cada dia, com muito amor e carinho, me mostram que família é tudo na vida da gente.

Ao meu orientador, professor Dr. Claudio de Oliveira, pela sua orientação, dedicação e confiança em meu trabalho.

Aos professores, Dr. Fausto Foresti e Dr. César Martins, pela dedicação e apoio ao laboratório de Biologia e Genética de Peixes.

Ao Dr. Heraldo A. Britiski do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo pela imprescindível ajuda na identificação dos animais estudados.

A todos os colegas e amigos das “bancadas” do laboratório, pelo auxílio, pelo companheirismo e pela vivência compartilhada de cada dia.

A Luciana Ramos Sato, pela grande ajuda no laboratório.

Aos colegas da citogenética, em especial ao “trio parada dura”, Lígia, Patrícia e Ricardo, pela convivência e amizade que cultivamos além laboratório.

Ao programa de Pós-Graduação pelo auxílio na realização deste estudo.

Ao departamento de Morfologia do Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu, pelas condições que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao CNPq e Fapesp, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho,
meu sincero agradecimento.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Leporinus</i> distribuídas nas bacias dos rios Paraná e São Francisco, segundo Garavello e Britski (2003)	7
Tabela 2. Relação de exemplares utilizados nas análises filogenéticas e seus respectivos dados sobre localidade de coleta	18
Tabela 3. Relação dos primers utilizados para amplificação de parte dos genes mitocondriais e nuclear. 16S = gene ribossômico 16S (mitocondrial); Cyt b = citocromo B (mitocondrial); Fish = citocromo oxidase I (mitocondrial); Trop = α -tropomiosina (nuclear)	26
Tabela 4. Condições do PCR	26
Tabela 5. Posição dos fragmentos dos genes utilizados, no genoma mitocondrial completo de <i>Cyprinus carpio</i> (carpa) – número de acesso no GenBank (X61010)	26
Tabela 6. Amostras seqüenciadas no presente estudo. 16S = gene rRNA ribossômico 16S; Cyt b = citocromo B; COI = citocromo oxidase I; Trop = α -tropomiosina	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa das bacias hidrográficas da região Neotropical	8
Figura 2. Piapara, <i>Leporinus cf. obtusidens</i> A, coletada no rio Mogi-Guaçu (Bacia do Prata). Comprimento padrão 230,0 mm	15
Figura 3. Piapara, <i>Leporinus cf. obtusidens</i> A, coletada na Represa de Três Marias (Bacia do Rio São Francisco). Comprimento padrão 270,0 mm	15
Figura 4. Piapara, <i>Leporinus cf. obtusidens</i> A, coletado no rio Uruguai (Bacia do Prata) . Comprimento padrão 280,0 mm.	15
Figura 5. Piapara, <i>Leporinus cf. obtusidens</i> A, coletado no rio Jacui (Região costeira oriental). Comprimento padrão 240,0 mm.	16
Figura 6. Piaçu, <i>Leporinus cf. obtusidens</i> B, coletado no rio Tietê (Bacia do Prata). Comprimento padrão 270,0 mm.	16
Figura 7. Exemplar de <i>Leporinus silvestrii</i> , coletado no rio Cuiabá (Bacia do Prata). Comprimento padrão 230,0 mm	16
Figura 8. Localidades de coleta das amostras analisadas	21
Figura 9. Esquema do genoma mitocondrial completo de vertebrados. As flechas indicam a posição dos primers utilizados para amplificação dos genes analisados	27

Figura 10. Mapa mostrando as posições dos primers TropF (íntron 3) e TropR (éxon 5) em um segmento do DNA genômico de <i>Danio rerio</i> (número de acesso: Genbank AL845510)	28
Figura 11. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de distância p , e a frequência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para o gene 16S	38
Figura 12. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de distância p , e a frequência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para o gene Citocromo b	40
Figura 13. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de distância p , e a frequência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para o gene Citocromo oxidase I	41
Figura 14. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de distância p , e a frequência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para o gene Trop	42
Figura 15. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de distância p , e a frequência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para os genes 16S, Citocromo b, Citocromo oxidase I e Trop	43

Figura 16. Filogenia gerada pelo método de Máxima Parcimônia, utilizando todos os dados disponíveis, considerando os “gaps” como uma quinta base e com sistema de pesagem das transições e transversões 2:1 respectivamente. Os números acima dos ramos correspondem aos valores de bootstrap e das probabilidades posteriores obtidas na análise bayesiana, respectivamente. Os números abaixo dos ramos correspondem aos valores do índice de decaimento de Bremer

46

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Ordem Characiformes	2
1.2 Família Anostomidae	3
1.3 Gênero <i>Leporinus</i>	4
1.4 Área de Estudo	5
1.5 Estudos Moleculares e Filogenéticos	9
2. Objetivos	12
3. Materiais e Métodos	13
3.1 Materiais	13
3.2 Métodos	22
3.2.1 Extração de DNA	22
3.2.1.1 Extração de DNA com Fenol	22
3.2.1.2 Extração de DNA com Tampão de extração	23
3.2.2 Amplificação e limpeza dos fragmentos	24
3.2.2.1 Purificação do DNA	29
3.2.2.2 Protocolo de limpeza utilizado para método de extração salina	30
3.2.2.3 Limpeza com a enzima ExoSAP-IT	31
3.2.3 Reação de Seqüenciamento e limpeza	32
3.2.3.1 Limpeza dos fragmentos marcados	32

3.2.4 Alinhamento das seqüências e análise filogenética_____	34
4. Resultados_____	35
4.1 Gene 16S rRNA_____	38
4.2 Gene Citocromo b_____	39
4.3 Gene Citocromo oxidase I _____	40
4.4 Gene α -Tropomiosina_____	42
4.5 Análise conjunta dos genes 16S rRNA, Citocromo b, Citocromo oxidase I e α -Tropomiosina_____	43
4.6 Análises filogenéticas _____	44
5. Discussão_____	47
6. Conclusão_____	54
7. Referências Bibliográficas_____	55
8. Anexo_____	64

RESUMO

Os peixes da ordem Characiformes representam um dos principais componentes da ictiofauna de água doce da América do Sul. A família Anostomidae, dentro da ordem Characiformes, representa um dos grupos mais importantes, com muitas espécies de alto valor econômico em termos de pesca e piscicultura (como a piapara, o piauçu e os piaus) e também como espécies ornamentais. Atualmente há uma hipótese de relação entre a família Anostomidae e a família Chilodontidae, porém nenhum estudo sistemático a nível genérico ou específico foi conduzido com representantes da família Anostomidae até o momento. O presente projeto teve por objetivo principal o estudo das relações entre as espécies de *Leporinus* que ocorrem nas bacias do Prata e São Francisco. Foram utilizadas 17 espécies de *Leporinus* como grupo interno e como grupo externo foram analisadas duas espécies de Anostomidae do gênero *Schizodon* e duas espécies de Chilodontidae: *Caenotropus labyrinthicus* e *Chilodus punctatus*. A delimitação da área de estudo do presente projeto foi necessária tendo em vista a grande diversidade do grupo e a impossibilidade de conduzir uma análise extensiva com todas suas espécies. Com o objetivo de apresentar uma hipótese de relacionamento para as espécies do gênero *Leporinus*, foram seqüenciados parte dos genes mitocondriais 16S rRNA, Citocromo B e Citocromo oxidase I e do gene nuclear α -tropomiosina. Os resultados mostraram que o gênero *Leporinus* forma um grupo monofilético, porém as espécies de *Leporinus* do Prata e do São Francisco não formam unidades monofiléticas, havendo sim espécies do Prata e do São Francisco que pertencem a grupos monofiléticos. As relações entre as espécies investigadas mostram um complexo padrão de derivação das ictiofaunas das duas bacias estudadas.

ABSTRACT

The fish of the order Characiformes represent one of the main components of ichthyofauna of freshwater of the South America. Anostomidae represents one of the most important group of Characiformes, with many species of high economic value in terms of fishery and aquaculture (as piapara, piauçu and piaus) and as ornamental species. Currently only a hypothesis of relationship between Anostomidae and Chilodontidae was presented, however no systematic study at generic or specific level was conducted with representatives of Anostomidae. The present project had as the main goal the study of the relationships between species of *Leporinus* that occur in the basins of Prata and San Francisco. We analyze 17 species of *Leporinus* as ingroup and as outgroup two species of Anostomidae of the genus *Schizodon* and two species of Chilodontidae: *Caenotropus labyrinthicus* and *Chilodus punctatus*. The delimitation of the area of study of the present project was necessary in view of the great diversity of the group and the impossibility to lead an extensive analysis with all its species. Partial sequences of the mitochondrial genes 16S rRNA, cytochrome b and cytochrome oxidase I and of the nuclear gene α -tropomyosin were obtained. The results shown that the *Leporinus* forms a monophyletic group, however the species of *Leporinus* of the Prata and the San Francisco do not form monophyletic units, having yes species of the Prata and the San Francisco that belong the monophyletic groups. The relations between the investigated species show a complex standard of derivation of ichthyofauna of the two studied basins.

Lista das abreviações usadas no presente trabalho.

Abreviações	Significado
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
HCl	Ácido clorídrico
Kb	10 ³ pares de bases
Mg	10 ⁻³ grama
MgCl	Cloreto de Magnésio
min	Minuto
ml	10 ⁻³ litro
mM	10 ⁻³ Molar
mtDNA	DNA mitocondrial
NaCl	Cloreto de Sódio
pb	Pares de bases nitrogenadas
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase chain reaction</i>)
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Tris-CL	Hidroximetil Amino Metano-Cloro
Tris-HCL	Hidroximetil Amino Metano-Ácido clorídrico
μl	10 ⁻⁶ litro
μM	10 ⁻⁶ Molar

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento da diversidade biológica parece ser tão antigo quanto o próprio conhecimento humano. O Gênesis, por exemplo, refere-se à origem das espécies por um processo de criação e relata a atribuição de nomes às espécies de animais. De fato, esse é um dos exemplos mais antigos conhecidos de preocupação formal do homem com a elaboração de nomes para os organismos (Amorim, 2002).

Estudar Sistemática Filogenética pode servir a dois objetivos principais. Um deles é fornecer subsídios para uma compreensão geral da diversidade biológica, da evolução dos táxons e da modificação de caracteres. O outro objetivo, mais técnico, é desenvolver a habilidade de propor hipótese sobre a evolução de caracteres ou sobre as relações de parentescos entre os membros de um grupo. Eventualmente, o emprego dessa metodologia pode ser o tema central de um projeto de pesquisa (Amorim, 2002).

A ictiofauna de água doce Neotropical é a mais rica de todo o planeta. De acordo com Reis *et al.* (2003), das 13.000 espécies de peixes de água doce estimadas para o planeta, aproximadamente 6.000 espécies encontram-se na região Neotropical, das quais 4.475 são consideradas válidas e cerca de 1.550 são conhecidas, porém ainda não descritas formalmente.

Dentro desse universo de espécies de água doce destacam-se os representantes da superordem Ostariophysi que representam 71% dessa fauna (Reis *et al.*, 2003). A prevalência dos Ostariophysi em ambientes de água doce é uma realidade mundial, uma vez que do total de espécies de peixes de água doce do mundo 75% são Ostariophysi (Fink e Fink, 1981).

1.1 Ordem Characiformes

Entre os Ostariophysi, os Characiformes são peixes exclusivamente de água doce e encontram-se distribuídos nas Américas e na África, atingindo maior diversidade nas principais drenagens neotropicais (Buckup, 1998). Esta ordem compreende atualmente 1.460 espécies divididas em 14 famílias, sendo quatro africanas e as demais neotropicais (Reis *et al.*, 2003). Os Characiformes apresentam uma grande variação na forma corporal, estrutura da mandíbula, dentição e anatomia interna (Vari, 1998). Além disso, nessa ordem são encontrados desde espécies predadoras que alcançam cerca de 100 cm de comprimento total até espécies cujas formas adultas não ultrapassam 15 mm de comprimento total, as chamadas espécies miniaturas (Weitzman e Vari, 1988).

Dentro da ordem Characiformes estão espécies de grande importância ecológica e econômica para o Brasil. Assim, temos muitas espécies utilizadas na pesca comercial, esportiva e na aquicultura como os curimatás (Prochilodontidae), piaparas e piaus (Anostomidae), traíras (Erythrinidae), pacus, tambaquis, dourados e matrinhãs (Characidae), etc. Há ainda um enorme número de espécies, principalmente da família Characidae, exportadas na forma de peixes ornamentais, o que tem gerado importantes divisas para o país, embora tenha causado sérios impactos ambientais (Chao *et al.*, 2001).

Embora muitos grupos dentro da ordem Characiformes tenham sido objetos de vários estudos de taxonomia e sistemática, o conhecimento das relações filogenéticas da maioria de seus táxons é muito restrito. Assim, ainda que a maioria das famílias que compõe a ordem Characiformes já possa ser identificada por caracteres sinapormórficos (ver referências em Reis *et al.*, 2003), os estudos filogenéticos na ordem não são compatíveis com sua importância ecológica e econômica.

1.2 Família Anostomidae

A família Anostomidae compreende 138 espécies descritas e cerca de 25 novas espécies ainda não descritas (Garavello e Britski, 2003), distribuídas em 12 gêneros. Os anostomídeos podem ser distinguidos dos demais characiformes, entre outras características, pelo corpo usualmente alongado, nadadeira anal curta (com menos de 10 raios ramificados, com exceção de *Abramites*), membranas branquiais unidas ao istmo, narina anterior formando um tubo, uma única série de dentes, com três ou quatro dentes, em cada pré-maxilar ou dentário e ausência de dentes no maxilar e no palato (Géry, 1977). As espécies da família são amplamente distribuídas do sul da América Central até o norte da Argentina, exclusivamente na porção cis-andina da América do Sul (Garavello e Britski, 2003).

Vari (1983) estudou as relações entre os Anostomidae, Chilodontidae, Prochilodontidae e Curimatidae e sugeriu que essas quatro famílias formam um grupo monofilético onde Anostomidae e Chilodontidae formam um clado e Curimatidae e Prochilodontidae formam um segundo clado. Quinze sinapomorfias unem Anostomidae e Chilodontidae e quinze sinapomorfias unem os gêneros de Anostomidae (Vari, 1983). As relações entre os gêneros da subfamília Anostominae (*Anostomus*, *Gnathodolus*, *Sartor*, *Synaptolaemus* e *Pseudanos*), que são caracterizados por algumas modificações muito incomuns nas maxilas, foram analisadas por Winterbottom (1980) que mostrou que, *Gnathodolus*, *Sartor* e *Synaptolaemus* são monotípicos e formam em conjunto um grupo monofilético, sendo *Gnathodolus* e *Sartor* mais relacionados entre si. *Pseudanos* é monofilético e *Anostomus* dividi-se em dois grupos de três espécies cada. As relações entre os demais gêneros de Anostomidae ainda não foram estudadas. Além disso, os outros gêneros de Anostomidae, incluindo o gênero *Leporinus*, são pouco compreendidos filogeneticamente e taxonomicamente (Vari, 1983).

1.3 Gênero *Leporinus*

Leporinus Spix, 1829 é um dos gêneros com maior número de espécies entre os Characiformes, junto com *Curimata*, *Prochilodus*, *Hyphessobrycon*, *Hemigrammus*, *Astyanax* e *Moenkhausia*, e um dos menos conhecidos (Géry, 1977), ele é também o gênero com o maior número de espécies da família Anostomidae, com 87 espécies válidas (Garavello e Britski, 2003).

As espécies do gênero *Leporinus* podem ser distinguidas das demais espécies dos outros gêneros da família, por possuírem corpo não muito alto e não comprimido; nadadeira anal com menos de 10 raios ramificados; região ventral posterior as nadadeiras pélvicas não quilhada; maioria das espécies com nado em posição normal (horizontal) (Géry, 1977).

A estreita relação anatômica entre as espécies permite concluir que o gênero *Leporinus* constitui um grupo natural de ampla distribuição (Garavello, 1979).

1.4 Área de Estudo

A bacia do Prata (Figura 1), com aproximadamente 3.100.000 km², tem uma enorme importância econômica e social para o continente sul americano (Tundisi *et al.*, 1999). É formada por grandes rios, dos quais os mais importantes são o Paraná, Uruguai e Paraguai. É a bacia mais populosa da América do Sul, com cerca de 120 milhões de habitantes, grandes áreas metropolitanas e uma grande concentração na sua porção superior (capital de São Paulo e bacia do rio Tietê) (Tundisi *et al.*, 1999). Uma importante característica dessa bacia é seu uso para produção de hidroeletricidade, cujos usos múltiplos tem se intensificado nos últimos anos para ampliar atividades de recreação e turismo, pesca e aquicultura e navegação para transporte de cargas à longa distância (Tundisi *et al.*, 1999). Os rios da bacia apresentam inúmeros problemas, entre eles a erosão, poluição e contaminação e outros impactos como a construção de barragens (Tundisi *et al.*, 1999)

A bacia do São Francisco (Figura 1) é formada pelo rio São Francisco e seus tributários. O rio São Francisco nasce no estado de Minas Gerais, na serra da Canastra a uma altitude de 1.600 m e desloca-se 2.700 km para o Nordeste (Tundisi *et al.*, 1999). A bacia do São Francisco tem aproximadamente 640.000 km², estende-se por regiões com climas úmido, semi-árido e árido (Tundisi *et al.*, 1999). O rio São Francisco tem uma enorme importância regional, e pode ser considerado como um dos principais fatores de desenvolvimento do Nordeste. Os cinco reservatórios construídos em sua extensão produzem energia hidrelétrica e se transformaram em pólos regionais de desenvolvimento, com a intensificação de usos múltiplos nos últimos 10 anos: aquicultura, irrigação, suprimento de água, turismo e recreação, pesca comercial e pesca esportiva (Tundisi *et al.*, 1999).

As bacias do Prata e do São Francisco drenam extensas áreas do Escudo brasileiro. Um estudo realizado por Menezes (1972), envolvendo basicamente a fauna de caracídeos do Brasil, mostrou que há uma maior similaridade entre as faunas das bacias do Prata e São Francisco do que entre essas e as demais bacias hidrográficas do Brasil, sugerindo assim a possível existência de regiões de contato mais recente entre essas bacias do que com as demais bacias hidrográficas brasileiras. Atualmente ainda há, em regiões pantanosas altas de Goiás, áreas de contato entre as bacias do Paraná e São Francisco e entre o São Francisco e Amazonas (Menezes, 1972).

Na revisão mais recente publicada por Garavello e Britski (2003), nove espécies de *Leporinus* são assinaladas para a bacia do Prata (*L. aguapeiensis*, *L. amblyrhynchus*, *L. lacustris*, *L. macrocephalus*, *L. microphthalmus*, *L. octofasciatus*, *L. paranensis*, *L. striatus* e *L. silvestrii*), quatro espécies são assinaladas para a bacia do São Francisco (*L. maculatus*, *L. marcgravii*, *L. reinhardti* e *L. taeniatus*) e duas espécies são assinaladas para ambas as bacias (*L. elongatus* e *L. obtusidens*) (Tabela 1). Em um estudo sobre os peixes do Pantanal Matogrossense, Britski *et al.* (1999), mencionam a existência de seis espécies de *Leporinus*, mas advertem sobre o estado dúbio de vários dos nomes utilizados. Em um estudo conduzido no rio Corumbá, um tributário da bacia do alto rio Paraná, foram identificadas uma espécie de *Leporellus* (*L. vittatus*), uma espécie de *Schizodon* (*S. nasutus*) e oito espécies de *Leporinus* (Avelino, 2000). Três espécies de *Leporinus* não puderam ser identificadas, podendo representar espécies novas para o gênero (Avelino, 2000). Em um estudo sobre os peixes do rio São Francisco, mais especificamente da região de Três Marias, Britski *et al.* (1988) listaram cinco espécies de *Leporinus*: *L. melanopleura*, *L. elongatus*, *L. piau*, *L. reinhardti* e *L. taeniatus*.

Tabela 1. Espécies de *Leporinus* distribuídas nas bacias dos rios Paraná e São Francisco, segundo Garavello e Britski (2003).

Espécie	Localidade Tipo	Distribuição
<i>Leporinus aguapeiensis</i> Campos, 1945	Rio Aguapeí, Estado de São Paulo, Brasil	Bacia do rio Paraná
<i>Leporinus amblyrhynchus</i> Garavello e Britski, 1987	Rio Tietê, Itu, São Paulo, Brasil	Bacia do rio Paraná
<i>Leporinus elongatus</i> Valenciennes, 1850	Rio São Francisco e La Plata, Brasil	Bacias dos rios Paraná, La Plata e São Francisco
<i>Leporinus lacustris</i> Campos, 1945	Pirassununga, Estado de São Paulo, Brasil	Bacia do rio Paraná
<i>Leporinus macrocephalus</i> Garavello e Britski, 1988	Rio Cuiabá, Barão de Melgaço, Mato Grosso	Bacia do rio Paraguai
<i>Leporinus maculatus</i> Muller e Troschel, 1844	Guiana	Rios costeiros das Guianas e bacia do rio São Francisco
<i>Leporinus marcgravii</i> Lütken, 1875	Rio das Velhas e afluentes, Brasil	Bacia do rio São Francisco
<i>Leporinus microphthalmus</i> Garavello, 1989	Rio Araguari, Salto de Nova Ponte, Nova Ponte, Estado de Minas Gerais, Brasil	Bacia do rio Paraná
<i>Leporinus obtusidens</i> (Valenciennes, 1836)	Buenos Aires, Argentina	Bacias dos rios Paraná, La Plata e São Francisco
<i>Leporinus octofasciatus</i> Steindachner, 1915	Joinville, Santa Catarina, Brasil	Rio Cubatão (Norte), Estado de Santa Catarina e bacia do rio Paraná
<i>Leporinus paranensis</i> Garavello e Britski, 1987	Marimbondo, Rio Grande, São Paulo, Brasil	Bacia do rio Paraná
<i>Leporinus reinhardti</i> Lütken, 1875	Rio das Velhas, Minas Gerais, Brasil	Bacia do rio São Francisco
<i>Leporinus striatus</i> Kner, 1858	Irisanga e Caiçara, Mato Grosso, Brasil	Bacias dos rios Orissanga, Paraná e Paraguai
<i>Leporinus silvestrii</i> Boulenger, 1902	Rio Coxipó, Mato Grosso, Brasil	Bacia do alto rio Paraguai
<i>Leporinus taeniatus</i> Lütken, 1875	Rio das Velhas, Minas Gerais, Brasil	Bacia dos rios das Velhas e São Francisco



Figura 1. Mapa das bacias hidrográficas da região Neotropical (1- do Amazonas, 2- do Orenoco, 3- das Guianas, 4- do Magdalena, 5- da Região Costeira Ocidental, 6- do Nordeste, 7- do São Francisco, 8- do Paraná-Paraguai (ou do Prata), 9- da Região Costeira Oriental, 10- da Patagônia). O estudo realizado foi focado nas bacias 7 e 8.

1.5 Estudos Moleculares e Filogenéticos

O estudo das relações entre organismos tem recebido, nos últimos anos, um considerável impulso com o advento das técnicas de seqüenciamento de DNA. Recentemente, vários grupos de pesquisa têm voltado sua atenção para o uso de seqüências de DNA para elucidação das relações filogenéticas entre grupos de organismos. Ainda que até o momento o número de estudos de seqüências de DNA realizados com peixes seja bastante pequeno em relação à extensão do grupo, os resultados já obtidos são promissores (Stock *et al.*, 1991; Kocher e Stepien, 1997; Inoue *et al.*, 2001). No conjunto de trabalhos publicados no livro editado por Kocher e Stepien (1997), pode-se observar o versátil emprego das análises moleculares na elaboração de hipóteses de relacionamento em diversos níveis taxonômicos, variando de populações locais até grandes grupos de peixes.

O genoma animal está distribuído em dois compartimentos celulares: o núcleo e as mitocôndrias. O genoma nuclear apresenta uma extrema complexidade organizacional e um tamanho da ordem de bilhões de pares de bases nitrogenadas enquanto o genoma mitocondrial apresenta alguns poucos genes codificados por algumas dezenas de pares de bases.

Entre os genes mais comumente utilizados em estudos sistemáticos estão os genes mitocondriais. O tamanho do genoma mitocondrial (mtDNA) é bastante variável, apresentando valores em torno de 16 quilobases (kb) nos vertebrados até 570 kb em algumas espécies de plantas (Lewin, 1994). Estudos extensivos realizados com o genoma mitocondrial humano mostraram que o mesmo é constituído por 16.569 pares de base, sendo que nesse genoma encontram-se os genes 12S e 16S do rRNA, 22 genes de tRNA, as subunidades I, II e III do citocromo *c*, a subunidade 6 da ATPase, o citocromo *b* e genes para seis subunidades da NADH. Essa mesma constituição foi também encontrada em outros mamíferos, em *Xenopus laevis* (Lewin, 1994) e em várias espécies de peixes (Zardoya e Meyer, 1997; 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 quase que exclusivamente materna e sua presença nos organismos em número haplóide, o que impede (ou torna muito raros) os eventos de recombinação.

O estudo filogenético empregando seqüências parciais ou totais do DNA mitocondrial em peixes é uma realidade bastante atual, o que pode ser confirmado pelo grande número de trabalhos recentemente publicados com essa abordagem (Ikejima *et al.*, 2003; Lussen *et al.*, 2003; Miya *et al.*, 2003; Obermiller e Pfeiler, 2003; Banford *et al.*, 2004; Casey *et al.*, 2004; Doadrio e Dominguez, 2004; Inoue *et al.*, 2004; Mattern, 2004; Shimabukuro-Dias *et al.*, 2004; entre muitos outros).

O uso de genes nucleares na elaboração de filogenias é bastante útil quando o tempo de divergência dos grupos é elevado, uma vez que esses genes evoluem muito mais lentamente do que os genes mitocondriais (Stepien e Kocher, 1997; Ortí, 1997).

O número de estudos publicados que usam genes nucleares em estudos filogenéticos ainda é pequeno em relação ao número daqueles que utilizam genes mitocondriais. Contudo, diversos trabalhos têm sido publicados nos últimos anos mostrando a utilidade desses genes em estudos de diversos grupos de peixes (Ortí e Meyer, 1996; Ortí, 1997; Lovejoy e Collete, 2001; Crespi e Fulton, 2004; Hardman, 2004; Near *et al.*, 2004; Moyer *et al.*, 2004; Quenouille *et al.*, 2004; Rüber *et al.*, 2004; Calcagnotto *et al.* 2005) e espera-se que nos próximos anos muitas filogenias baseadas em genes nucleares estejam disponíveis.

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 elaboração de hipóteses sobre os padrões evolutivos seguidos por outros caracteres, que por sua vez apresentam menor possibilidade de interpretação filogenética. Um exemplo desse tipo de utilização de dados de mtDNA está no trabalho de Alves-Gomes *et al.* (1995), onde a filogenia dos peixes da ordem Gymnotiformes foi reconstruída, tendo como base dados de mtDNA (parte das subunidades 12S e 16S do rRNA), assim como dados de morfologia e eletrofisiologia. No trabalho citado, os dados moleculares serviram para elaboração de uma nova hipótese filogenética, que se mostrou mais congruente com a possível evolução morfológica e fisiológica dos peixes desse grupo, permitindo inclusive aos autores a proposição da criação de uma nova família para essa ordem. Também 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 Aplocheilidae (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).

2. OBJETIVOS

O presente projeto teve como objetivos:

1 – Seqüenciar segmentos do genoma mitocondrial e nuclear de exemplares do gênero *Leporinus* que ocorrem nas bacias do Prata e do São Francisco e de grupos externos significativos (principalmente da família Anostomidae), com o propósito de obter dados suficientes para elaborar uma hipótese sobre as relações entre as espécies estudadas.

2 – Estudar a biogeografia histórica dos táxons analisados, combinando informações sobre a distribuição de espécies com as filogenias obtidas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Foram utilizadas 17 espécies de *Leporinus* (67 amostras) como grupo interno, sendo 42 amostras do rio Paraná, 10 amostras do rio Paraguai, uma amostra do rio Uruguai, nove amostras da bacia do rio São Francisco, uma amostra do Amazonas, duas amostras do Orinoco e duas amostras da região costeira oriental (Tabela 2). Como grupo externo foram utilizadas duas espécies de Anostomidae do gênero *Schizodon* e duas espécies de Chilodontidae: *Caenotropus labirinthycus* e *Chilodus punctatus* (Tabela 2). As localidades de coleta estão assinaladas na Figura 8.

Das espécies assinaladas para as bacias do Prata e São Francisco, (Tabela 1) segundo Garavello e Britski (2003), apenas três espécies de *Leporinus* não foram coletadas e incluídas nas análises, *Leporinus aguapeiensis*, *Leporinus maculatus* e *Leporinus marcgravii*.

Estudos recentes têm levantado dúvidas com relação à correta identificação taxonômica das espécies *Leporinus obtusidens* e *L. elongatus* (Heraldo A. Britski, comunicação pessoal). *L. obtusidens* foi descrita originalmente por Valenciennes em 1836, como *Curimatus obtusidens*, e sua localidade tipo foi assinalada para Buenos Aires (Argentina). *L. elongatus* foi descrita por Valenciennes em 1850, e sua localidade tipo foi assinalada para o rio São Francisco e a bacia do Prata. A imprecisão das localidades tipo dessas espécies, associado a problemas de identificação das mesmas, torna quase impossível o uso desses nomes. Por outro lado, na bacia do rio Paraná é de conhecimento comum a presença de duas formas, chamadas popularmente de “piapara” e “piaçu” (ou “piavuçu”), comumente associadas aos nomes *L. elongatus* e *L. obtusidens*, respectivamente. Assim, no início desse estudo foram utilizados os nomes populares para identificação dos indivíduos dessas duas possíveis espécies. Na atual fase desse estudo, seguindo orientação do Dr. Heraldo A. Britski, optou-se por empregar a designação *Leporinus* cf. *obtusidens* para todos os exemplares identificados como piaçu e piapara. Para distinção entre essas duas possíveis formas acrescentou-se um sufixo “A” para as piarapas e um sufixo “B” para os piaçus. Nas Figuras 2, 3, 4 e 5 são apresentados exemplares de piarapas, na Figura 6 é apresentado um exemplar de piaçu e na

Figura 7 um exemplar de *Leporinus silvestrii* para comparação. Uma discussão mais ampla dessa questão taxonômica é apresentada no item Discussão.



Figura 2. Piapara, *Leporinus cf. obtusidens* A, coletada no rio Mogi-Guaçu (Bacia do Prata). Comprimento padrão 230,0 mm.



Figura 3. Piapara, *Leporinus cf. obtusidens* A, coletada na Represa de Três Marias (Bacia do rio São Francisco). Comprimento padrão 270,0 mm.



Figura 4. Piapara, *Leporinus cf. obtusidens* A, coletado no rio Uruguai (Bacia do Prata) . Comprimento padrão 280,0 mm.



Figura 5. Piapara, *Leporinus cf. obtusidens* A, coletado no rio Jacui (Região costeira oriental). Comprimento padrão 240,0 mm.



Figura 6. Piaçu, *Leporinus cf. obtusidens* B, coletado no rio Tietê (Bacia do Prata). Comprimento padrão 270,0 mm.



Figura 7. Exemplar de *Leporinus silvestrii*, coletado no rio Cuiabá (Bacia do Prata). Comprimento padrão 230,0 mm.

Dos exemplares utilizados no presente estudo foram extraídas amostras de tecidos para isolamento de DNA (preservadas em etanol 95%) e os exemplares foram fixados em formol 10% e conservados em etanol 70%. Os animais analisados estão depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil. Os peixes tiveram sua identificação realizada pelo Dr. Heraldo A. Britski do Museu de Zoologia da USP (MZUSP).

Tabela 2. Relação de exemplares utilizados nas análises filogenéticas e seus respectivos dados sobre localidade de coleta. Códigos das localidades: Rio Paraná – PA (Ayolas – PA-1, Paranapanema – PA-2, Tiete – PA-3, Mogi-Guaçu – PA-4, Rio Novo – PA-5, Rio Montividiu – PA-6); Rio Paraguai – PY (Poconé – PY-1, Rio Cuiabá – PY-2, Rio Taquari – PY-3); Rio Uruguai – UY; Rio São Francisco – SF (Represa de Três Marias – SF-1, Rio Picão – SF-2, Ribeirão Santo Inácio – SF-3); Amazonas – AM (Rio Araguaia – AM); Orinoco – OR; Região costeira oriental – EC (Rio Jacuí – EC-1, Rio Paraíba do Sul, Lagoa Feia – EC-2).

Espécie	Lote	Localidade	Código	Latitude/ Longitude	
<i>Leporinus amblyrhynchus</i>	3505	Rio Itararé/Rio	PA-2	S 23°24'44.9"	
		Paranapanema/Fartura/SP		W 49°34'15.4"	
	3917	Reservatório de Chavantes/Rio	PA-2	S 23°08'01.1"	
		Paranapanema/Chavantes/SP		W 49°40'34.4"	
	<i>Leporinus cf. obtusidens A</i>	250	Rio São Francisco/Três Marias/MG	SF-1	S 18°11,475' W 45°14,857'
		2199/3304	Rio Tietê/Rio Paraná/Botucatu, SP	PA-3	S 22°37'55.7" W 48°10'30.2"
	2505	Rio Mogi-Guaçu/Rio	PA-4	S 21°55'37.6" W 47°22'04.4"	
	3912	Reservatório de Jurumirim/Rio	PA-2	S 23°20'	
		Paranapanema/Itatinga, SP		W 48°34'	
<i>Leporinus cf. fasciatus</i>	3077	Rio Orinoco/Rio Orinoco/Caicara del	OR	N 07°38'11.6" W 66°19'04.2"	
<i>Leporinus friderici</i>	655	Região de Rombado, afluyente rio	PY-1	S 16°25,680' W 56°25,143'	
	3179	Reservatório de Jurumirim/Rio	PA-2	S 23°20' W 48°34'	
<i>Leporinus lacustris</i>	857	Rio Mogi-Guaçu/Rio	PA-4	S 21°55'37.6" W 47°22'04.4"	
		Paraná/Pirassununga/SP			
	2340	Rio Tietê/Rio do Peixe/Rio	PA-3	S 19°34,630' W 57°01,123'	
		Paraná/Bofete/SP			
<i>Leporinus macrocephalus</i>	4058	Região de Rombado, afluyente rio	PY-1	S 16°25,680' W 56°25,143'	
		Pirai/Poconé, MT			
	1422	Rio Taquari/Rio Paraguai/Coxim, MS	PY-3	S 18°25'42,5" W 54°50'02,8"	

Tabela 2. Continuação...

<i>Leporinus microphthalmus</i>	2491	Rio Montividiu/Rio Paraná/Montividiu/GO	PA-6	S 15°53'35.2" W 52°15'00.9"
<i>Leporinus cf. obtusidens</i> B	2509	Rio Paraná/Ayolas/Misiones/Paraguai	PA-1	S 27°23' W 56°53'
	2704	Rio Tietê/Rio Paraná/Botucatu, SP	PA-3	S 19°34,630' W 57°01,123'
	2706/3303	Rio Tietê/Rio Paraná/Botucatu, SP	PA-3	S 22°37'55.7" W 48°10'30.2"
	2838	Rio Jacuizinho/Rio Jacuí/Jacuí/RS	EC-1	S 29°21'00" W 53°13'44"
	2839	Lagoas Marginas Rio Ibicuí/Rio Uruguai/Uruguiana/RS	UY	S 29°24'00" W 56°42'00"
<i>Leporinus octofasciatus</i>	3939	Rio Paranapanema/Rio Paraná/Chavantes/SP	PA-2	S 23°08'01.1" W 49°40'34.9"
<i>Leporinus paranensis</i>	3808	Rio Novo/ Rio Paranapanema/ Avaré/SP	PA-2	S 23°01'26.2" W 48°49'32.6"
<i>Leporinus piau</i>	260	Represa de Três Marias/Três Marias - MG	SF-1	S 18°13,661' W 45°14,857'
<i>Leporinus reinhardti</i>	259	Represa de Três Marias/Três Marias - MG	SF-1	S 18°13,661' W 45°14,857'
<i>Leporinus silvestrii</i>	2745	Rio Cuiabá/ Rio Paraguai/ Cuiabá/MT	PY-2	S.15°52'17,82" W 56°64'40,76"
<i>Leporinus steindachneri</i>	2380	Lagoa Feia/Rio Paraíba do Sul/Leste/Campos dos Goytacazes/RJ	EC-2	S 22°00' W 41°20'
<i>Leporinus striatus</i>	1482	Rio Taquari - Pesqueiro Recanto Alegre/Rio Paraguai/Coxim/MS	PY-3	S 18°25'42.5" W 54°50'02.8"
	2736	Reservatório de Jurumirim/Paranapanema/SP	PA-2	S 23°20' W 48°34'
<i>Leporinus taeniatus</i>	261	Represa de Três Marias/Três Marias - MG	SF-1	S 18°13,661' W 45°14,857'
	329	Ribeirão Santo Inácio/Rio São Francisco/Moema/MG	SF-3	S 19°52,654' W 45°26,077'
<i>Leporinus sp.</i>	1805	Afluente córrego Fogaça/Rio Araguaia/Barra do Garças/MT	AM	S 15°40'53.9" W 52°13'21.4"

Tabela 2. Continuação...

<i>Schizodon intermedius</i>	656	Região de Rombado, afluyente rio Pirai/ Poconé, MT	PY-1	S 16°25,680' W 56°25,143'
	253	Rio São Francisco/ Três Marias - MG	SF-1	S 18°11,475' W 45°14,857'
	3305	Rio Tietê/ Rio Paraná/ Botucatu, SP	PA-3	S 22°37'55.7" W 48°10'30.2"
<i>Schizodon sp.</i>	277	Laguna de Castilleros/ Rio Orinoco/ Caicara del Orinoco /Bolívar/ Venezuela	OR	N 07°30'50,9" W 66°09'19,8"
<i>Caenotropus labyrinthicus</i>	1828	Rio Araguaia/ Rio Amazonas/ Aragarças/GO	AM	S 15°53'35.6" W 52°15'01.0"
<i>Chilodus punctatus</i>	2713	Aquário		

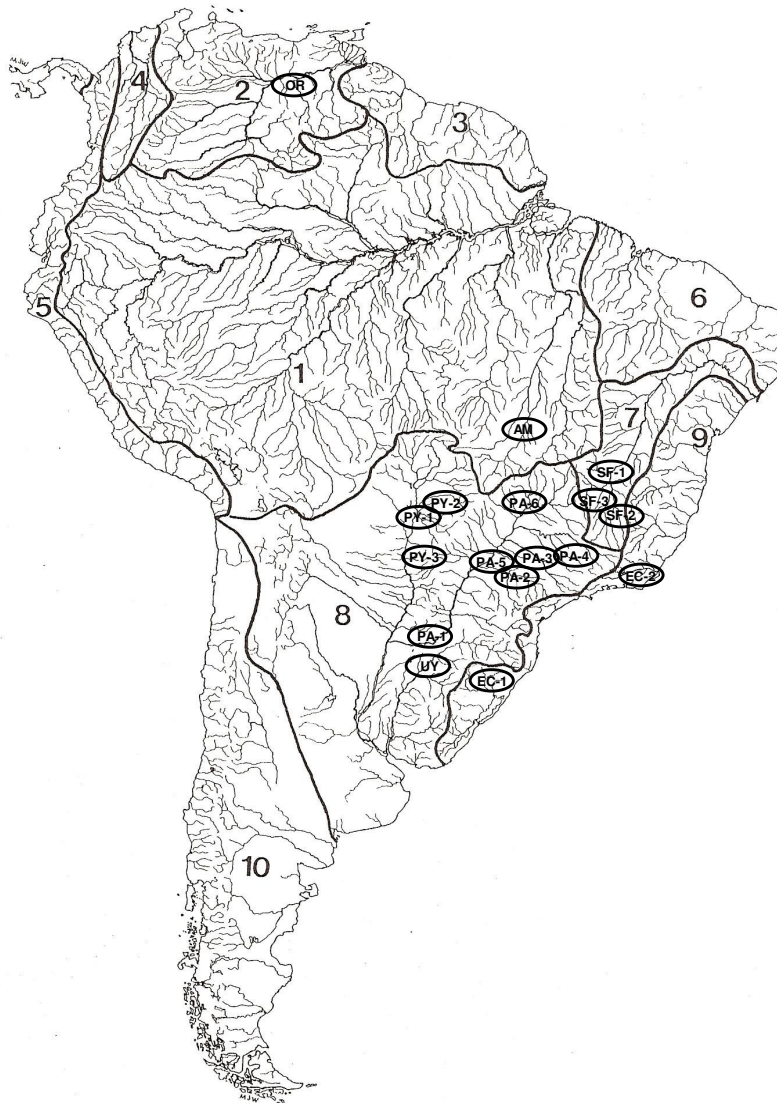


Figura 8. Localidades de coleta das amostras analisadas. Códigos das localidades: Rio Paraná – PA (Ayolas – PA-1, Paranapanema – PA-2, Tiete – PA-3, Mogi-Guaçu – PA-4, Rio Novo – PA-5, Rio Montividiu – PA-6); Rio Paraguai – PY (Poconé – PY-1, Rio Cuiabá – PY-2, Rio Taquari – PY-3); Rio Uruguai – UY; Rio São Francisco – SF (Represa de Três Marias – SF-1, Rio Picão – SF-2, Ribeirão Santo Inácio – SF-3); Amazonas – AM (Rio Araguaia – AM); Orinoco – OR; Região costeira oriental – EC (Rio Jacuí – EC-1, Rio Paraíba do Sul, Lagoa Feia – EC-2).

3.2 Métodos

A seqüência dos trabalhos práticos foi de extração, amplificação, seqüenciamento e análise do DNA.

3.2.1 Extração de DNA

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

3.2.1.1 Extração de DNA com Fenol

Essa técnica foi baseada no protocolo de Sambrook e Russel (2001). Os procedimentos são:

1 - Fragmentar o tecido (entre 1 e 10 mg) em cadinho de porcelana com macerador em 500µl de solução de digestão [80,0µl de NaCL 5M, 20,0µl de Tris HCL 2M, 200,0µl EDTA 0,5M e 200,0µl de SDS 10%], 40,0µl de Proteinase K (10mg/ml) e 3440,0µl de água ultrapura. Incubar a 50°C por 4 horas;

2 - Acrescentar uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) pH=8,0, dobrando o volume;

3 - Homogeneizar agitando por 15 minutos;

4 - Centrifugar por 15 minutos a 14.000 rpm;

5 - Quando necessário, para uma maior pureza, repetir os três itens anteriores;

6 - Retirar o sobrenadante e transferir para um outro tubo limpo;

- 7** - Precipitar com 1/10 do volume de NaCl 5M mais dois volumes de etanol 100% (-20°C);
- 8** - Centrifugar por 30 minutos a 14.000 rpm e descartar o sobrenadante;
- 9** - Adicionar 1000µl de etanol 70% (-20°C) e centrifugar por 15 minutos a 14000 rpm;
- 10** - Descartar o sobrenadante;
- 11** - Secar em estufa a 37°C por 30 minutos;
- 12** - Eluir em 200µl de água ultrapura autoclavada por no mínimo 12 horas;
- 13** - Adicionar 1,5µl de RNase (10mg/ml) em cada amostra e incubar a 37°C por uma hora, seguido de uma nova incubação a 65°C durante 10 minutos.

3.2.1.2 Extração de DNA com Tampão de extração

Essa técnica foi baseada no protocolo de Aljanabi e Martinez (1997). Os procedimentos são:

- 1** - Colocar em um tubo de 1,5ml, 290µl de tampão de extração (30mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 1% SDS), 10µl de Proteinase K (10mg/ml) e um pedaço de tecido (cerca de 10,5mg);
- 2** - Deixar em banho-maria à 55°C por 2 a 3 horas;
- 3** - Acrescentar 100µl de solução de NaCl 5M e misturar bem, invertendo o tubo vagorosamente;
- 4** - Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente;
- 5** - Remover 300µl de sobrenadante e transferir para um novo tubo de 1,5ml;

- 6 - Adicionar 600µl de etanol 100%;
- 7 - Deixar no ultrafreezer (-70°C) por 20 minutos;
- 8 - Centrifugar a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C;
- 9 - Descartar o etanol;
- 10 - Adicionar 1000µl de etanol 70%;
- 11 - Centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C;
- 12 - Descartar o etanol;
- 13 - Secar em estufa a 37°C por 20 a 30 minutos;
- 14 - Adicionar 200µl de água ultrapura autoclavada;
- 15 - Deixar hidratando a temperatura ambiente por 24 horas;
- 16 - Aliquotar 150µl para guardar no freezer -20° (solução estoque) e o restante manter na geladeira 4°C (solução de uso).

3.2.2 Amplificação e limpeza dos fragmentos

A amplificação foi efetuada num ciclador térmico de PCR utilizando-se 25,0µl de uma solução contendo 16,5µl de água destilada, 2,5µl de dNTP (8mM), 2,5µl de tampão 10X , 1,2µl de cada primer (10µM) e 0,1µl de DNA Polymerase (1 unidade) e 1,0µl de amostra de DNA, quando necessário a utilização de MgCl a quantidade foi retirada da água (0,5 a 1,0µl). Os primers utilizados e as condições de PCR estão listados nas Tabelas 3 e 4 respectivamente.

A posição dos fragmentos dos genes mitocondriais utilizados estão contidos na Tabela 5, para tanto foi utilizado o genoma mitocondrial completo de *Cyprinus carpio* (16.575 pb) – número de acesso no GenBank (X61010). Um esquema do

genoma mitocondrial de vertebrados é apresentado na Figura 9, com a posição dos fragmentos dos genes utilizados marcados com setas. A posição dos primers (TropF e TropR), utilizados para amplificação de um fragmento do gene nuclear Trop (α -tropomiosina) está ilustrado na Figura 10, sendo utilizado para isso um segmento do DNA genômico de *Danio rerio* – número de acesso no GenBank (AL845510).

Tabela 3. Relação dos primers utilizados para amplificação de parte dos genes mitocondriais e nuclear. 16S = gene ribossômico 16S (mitocondrial); Cyt b = citocromo B (mitocondrial); Fish = citocromo oxidase I (mitocondrial); Trop = α -tropomiosina (nuclear).

Gene	Seqüência dos primers	Referência
16S F 16S R	ACG CCT GTT TAT CAA AAA CAT CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T	Kocher <i>et al.</i> (1989)
Cyt b L 14841 Cyt b H 15915	AAA AAG CTT CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA AAC TGC CAG TCA TCT CCG GTT TAC AAG AC	Kocher <i>et al.</i> (1989)
Fish F1 Fish R1	TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG GAA TCA	Ward <i>et al.</i> (2005)
TROP F TROP R	CCA CTG CCC TGC AGA AGC TGG AGG A CTC CTC AGT ACG CTC CAG CTC ACC CTC A	Calcagnoto <i>et al.</i> (2005) Presente estudo

Tabela 4. Condições da reação de PCR.

Primer	Denaturação (95°C)	Ciclos	Extensão
16S	5 min	30x 95°C/30 s, 50°C/45 s, 68°C/45 s	68°C/7 min
Cyt b	5 min	30x 95°C/30 s, 48-50°C/45 s, 68°C/2 min	68°C/7 min
Fish	5 min	30x 95°C/30 s, 48-50°C/45 s, 68 e 72°C/45 s	68 e 72°C/7 min
TROP	5 min	30x 95°C/30 s, 55°C/45 s, 72°C/1:30 min	72°C/7 min

Tabela 5. Posição dos fragmentos dos genes utilizados, no genoma mitocondrial completo de *Cyprinus carpio* (carpa) – número de acesso no GenBank (X61010)

Gene	Posição do gene	Posição do primer (Foward)	Posição do primer (Reverse)	Tamanho do fragmento amplificado (em pares de base)
16S	2021-3701	2919	3542	623
Citocromo b	15293-16432	15357	16495	1138
Citocromo oxidase I	6399-7949	6432	7138	706

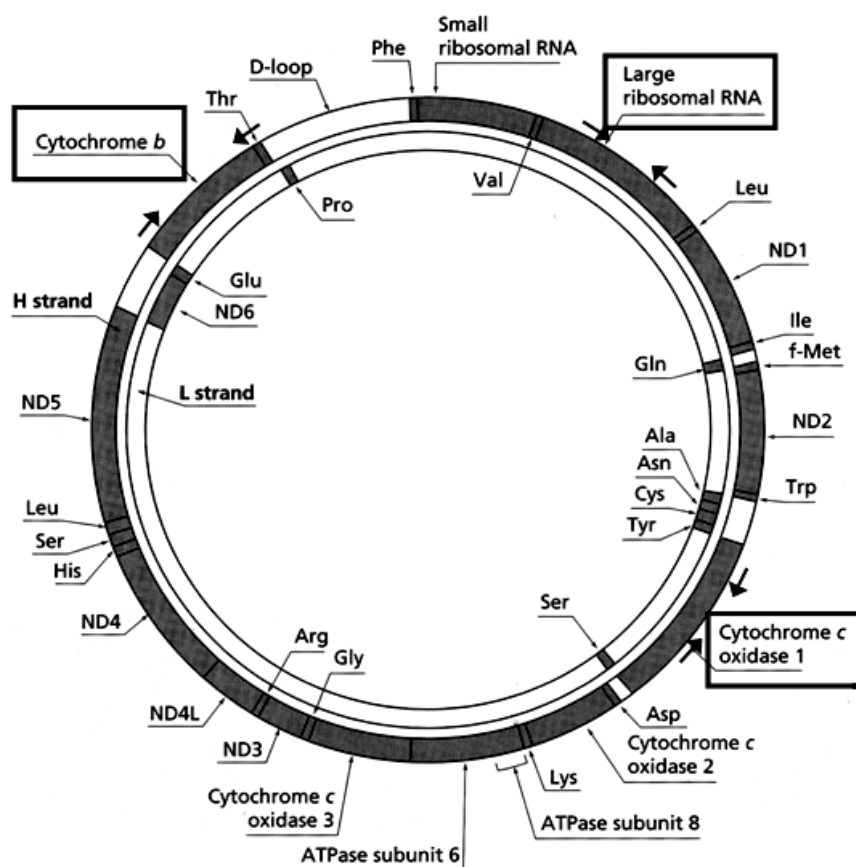


Figura 9. Esquema do genoma mitocondrial completo de vertebrados. As flechas indicam a posição dos primers utilizados para amplificação dos genes analisados.

```

    Intron 3
54361 tcaaactaca taaaaaata ttacgatgta aactttagaa acaggattag tgggtgtggct

54421 taagggtagt ttaggatcaa cagtataatt ataaatgtaa ctacatgaat tagttacatt
54481 aattatttca cacaggtatt ttaagggat agttcaccca aaaatgaaaa ttctgtcatc
54541 atttaccctt cctccacttg ttccaaacct gtttaagttt cttccgtaa acacaaataa
54601 agatagtctg aggtttagg aaaaaactgc cattgacttc catagtattt ttttgctct
54661 acaatggata tcgaaggttg ttttttctga cattcttcag actatcttca tttgtgttca
54721 actctctaaa aacactagaa gctatctctt tatgtgaaat gaacaaagta agcgcactgt
54781 atcaaatgat acatgtaagt gttagtatat acatttagta agcctcatga tattccggaa
    Exon 4
54841 gcatttataa catccaaacc catctgttgt gtctctcaga ggcatgaagg tcattgagaa
54901 cagggcctg aaggatgagg agaagatgga gctgcaggag atccagttga aggaggccaa
    Intron 4
54961 gcacattgct gaggaggctg atcgcaagta tgaggaggtc agttttctct ctttcttata
55021 aaccattata ctctaaacgg atcatttcca acaataaca gtgatgtaaa caagtacact
    Exon 5
55081 taaactcctt gtgatggtgt acaggtggcc cgtaagetgg tgattgttga ggggtgagctg
    Intron 5
55141 gagcgtactg aggaagcgcgc tgagctcaat gaggggtaaa tactaactat ttaacaatat

```

Figura 10. Mapa mostrando as posições dos primers TropF (ínton 3) e TropR (éxon 5) em um segmento do DNA genômico de *Danio rerio* (número de acesso: Genbank AL845510).

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

Os géis de agarose foram fotografados e digitalizados pelo programa da Kodak “Electrophoresis Documentation and Analysis System 120”.

A quantificação foi realizada através da comparação do produto de PCR em gel de agarose 1% com o do *ladder* “Low DNA Mass” que possui peso molecular conhecido.

Para purificação dos produtos da reação de PCR foram utilizados três protocolos:

3.2.2.1 Purificação do DNA

O DNA foi purificado utilizando o Kit *GFX™ PCR Gel Band Purification* (Amershan Biosciences), segundo especificação do fabricante.

1 - Adicionar 500µl de *Capture Buffer* no produto amplificado (100µl);

2 - Misturar no vórtex;

3 - Transferir a amostra para a coluna GFX;

4 - Centrifugar a 16.000 rpm por 1 minuto;

5 - Descartar o material que passou pelo tubo (líquido), colocar a coluna GFX novamente no tubo de coleta (mesmo tubo);

6 - Adicionar 500µl de *Wash Buffer* (já com etanol) à coluna e centrifugar a 16.000 rpm por 1 minuto;

7 - Descartar o tubo coletor e transferir a coluna GFX para um eppendorf de 1,5ml limpo, esperar 5 minutos a temperatura ambiente (secar em volta da coluna para eliminar resíduos de álcool);

8 - Aplicar 50µl de água ultrapura para eluir, diretamente no topo da coluna;

9 - Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente;

10 - Centrifugar por 1 minuto a 16.000 para recolher o DNA purificado.

3.2.2.2 Protocolo de limpeza utilizado para método de extração salina

Esta técnica foi baseada no protocolo utilizado por Travis Glenn (disponível no endereço http://www.uga.edu/srel/DNA_Lab/PEG_Precip'00.rtf).

1 - Adicionar 25µl de polietileno glicol (PEG) 20%-NaCl 2,5M ao produto de PCR amplificado (25µl);

2 - Misturar com a pipeta várias vezes;

3 - Colocar a 37°C em estufa ou termociclador por 15 minutos;

4 - Centrifugar a 14.000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente;

5 - Sugar o sobrenadante;

- 6** - Adicionar 63µl de álcool etílico 80% e esperar 2 minutos;
- 7** - Centrifugar a 14.000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente;
- 8** - Sugar o sobrenadante;
- 9** - Adicionar 63µl de álcool etílico 80% e esperar 2 minutos;
- 10** - Centrifugar a 14.000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente;
- 11** - Sugar o sobrenadante;
- 12** - Secar em estufa a 37°C por cerca de 10 minutos;
- 13** - Eluir em TE (100mM Tris-CL – pH 8.0 e 10mM EDTA – pH 8.0) adicionando 12,5µl e aguardar pelo menos 30 minutos antes de utilizar o produto limpo.

3.2.2.3 Limpeza com o kit ExoSAP-IT

Segundo especificações do fabricante (USB Corporation), para cada 5µl do produto a ser purificado utilizou-se 0,1µl de Exonuclease e 2µl de Fosfatase.

Programa utilizado no termociclador:

- 1** - 37°C por 15 minutos;
- 2** - 80°C por 15 minutos;

3 - 4°C infinito.

Do produto purificado, utilizou-se 1µl para a reação de PCR de seqüenciamento.

3.2.3 Reação de seqüenciamento e limpeza

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

A reação de seqüenciamento seguiu os seguintes parâmetros: um ciclo inicial a 95°C por 2 minutos e 25 ciclos com 95°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 2 minutos. A reação foi realizada no mesmo termociclador utilizado na reação de amplificação.

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

3.2.3.1 Limpeza dos fragmentos marcados

1 - Adicionar 1,0µl de acetato de sódio 1,5M/EDTA 250mM a cada tudo;

2 - Adicionar 80µl de etanol 95% para cada reação e misturar bem utilizando o vórtex;

3 - Centrifugar a 16.000 rpm por 20 minutos a 4°C;

4 - Remover o sobrenadante por aspiração;

5 - Adicionar 400µl de etanol 70%;

6 - Centrifugar a 16.000 rpm por 10 minutos a 4°C;

7 - Remover o sobrenadante por aspiração;

8 - Deixar secar na estufa a 37°C por 30 minutos, protegido da luz.

3.2.4. Alinhamento das seqüências e análise filogenética

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

A variação e o padrão de substituição de nucleotídeos e a distância genética foram examinadas utilizando-se o programa MEGA 3.1 (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 com o 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 em máxima parcimônia (MP) foram realizadas com o Programa PAUP* versão beta 4.0b10 (Swofford, 2002) e TNT (Goloboff *et al.*, 2006). As filogenias obtidas foram testadas utilizando o método de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) e o índice de decaimento de Bremer (Bremer, 1988). As análises probabilísticas (bayesianas) foram realizadas com o programa MrBayes 3.1 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001).

As árvores de consenso foram produzidas com o 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)

4. RESULTADOS

Foram seqüenciados segmentos dos genes mitocondriais 16S rRNA, citocromo b e citocromo oxidase I e do gene nuclear α -Tropomiosina. As amostras seqüenciadas estão apresentadas na Tabela 6. O alinhamento final resultou em uma matriz com 2585 caracteres (Anexo).

Tabela 6. Amostras seqüenciadas no presente estudo. 16S = gene rRNA ribossômico 16S; Cyt b = citocromo B; COI = citocromo oxidase I; Trop = α -tropomiosina.

Espécies	Lote	Registro	Genes			
			16S	Cyt b	Fish	Trop
<i>Leporinus amblyrhynchus</i>	3505	20121	ok	ok	ok	ok
		21828	ok	ok	ok	ok
	3917	21829	ok		ok	ok
		21830	ok	ok	ok	ok
<i>Leporinus cf. obtusidens A</i>	250	4211	ok	ok	ok	ok
		4212	ok	ok	ok	ok
	2199	15586	ok	ok	ok	ok
		19470	ok	ok	ok	ok
	3304	19848	ok	ok	ok	ok
		19849	ok	ok	ok	ok
		19853	ok	ok	ok	ok
		19855	ok	ok	ok	ok
	2505	9654	ok	ok	ok	ok
	3912	16872	ok	ok	ok	ok
<i>Leporinus cf. fasciatus</i>	3077	19698	ok	ok	ok	
		19699	ok		ok	
<i>Leporinus friderici</i>	655	8087	ok	ok	ok	ok
	3179	16873	ok	ok	ok	ok
<i>Leporinus lacustris</i>	857	9055	ok	ok	ok	ok
		9059	ok	ok	ok	ok
		2340	15940	ok	ok	
	4058	15941	ok	ok	ok	
		8086	ok	ok	ok	ok
<i>Leporinus macrocephalus</i>	1422	12505	ok	ok	ok	ok
		19492		ok	ok	ok
		19493	ok	ok	ok	ok
<i>Leporinus microphthalmus</i>	2491	16370	ok	ok	ok	
<i>Leporinus cf. obtusidens B</i>	2509	9917	ok	ok	ok	ok
		9923	ok	ok	ok	ok
		9932	ok	ok	ok	
		9935	ok	ok	ok	
		9936	ok	ok	ok	ok
		9938	ok	ok	ok	
		9939	ok	ok	ok	ok
		9945	ok	ok	ok	ok
	2704	9218	ok	ok	ok	ok
		9227	ok	ok	ok	ok
		9232	ok	ok	ok	ok
		9233	ok	ok	ok	ok
		9236	ok	ok	ok	ok
	2706	15587	ok	ok	ok	
	3303	19851	ok	ok	ok	ok
		19854	ok	ok	ok	ok
	2838	17676	ok	ok	ok	ok
2839	17677	ok	ok			

Tabela 6. Continuação...

Espécies	Lote	Registro	Genes			
			16S	Cyt b	Fish	Trop
<i>Leporinus octofasciatus</i>	3939	19827	ok	ok	ok	
		19828	ok	ok	ok	ok
<i>Leporinus paranensis</i>	3808	21936	ok	ok	ok	ok
		21937	ok	ok	ok	ok
		21939	ok	ok		ok
		21940	ok			ok
<i>Leporinus piau</i>	260	4161	ok	ok	ok	ok
		4162	ok	ok	ok	ok
<i>Leporinus reinhardti</i>	259	4163	ok	ok	ok	ok
		4156	ok	ok	ok	ok
<i>Leporinus silvestrii</i>	2745	18008	ok	ok	ok	ok
		18009	ok	ok	ok	ok
		18011	ok		ok	ok
		18012	ok	ok	ok	ok
<i>Leporinus steindachneri</i>	2380	16074	ok	ok	ok	ok
<i>Leporinus striatus</i>	1482	12708	ok	ok	ok	ok
	2736	16871	ok	ok	ok	ok
		17483	ok	ok	ok	ok
<i>Leporinus taeniatus</i>	261	4174	ok	ok	ok	ok
	329	4250	ok	ok		ok
		4281	ok	ok		ok
<i>Leporinus sp.</i>	1805	13060	ok	ok	ok	ok
<i>Schizodon intermedius</i>	656	8077	ok	ok	ok	ok
		8078	ok	ok	ok	ok
	253	4266	ok	ok	ok	
		4268	ok	ok	ok	ok
	3305	19845	ok	ok	ok	ok
		19846	ok	ok	ok	
		19847		ok	ok	ok
		13298	ok	ok	ok	
<i>Schizodon sp.</i>	277	15558	ok		ok	ok
		15559	ok	ok	ok	ok
<i>Caenotropus labyrinthicus</i>	1828	12912	ok	ok	ok	ok
		12913	ok		ok	ok
<i>Chilodus punctatus</i>	2713	17473	ok		ok	
		17474	ok		ok	

4.1 Gene 16S rRNA

Foram obtidas seqüências do gene mitocondrial 16S rRNA de 66 exemplares de 17 espécies de *Leporinus* e de espécies utilizadas como grupos externos: *Schizodon intermedius*, *Schizodon* sp., *Caenotropus labirinthycus* e *Chilodus punctatus*. O tamanho das seqüências do gene 16S rRNA variou de 497 pb em *Schizodon* sp. (animal 15559) a 525 pb em *Schizodon intermedius* (animais 8077 e 8078) e *Leporinus* sp. (animal 19129), com um valor médio de 521 pb. Após o procedimento de alinhamento e correção manual desse alinhamento, obteve-se uma matriz com 533 caracteres dos quais 351 foram conservados, 179 foram variáveis e 135 foram filogeneticamente informativos para as análises de parcimônia. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 2,6. A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 31,7% de adenina (A), 23,8% de citosina (C), 22,8% de guanina (G) e 21,8% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de $d = 0,052 \pm 0,005$, segundo o modelo da distância p (Nei e Kumar, 2000).

Uma análise gráfica da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo de distância p indica que não há saturação nestes nucleotídeos (Figura 11).

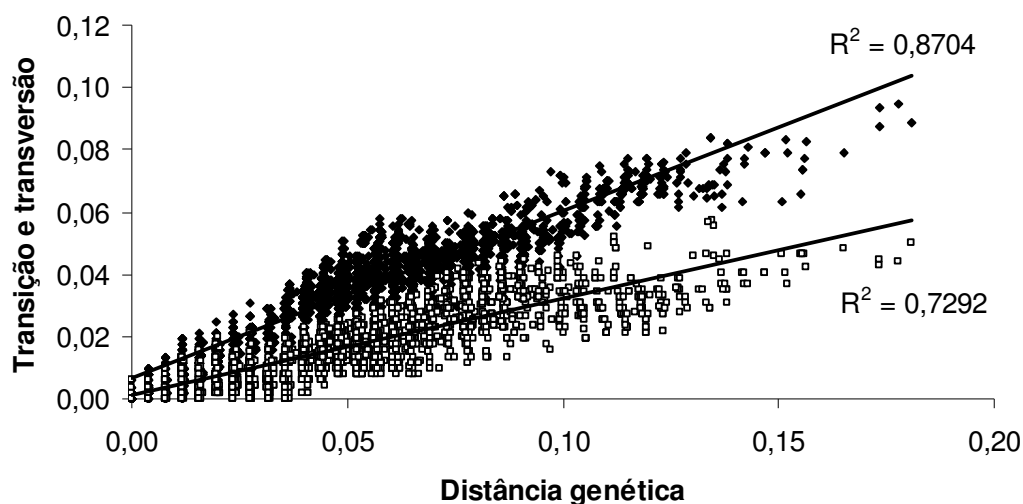


Figura 11. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de distância p , e a freqüência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para o gene 16S.

4.2 Gene Citocromo b

Foram obtidas seqüências do gene mitocondrial Citocromo b de 63 exemplares de 17 espécies de *Leporinus* e de espécies utilizadas como grupos externos: *Schizodon intermedius*, *Schizodon* sp., *Caenotropus labyrinthicus* e *Chilodus punctatus*. O tamanho das seqüências do gene Citocromo b variou de 571 pb em *Caenotropus labyrinthicus* (animal 12912) a 981 pb em *Leporinus amblyrhynchus* (animal 21828), *Leporinus* cf. *obtusidens* A (animais 4212, 9654, 15586, 16872, 19470, 19849, 19853 e 19855), *Leporinus friderici* (animais 8086, 8087 e 16873), *Leporinus lacustris* (animal 15940), *Leporinus macrocephalus* (animal 19493), *Leporinus microphthalmus* (animal 16370), *Leporinus* cf. *obtusidens* B (animais 9236, 9923, 9932, 9935, 9939, 9945, 15587, 17676, 17677 e 19851), *Leporinus paranensis* (animais 21936, 21937 e 21939), *Leporinus piau* (animais 4162, 4163 e 4309), *Leporinus reinhardti* (animais 4156 e 4161), *Leporinus striatus* (animais 12708, 16871, 17483), *Leporinus silvestrii* (animais 18008 e 18012), *Leporinus taeniatus* (animais 4174 e 4281), *Leporinus* sp. (animais 12129 e 13060) e *Schizodon intermedius* (animais 8077, 4268 e 19847) com um valor médio de 971 pb. Após o procedimento de alinhamento e correção manual desse alinhamento, obteve-se uma matriz com 981 caracteres dos quais 455 foram conservados, 526 foram variáveis e 386 foram filogeneticamente informativos para as análises de parcimônia. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 1,1. A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 26,8% de adenina (A), 30,0% de citosina (C), 14,2% de guanina (G) e 29,0% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de $d = 0,124 \pm 0,006$, segundo o modelo da distância p (Nei e Kumar, 2000).

Uma análise gráfica da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo distância p indica que não há saturação nestes nucleotídeos (Figura 12).

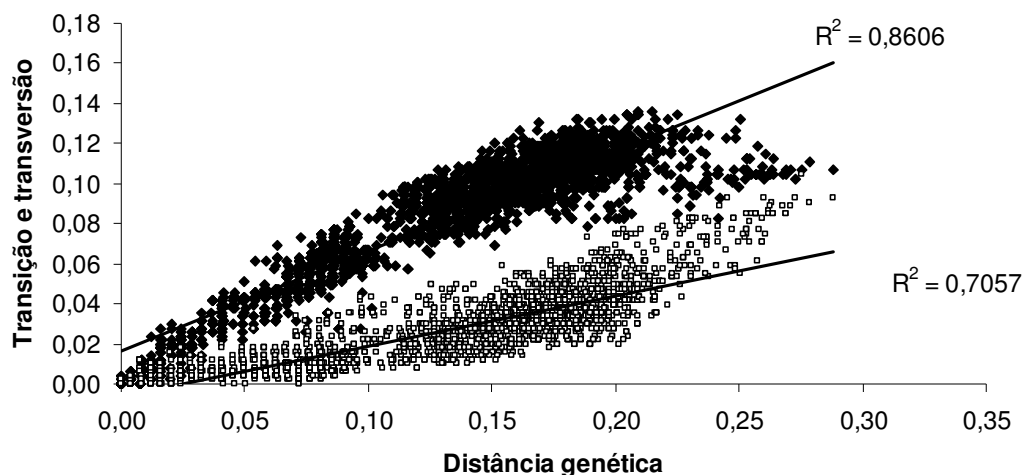


Figura 12. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de distância p , e a frequência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para o gene Citocromo b.

4.3 Gene Citocromo oxidase I

Foram obtidas seqüências do gene mitocondrial Citocromo oxidase I de 61 exemplares de 17 espécies de *Leporinus* e de espécies utilizadas como grupos externos: *Schizodon intermedius*, *Schizodon* sp., *Caenotropus labyrinthicus* e *Chilodus punctatus*. O tamanho das seqüências do gene Citocromo oxidase I variou de 561 pb em *Leporinus* cf. *obtusidens* A (animais 9654, 15586, 19848 e 19849) a 633 pb em *Leporinus amblyrhynchus* (animais 21829 e 21830), *Leporinus macrocephalus* (animais 12505, 19492 e 19493), *Leporinus microphthalmus* (animal 16370), *Leporinus* cf. *obtusidens* B (animais 9218 e 19851), *Leporinus paranensis* (animais 21936 e 21937), *Leporinus piau* (animal 4309), *Leporinus reinhardti* (animal 4156), *Caenotropus labyrinthicus* (animais 12912 e 12913), *Chilodus punctatus* (animais 17473 e 17474) e *Schizodon intermedius* (animais 19845 e 19846) com um valor médio de 616 pb. Após o procedimento de alinhamento e correção manual desse alinhamento, obteve-se uma matriz com 633 caracteres dos quais 282 foram conservados, 351 foram variáveis e 257 foram 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 24,4% de adenina (A), 27,6% de citosina (C), 18,0% de guanina (G) e 30,0% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de $d = 0,131 \pm 0,008$, segundo o modelo da distância p (Nei e Kumar, 2000).

Uma análise gráfica da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo de distância p indica que não há saturação nestes nucleotídeos (Figura 13).

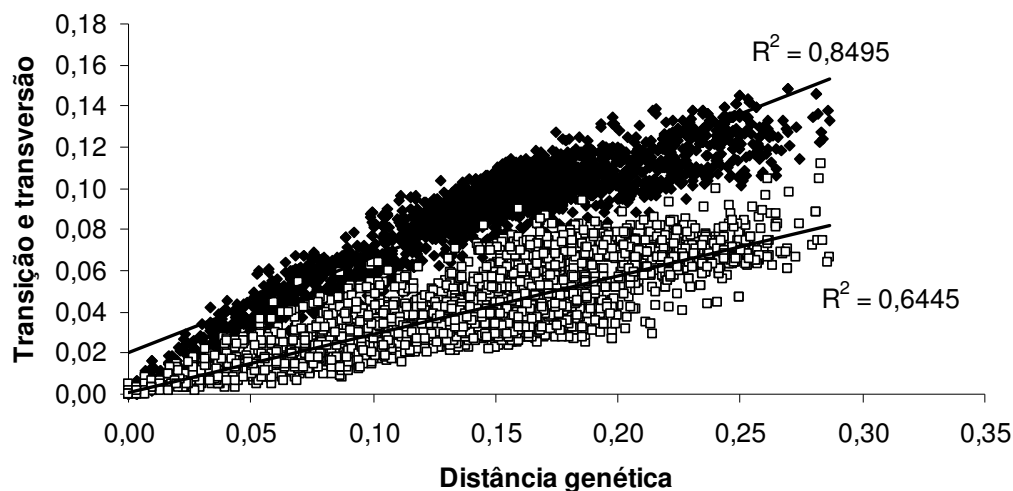


Figura 13. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de distância p , e a freqüência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para o gene Citocromo oxidase I.

4.4 Gene α -Tropomiosina

Foram obtidas seqüências do gene nuclear Trop de 56 exemplares de 15 espécies de *Leporinus* e de espécies utilizadas como grupos externos: *Schizodon intermedius*, *Schizodon* sp., *Caenotropus labyrinthicus* e *Chilodus punctatus*. O tamanho das seqüências do gene α -Tropomiosina variou de 252 pb em *Caenotropus labyrinthicus* (animal 12913) a 431 pb em *Leporinus piau* (animal 4163) com um valor médio de 422 pb. Após o procedimento de alinhamento e correção manual desse alinhamento, obteve-se uma matriz com 643 caracteres dos quais 188 foram conservados, 253 foram variáveis e 91 foram filogeneticamente informativos para as análises de parcimônia. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 1,5. A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 23,5% de adenina (A), 18,4% de citosina (C), 30,9% de guanina (G) e 27,2% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de $d = 0,048 \pm 0,004$, segundo o modelo da distância p (Nei e Kumar, 2000).

Uma análise gráfica da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo de distância p indica que não há saturação nestes nucleotídeos (Figura 14).

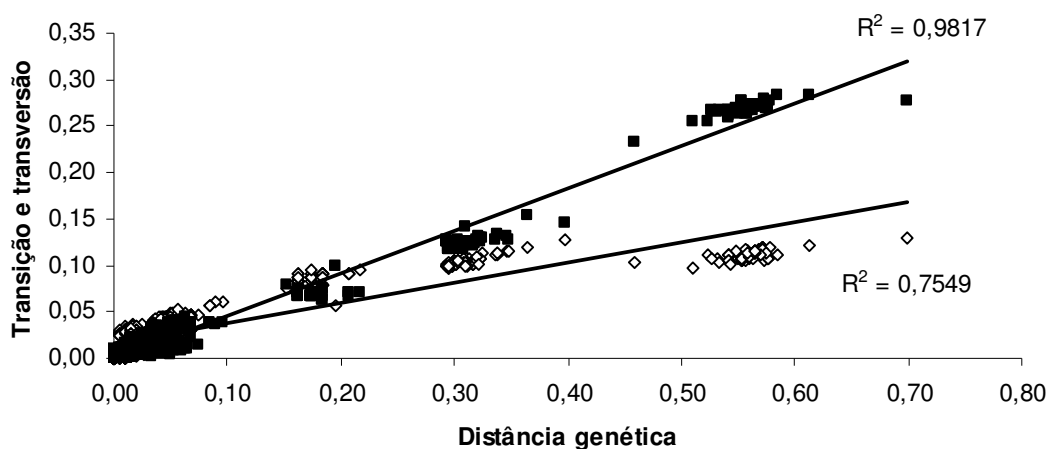


Figura 14. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de distância p , e a freqüência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para o gene Trop.

4.5 Análise conjunta dos genes 16S rRNA, Citocromo b, Citocromo oxidase I e α -Tropomiosina

O tamanho das seqüências concatenadas dos genes 16S rRNA, Citocromo b, Citocromo oxidase I e α -Tropomiosina variou de 950 pb em *Leporinus paranensis* (animal 21940) a 2564 pb em *Leporinus paranensis* (animais 21936 e 21937) e *Leporinus piau* (animal 4309), com um valor médio de 2307 pb. Após o procedimento de alinhamento e correção manual desse alinhamento, obteve-se uma matriz com 2572 caracteres dos quais 1446 foram conservados, 1124 foram variáveis e 804 foram 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 26,6% de adenina (A), 26,3% de citosina (C), 19,7% de guanina (G) e 27,4% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de $d = 0,094 \pm 0,003$, segundo o modelo da distância p (Nei e Kumar, 2000).

Uma análise gráfica da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo de distância p indica que não há saturação nestes nucleotídeos (Figura 15).

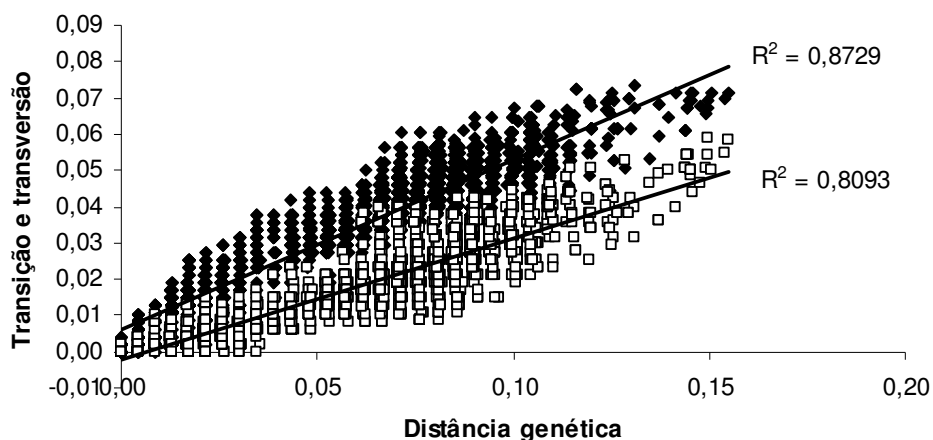


Figura 15. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de distância p , e a freqüência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para os genes 16S, Citocromo b, Citocromo oxidase I e Trop.

4.6 Análises filogenéticas

A análise da matriz final de dados obtidos (Anexo) mostra que o alinhamento entre as seqüências foi bastante direto, com muito pouca necessidade de colocação de “gaps” para ajuste do alinhamento. Mesmo assim, em vários trechos da matriz de alinhamento a colocação de diversos “gaps” foi necessária para um perfeito alinhamento final. Para construção de filogenias essas regiões foram tratadas como segmentos normais (em metade das análises) ou foram totalmente excluídas (na outra metade das análises). Os “gaps” em geral foram também tratados como dados ausentes em metade das análises e na outra metade como uma quinta base. Por último foram feitas análises nas quais as transições e transversões foram pesadas igualmente (1:1) e análises nas quais as transversões receberam o dobro do peso das transições (2:1). Foram obtidas oito filogenias extremamente similares. Na Figura 16 está apresentada a filogenia com maiores valores de *bootstrap*. A análise do índice de decaimento de Bremer mostra que os nós mais internos são sustentados por valores bastante significativos. Para esta árvore, os resultados obtidos foram: comprimento da árvore (TL) = 5277, índice de consistência (CI) = 0,4321, índice de homoplasia (HI) = 0,5679 e índice de retenção (RI) = 0,7625.

As análises bayesianas foram realizadas com o programa MrBayes v3.1 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001). As análises foram realizadas em dois ciclos independentes, cada um com 500.000 gerações de quatro cadeias simultâneas e com amostragens a cada 100 gerações. O ponto de corte foi determinado pelo tempo de convergência (em número de gerações) dos valores de probabilidade. O suporte dos clados foi estimado pelo cálculo das probabilidades posteriores de cada nó entre as árvores amostradas após a estabilização dos valores de probabilidade. A filogenia final, assim como os valores de suporte de cada clado foram similares aos observados na análise de MP (Figura 16).

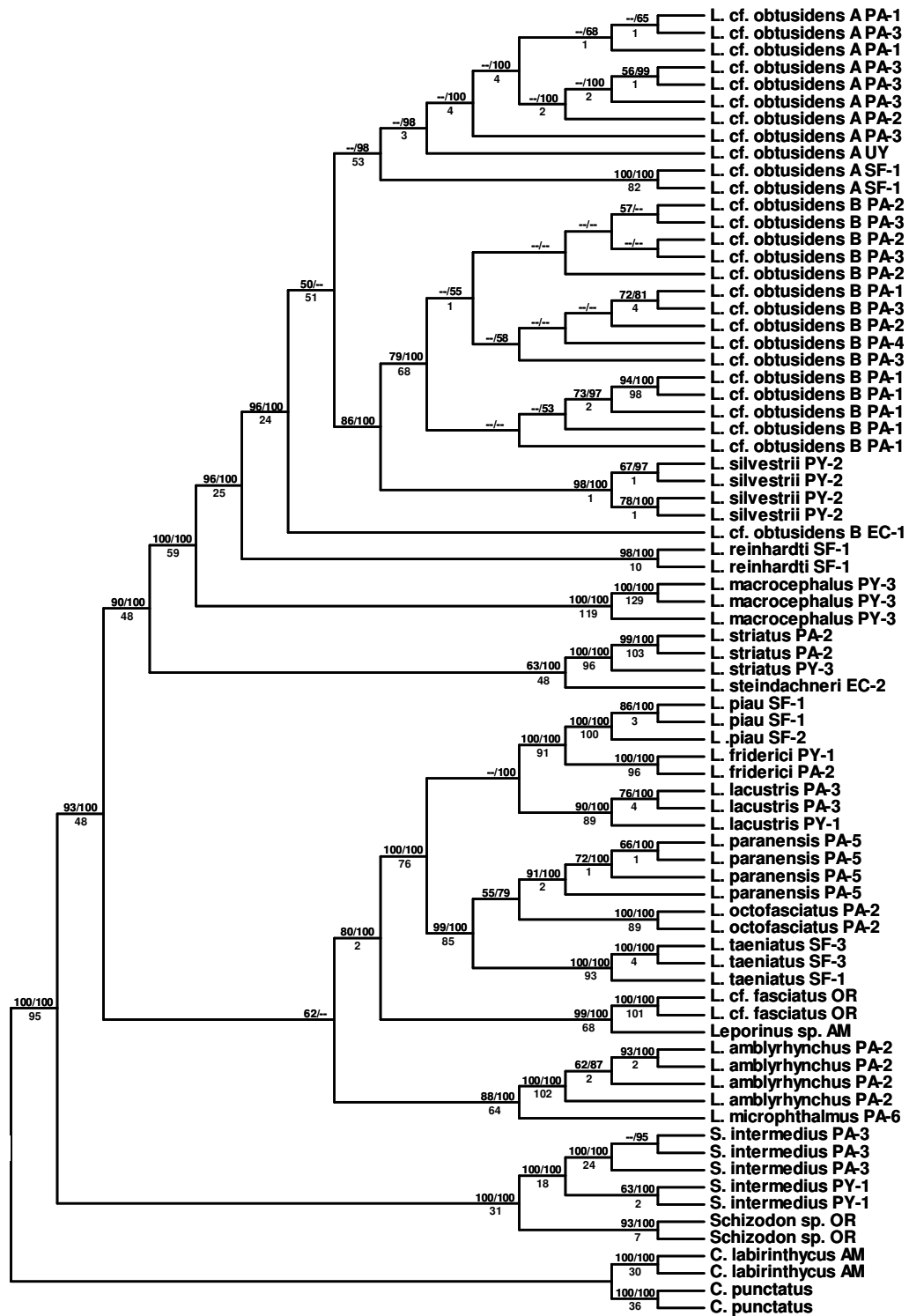


Figura 16. Filogenia gerada pelo método de Máxima Parcimônia, utilizando todos os dados disponíveis, considerando os “gaps” como uma quinta base e com sistema de pesagem das transições e transversões 1:2 respectivamente. Os números acima dos ramos correspondem aos valores de bootstrap e das probabilidades posteriores obtidas na análise bayesiana, respectivamente. Os números abaixo dos ramos correspondem aos valores do índice de decaimento de Bremer. Códigos das localidades: Rio Paraná – PA (Ayolas – PA-1, Paranapanema – PA-2, Tiete – PA-3, Mogi-Guaçu – PA-4, Rio Novo – PA-5, Rio Montividiu – PA-6); Rio Paraguai – PY (Poconé – PY-1, Rio Cuiabá – PY-2, Rio Taquari – PY-3); Rio Uruguai – UY; Rio São Francisco – SF (Represa de Três Marias – SF-1, Rio Picão – SF-2, Ribeirão Santo Inácio – SF-3); Amazonas – AM (Rio Araguaia – AM); Orinoco – OR; Região costeira oriental – EC (Rio Jacuí – EC-1, Rio Paraíba do Sul, Lagoa Feia – EC-2).

5. DISCUSSÃO

O gênero *Leporinus* é o maior gênero da família Anostomidae tanto em número de espécies como em número de indivíduos nas bacias fluviais onde ocorre (Garavello, 1979), devido a isso, foram feitas várias tentativas para dividir as espécies do gênero *Leporinus* em grupos. Existem caracteres que foram mais utilizados, do que outros, para a proposição dessas divisões (Garavello, 1979). Um dos caracteres utilizados foi à posição da boca e sua correlação com a forma e disposição dos dentes (Garavello, 1979). A maior parte das espécies de *Leporinus* tem boca terminal, algumas têm boca subinferior e outras totalmente inferior (Garavello, 1979). Utilizando esse critério Borodin (1929), tentou dividir o gênero *Leporinus* em dois subgêneros e criou o subgênero *Hypomasticus* que englobava espécies de boca inferior.

A forma e disposição dos dentes foram discutidas por Myers (1950), que apresentou em chave, a diagnose para os gêneros de Anostomidae com base, principalmente, na dentição (Garavello, 1979). Foi comparado que as espécies com boca terminal possuíam o dentário maior do que o premaxilar e como consequência disso, os dentes do premaxilar seriam voltados para frente formando um ângulo com o eixo longitudinal do corpo, enquanto que nas espécies de boca inferior ocorria o contrário e os dentes estariam dispostos quase perpendicularmente ao premaxilar formando um ângulo reto com o eixo longitudinal do corpo (Garavello, 1979). Garavello (1979) analisou preparações de crânio destes dois tipos e pode constatar que existe uma estreita relação anatômica entre estas formas e que existem todos os tipos intermediários entre as formas de boca terminal e as de boca inferior, além de que em sua diagnose, Myers (1950), não incluiu as espécies de boca inferior, portanto, Garavello (1979) verificou em seu trabalho, que não existe uma correlação estrita entre posição da boca e forma dos dentes e que existiria grande dificuldade de situar certas espécies de boca subinferior como por exemplo, *L. obtusidens*, *L. amblyrhynchus* e outras, num ou noutro gênero. Outro ponto levantado por Garavello (1979) é que ocorre uma modificação da posição da boca, no decorrer do desenvolvimento ontogenético. Com isso, Garavello (1979) concluiu que não existem fundamentos anatômicos que justifiquem a divisão do gênero *Leporinus* em dois subgêneros, baseada na posição da boca e forma e disposição dos dentes.

Garavello (1979) discute também alguns caracteres que considera relevantes para interpretar a filogenia do grupo, embora, não se tenha conseguido um arranjo filogenético satisfatório das espécies (Garavello, 1979). Um dos caracteres é com relação ao número de dentes dos anostomídeos, que com exceção de *Gnathodolus*, *Synaptolaemus*, *Sartor* e um número variado de espécies de *Leporinus*, todos os demais tem quatro dentes no premaxilar e quatro no dentário (Garavello, 1979), sendo esse caráter considerado por Garavello (1979), primitivo, por parecer um caráter generalizado para a família e o menor número de dentes é interpretado como especialização, portanto, resultado de perda.

Outro subgênero, *Leporinops*, foi criado por Géry (1960), com base em diferenças dentárias e de crânio (Garavello, 1979), este subgênero foi baseado em *Leporinus moralesi* Fowler (1942), segundo o autor, a região peitoral de *L. moralesi* era um tanto quilhada, Garavello (1979) examinou exemplares desta espécie e verificou que possuíam região peitoral arredondada como as demais espécies de *Leporinus*, além disso, Géry (1960) assinala que *L. moralesi* tinha os dentes algo cuspidados, entretanto, segundo Garavello (1979), esta forma de dentes pode ser uma característica do jovem desta espécie.

Fowler (1914), também criou um subgênero, *Myocharax*, baseado em dentição. Este subgênero foi baseado na dentição apresentada por *Leporinus desmotes* (descrita na obra de Garavello (1979)), na qual apresenta o par de dentes sinfisianos do dentário muito longo, entretanto, nas espécies de *Leporinus* ocorrem dentes sinfisianos com diferentes graus de desenvolvimento (Garavello, 1979). Com isso, esses subgêneros foram considerados inválidos no trabalho de Garavello (1979).

Outro caráter analisado por Garavello (1979) para definição de Anostomidae, foi o número de raios das nadadeiras, sendo que, com exceção das nadadeiras ventral e peitoral, as demais apresentam um número constante de raios (Garavello, 1979). O número de escamas que circundam o pedúnculo caudal e o número de escamas pré-anais, se revelaram úteis para a separação de espécies de *Leporinus* (Garavello, 1979).

O padrão de colorido é um outro caráter analisado no trabalho de Garavello (1979) e que, segundo ele, tem sido muitas vezes desprezado, quando da procura de caracteres que possam revelar afinidades entre grupos de peixes (Garavello, 1979). Embora certos peixes, ou grupos de peixes, possam apresentar uma grande

variabilidade do padrão de colorido, é preciso considerar que nos Characiformes, o padrão de colorido é muito pouco variável, sendo freqüentemente característico para gêneros (Garavello, 1979). De acordo com Garavello (1979), no gênero *Leporinus* o padrão de colorido parece ser de grande utilidade para definir relações filogenéticas entre grupos de espécies e embora possa considerar prematuro, interpretar o padrão de colorido como um caráter decisivo para a separação de grupos naturais de espécies, dentro de *Leporinus*, as evidências levaram-no a utilizar este caráter para este fim (Garavello, 1979), segundo o autor, o gênero *Leporinus* apresenta quatro padrões básicos de colorido e subpadrões intermediários que aparecem nos indivíduos jovens da maioria das espécies e em adultos de algumas espécies. Em seu trabalho as espécies foram reunidas em grupos de acordo com os padrões de colorido que segue: Padrão A – Espécies com barras transversais negras ou castanho-escuras sobre o corpo e a cabeça, sem manchas ou listras longitudinais; padrão B – Espécies com listras longitudinais negras ou castanho-escuras sobre o corpo e na linha lateral, que às vezes se apresenta interrompida; padrão C – Espécies com três manchas arredondadas maiores, castanho-escuras sobre a linha lateral e várias máculas menores acima e abaixo delas; padrão D – Espécies com uma, duas ou três manchas grandes, castanho-escuras, sobre a linha lateral, com ou sem barras transversais escuras e irregulares sobre o dorso.

As 17 espécies de *Leporinus* analisadas no presente estudo formaram um grupo monofilético com alta sustentação reforçando a monofilia do gênero. Por outro lado, as espécies de *Leporinus* das bacias do Prata e do São Francisco não formam unidades monofiléticas, havendo espécies da bacia do Prata e da bacia do São Francisco que pertencem a grupos monofiléticos.

A filogenia gerada neste trabalho, em geral não confirma a divisão das espécies do gênero *Leporinus* em grupos de acordo com padrões de colorido. Assim, por exemplo, *L. striatus*, espécie que se encaixa no padrão de colorido B de Garavello (1979) é grupo irmão de *L. steindachneri*, espécie que se encaixa no padrão de colorido D do mesmo autor. Com relação ao número de dentes, *L. striatus* possui três dentes no pré-maxilar e quatro no dentário e *L. steindachneri* possui quatro dentes em ambas as maxilas, reforçando a hipótese de que esses caracteres não são filogeneticamente informativos. Outro exemplo é das espécies *L. octofasciatus* e *Leporinus* cf. *fasciatus*, que apesar de possuírem dentição diferente (*L. octofasciatus* com três dentes no pré-maxilar e quatro no dentário e *Leporinus* cf.

fasciatus com quatro dentes em ambas as maxilas) se encaixam em um mesmo padrão de colorido, A, porém não ficam juntas na filogenia.

Um exemplo de agrupamento na filogenia, que está de acordo com a divisão de grupos por padrão de colorido e dentição, é o grupo monofilético formado pelas espécies *L. lacustris*, *L. friderici* e *L. piau*, sendo *L. lacustris* grupo irmão das demais espécies, todas elas se encaixam no padrão de colorido D e possuem quatro dentes em ambas as maxilas.

Dentro do grupo analisado duas linhagens monofiléticas foram encontradas. Na primeira linhagem *L. steindachneri* é grupo irmão de *L. striatus* e essas duas espécies formam o grupo irmão das demais espécies desta linhagem, depois temos *L. macrocephalus* como grupo irmão das demais espécies dessa linhagem e a seguir temos *L. reinhardti* como grupo irmão das espécies identificadas como *L. silvestrii* e *Leporinus cf. obtusidens*.

Nesse último clado as formas identificadas como *Leporinus cf. obtusidens* A e *Leporinus cf. obtusidens* B formam grupos monofiléticos. O único exemplar que não ficou com o seu grupo foi um animal identificado como *Leporinus cf. obtusidens* B do rio Jacuí, no Rio Grande do Sul. Considerando que os rios da drenagem costeira oriental estão separados por um tempo considerável é possível que esse animal possa pertencer a uma nova espécie. Uma amostra mais numerosa deverá ser analisada para confirmação ou não dessa hipótese.

As demais formas identificadas como *Leporinus cf. obtusidens* B formaram um grupo monofilético. Essas formas, conhecidas popularmente como piauçus, podem realmente representar a espécie *L. obtusidens*, porém até que a análise genética de material proveniente da localidade tipo da espécie (Rio da Prata, Buenos Aires, Argentina), não seja efetuada não é possível utilizar esse nome com segurança uma vez que na descrição original da espécie os caracteres morfológicos empregados não permitem uma segura identificação. Reforçando essa proposição temos o exemplo de *L. silvestrii* (coletado muito próximo da localidade tipo) que apareceu como grupo irmão das formas identificadas como *Leporinus cf. obtusidens* B. *L. silvestrii*, descrita por Boulenger, 1902, foi considerada sinônimo de *L. obtusidens* por Garavello (1979), porém hoje é reconhecida como uma espécie válida (Garavello e Britski, 2003). Os baixos valores de suporte das relações entre os exemplares de *Leporinus cf. obtusidens* B das diferentes localidades amostradas (acima e abaixo da antiga cachoeira de Sete Quedas) mostram que há pouca

divergência genética no nível estudado, sugerindo assim a existência de um considerável fluxo gênico entre essas localidades.

As formas identificadas como *Leporinus* cf. *obtusidens* A formaram um grupo monofilético, sendo a linhagem mais basal a obtida no rio São Francisco, seguida da amostra do rio Uruguai e depois as amostras do rio Paraná. Os exemplares aqui identificados como *Leporinus* cf. *obtusidens* A têm sido identificados como *L. elongatus* por diversos autores (Garavello, 1979; Garavello e Britski, 2003). *L. elongatus* foi descrito por Valenciennes, 1850, porém o autor assinalou como localidade tipo o rio São Francisco e La Plata, indicando uma possível falta de conhecimento da verdadeira localidade tipo. Considerando que o material analisado por Valenciennes foi possivelmente coletado em algum rio da drenagem costeira oriental as formas assinaladas para as bacias do Prata e do São Francisco devem pertencer a uma (ou mais) espécie distinta. Também nesse caso até que a análise genética de material proveniente da localidade tipo da espécie *L. obtusidens* (Rio da Prata, Buenos Aires, Argentina), seja efetuada não é possível saber se são esses exemplares da forma A que realmente representam essa espécie. A análise de material proveniente dos rios costeiros entre os estados da Bahia e Rio de Janeiro também deverá ser importante para uma conclusão sobre a espécie descrita como *L. elongatus*. Também nesse caso, os baixos valores de suporte das relações entre os exemplares de *Leporinus* cf. *obtusidens* A das diferentes localidades amostradas da bacia do rio Paraná (acima e abaixo da antiga cachoeira de Sete Quedas) mostram que há pouca divergência genética no nível estudado, sugerindo assim a existência de um considerável fluxo gênico entre essas localidades.

Na segunda linhagem *L. microphthalmus* aparece como grupo irmão de *L. amblyrhynchus* e essas duas espécies formam grupo irmão das demais espécies desta linhagem. *L. microphthalmus* se encaixa no padrão de colorido D e possui três dentes no pré-maxilar e quatro no dentário, já *L. amblyrhynchus* se encaixa no padrão de colorido B e possui três dentes em ambas as maxilas.

O clado formado pelas demais espécies apresentou uma espécie da bacia Amazônica (*Leporinus* sp.) e uma espécie da bacia do rio Orinoco (*Leporinus* cf. *fasciatus*) como grupo irmão das demais espécies analisadas. Deve-se assinalar que *Leporinus* sp. apresentou um grande similaridade morfológica e merística com *L. obtusidens* e assim não pode ser identificada com nenhum nome específico.

As espécies *L. taeniatus*, *L. octofasciatus* e *L. paranensis* formaram um grupo monofilético bem sustentado, sendo *L. taeniatus* grupo irmão das demais espécies. Apesar dessas espécies possuírem o mesmo número de dentes em ambas as maxilas, três dentes no pré-maxilar e quatro dentes no dentário, pertencem a padrões de colorido diferentes, *L. taeniatus*, padrão de colorido B, *L. octofasciatus*, padrão de colorido A e *L. paranensis*, padrão de colorido D.

As espécies *L. lacustris*, *L. friderici* e *L. piau* formaram um grupo monofilético bem sustentado, sendo *L. lacustris* grupo irmão das demais espécies. Como já comentado, todas elas se encaixam no padrão de colorido D e possuem quatro dentes em ambas as maxilas. Nesse clado foram analisadas diferentes amostras de *L. lacustris*, *L. friderici* das bacias dos rios Paraná e Paraguai e elas foram agrupadas coerentemente em suas espécies indicando que ambas pertencem a grupos monofiléticos.

No trabalho de (Garavello e Britski, 1987) onde são descritas duas espécies do gênero *Leporinus* da bacia do alto Paraná, *L. amblyrhynchus* e *L. paranensis*, discuti-se que a maioria das espécies de *Leporinus* podem ser incluídas em três grupos quanto ao padrão de colorido do tronco: 1) espécies barradas; 2) espécies listradas e 3) espécies manchadas (os padrões de colorido para *Leporinus* são definidos em Garavello, 1979). *L. amblyrhynchus* possui um padrão de colorido intermediário entre o padrão barrado e o listrado, sendo poucas as espécies de *Leporinus* que possuem esse padrão (Garavello e Britski, 1987). Uma das espécies que se assemelham a *L. amblyrhynchus*, de acordo com o padrão de colorido, é *L. taeniatus*, espécie que ocorre na bacia do São Francisco, entretanto, esta espécie difere de *L. amblyrhynchus* por possuir 16 séries de escamas circumpedunculares (12 em *L. amblyrhynchus*) e quatro dentes em cada dentário (três em *L. amblyrhynchus*) (Garavello e Britski, 1987). Na filogenia obtida neste trabalho *L. amblyrhynchus* e *L. taeniatus* não ficam juntas, portanto, o agrupamento por padrão de colorido não se confirmou neste caso.

Leporinus paranensis pertence ao grupo de *Leporinus* com três máculas no flanco, cujo representante mais conhecido é *L. friderici* (Garavello e Britski, 1987). O baixo número de escamas na linha lateral (34 a 36) a separa da grande maioria das espécies de *Leporinus* manchadas, mesmo daquelas que ocorrem fora da bacia do alto Paraná (Garavello e Britski, 1987). Talvez as espécies mais semelhantes a *L. paranensis*, neste aspecto, sejam *L. piau* (35 a 37 escamas na linha lateral) e *L.*

lacustris (33 a 35 escamas na linha lateral) (Garavello e Britski, 1987). Na filogenia obtida *L. piau* é grupo irmão de *L. friderici* e *L. lacustris* grupo irmão destes, neste caso, observa-se um agrupamento de espécies com um mesmo padrão de colorido. Apesar de *L. paranensis* ser similar com *L. piau* e *L. lacustris*, com relação ao número de escamas na linha lateral e com padrão de colorido (D), *L. paranensis* não forma um clado com essas espécies, mas com espécies de padrão de colorido diferentes (*L. taeniatus*, padrão de colorido B e *L. octofasciatus*, padrão de colorido A).

A filogenia gerada neste trabalho, no geral não confirma esta divisão das espécies do gênero *Leporinus* em grupos de acordo com padrões de colorido. Por exemplo, *L. striatus*, espécie que se encaixa no padrão de colorido B é grupo irmão de *L. steindachneri*, espécie que se encaixa no padrão de colorido D. *L. octofasciatus* e *Leporinus* cf. *fasciatus*, espécies que se encaixam no padrão de colorido A, não ficam juntos na filogenia.

Segundo Garavello e Britski (2003), nove espécies de *Leporinus* são assinaladas para a bacia do Prata (*L. aguapeiensis*, *L. amblyrhynchus*, *L. lacustris*, *L. macrocephalus*, *L. microphthalmus*, *L. octofasciatus*, *L. paranensis*, *L. striatus* e *L. silvestrii*), quatro espécies são assinaladas para a bacia do São Francisco (*L. maculatus*, *L. marcgravii*, *L. reinhardti* e *L. taeniatus*) e duas espécies são assinaladas para ambas as bacias (*L. elongatus* e *L. obtusidens*) (Tabela 1). Praticamente todas as espécies de *Leporinus* revisadas por Garavello e Britski (2003), para as bacias estudadas, estão presentes neste trabalho. Na filogenia final obtida observamos a presença de duas grandes linhagens, a primeira contendo três espécies assinaladas para a bacia do Prata, uma para a bacia do São Francisco e duas para ambas as bacias e na segunda linhagem cinco espécies assinaladas para a bacia do Prata e uma para a bacia do São Francisco, demonstrando, como já foi comentado, que as espécies de *Leporinus* de ambas as bacias não formam unidades monofiléticas. Os resultados obtidos mostram espécies de diferentes bacias formando unidades monofiléticas sugerindo que essas bacias foram colonizadas por linhagens independentes de *Leporinus*.

6. CONCLUSÃO

1- As 17 espécies de *Leporinus* analisadas no presente estudo formaram um grupo monofilético com alta sustentação reforçando a monofilia do gênero.

2- Os agrupamentos observados não são congruentes com a separação do gênero *Leporinus* em unidades com base no colorido corporal ou na fórmula dentária.

3- Ainda que os dados moleculares indiquem que há dois grupos de *Leporinus* cf. *obtusidens* na bacia do Prata, a análise de mais exemplares é necessária para uma completa elucidação da posição taxonômica desses grupos.

4- Os dados moleculares indicam que uma forma, possivelmente ainda não descrita, está presente nas drenagens costeiras do Rio Grande do Sul. A análise molecular e morfológica de material adicional permitirá resolver essa questão com segurança.

5- As espécies de *Leporinus* das bacias do Prata e do São Francisco não formam unidades monofiléticas, havendo espécies da bacia do Prata e da bacia do São Francisco que pertencem a grupos monofiléticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aljanabi, S. M., Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, Oxford University Press, Vol. 25, Nº. 22: 4692–4693.
- Amorim, D. S. (2002). Fundamentos de sistemática filogenética. Editora Holos, Ribeirão Preto, 154 pp.
- 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.
- Avelino, G.S. (2000). Caracterização morfológica das espécies da família Anostomidae (Pisces: Characiformes) do rio Corumbá, bacia do Alto Rio Paraná, Estado de Goiás, BR. Monografia de Bacharelado. Universidade Estadual de Maringá, 53 pp.
- Banford, H.M., Bermingham, E., Collette, B.B (2004). Molecular phylogenetics and biogeography of transisthmian and amphi-Atlantic needlefishes (Belontiidae: *Strongylura* and *Tylosurus*): perspectives on New World marine speciation. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 31: 833-851.
- Borodin, N. A. (1929). Notes on some species and subspecies of the genus *Leporinus* Spix. *Mem. Mus. Comp. Zool. Cambridge Mass.* 50: 269-290; 17 pls.
- Bremer, K. (1988). The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution*, 42: 795-803.
- Britski, H.A., Sato, Y., Rosa, A.B.S. (1988). Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (Com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). 3. ed. Brasília, DF: CODEVASF, 115 pp.

- Britski, H.A., Silimon, K.Z.S. Lopes, B.S. (1999). Peixes do Pantanal: manual de identificação. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Corumbá: Embrapa-CPAP, 184 p.:il.
- Buckup, P.A. (1998). Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophisy). Pp. 123-144. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A. (Eds.). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre, Edipucrs, 603 pp.
- Calcagnotto, D., Schaefer, S. A., DeSalle, R. (2005). Relationship among characiform fishes inferred from análise of nuclear and mitochondrial gene sequences. Mol. Phylogenet. Evol., 36: 135-153.
- Casey, S. P., Hall, H. J., Stanley, H. F., Vincent A. C. J. (2004). The origin and evolution of seahorses (genus *Hippocampus*): a phylogenetic study using the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. Mol. Phylogenet. Evol., 30: 261-272.
- Chao, L.N, Petry, P., Prang, G., Sonneschien, L., Tlusty, M. (2001). Conservation and management of ornamental fish resources of the rio Negro basin, Amazonia, Brazil. Manaus, Editora da Universidade do Amazonas, 310 pp.
- Crespi, B.J., Fulton, M.J. (2004). Molecular systematics of Salmonidae: combined nuclear data yields a robust phylogeny. Mol. Phylogenet. Evol., 31: 658-679.
- Doadrio, I., Dominguez, O. (2004). Phylogenetic relationships within the fish family Goodeidae based on cytochrome b sequence data. Mol. Phylogenet. Evol., 31: 416-430.
- 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.

- Fink, S.V., Fink, W.L. (1981). Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). Zool. J. Linn. Soc., London, 72: 297-353.
- Fowler, H. W. (1914). Fishes from the Rupununi: River, British Guiana. Proc. Acad. Nat. Sci., Phila; 66: 229-284.
- Fowler, H. W. (1942). Los Peces del Peru. Bol. Mus. Hist. Nat. Univ. San Marcos. (22-23): 352-381; figs. 45-50.
- Garavello, J. C., Britski, H. A. (1987). Duas novas espécies do gênero *Leporinus* Spix, 1829, da bacia do alto Paraná (Teleostei, Anostomidae). Com. Mus. Ciênc. PUCRS. Porto Alegre, Nº 44: 153-165.
- Garavello, J.C. (1979). Revisão taxonômica do gênero *Leporinus* Spix, 1829 (ostariophysi, Anostomidae). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 451 pp.
- Garavello, J.C., Britski, H.A. (2003). Family Anostomidae (Headstanders). In: Reis, Roberto E.; Kullander, Sven O.; Ferraris, Jr., Carl J. *Cheklis of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 71-86.
- Géry, J. (1977). Characoids of the world. T. F. H. Publications, Neptune City, New Jersey, 672 pp.
- Géry, J. (1960 B). Contributions a l'étude des poissons characoides (nº8). Um nouveau sous-genre de *Leporinus* (Erythrinidae, Anostomidae): *Leporinops*, type *L. moralesi* Fowler. Bull. Mus. Hist. Nat. Paris (2) 32 (4): 308-313.
- Géry, J. (1977). Characoids of the world. T. F. H. Publications, Neptune City, New Jersey, 672 pp.

- Goloboff, P. A., Mattoni, C. I., Quinteros, A. S. (2006). Continuous characters analyzed as such. *The International Journal of the Willi Hennig Society. Cladistics* 22 (6): 589–601.
- Hall, T. A., (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Seris* 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.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F. (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Ikejima, K., Ishiguro, N. B., Wada, M., Tsukamoto, K. K., Nishida, M. (2003). Molecular phylogeny and possible scenario of ponyfish (Perciformes: Leiognathidae) evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 31: 904-909.
- Inoue, J. G., Miya, M., Tsukamoto, K., Nishida, M. (2001). A mitogenomic perspective on the basal teleostean phylogeny: Resolving higher-level relationships with longer DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 20: 275-285.
- Inoue, J.G., Miya, M., Tsukamoto, K., Nishida, M. (2004). Mitogenomic evidence for the monophyly of elopomorph fishes (Teleostei) and the evolutionary origin of the leptocephalus larva. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32: 274–286.
- Kocher, T. D., Stepien, C. A. (1997). *Molecular systematics of fishes*. Academic Press, London, U. K.

- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., villablanca, F. X., Wilson, A. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 6196-6200.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M. (2001). MEGA2.1: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Distribuído pelos autores. Bioinformatics (submetido).
- Lewin, B. (1994). *Genes V*. Oxford University Press Inc., New York, 1272 pp.
- Lovejoy, N.R., Collete, B.B. (2001). Phylogenetic relationships of new world needlefishes (Teleostei: Belonidae) and the biogeography of transitions between marine and freshwater habitats. *Copeia*, 2001: 324-338.
- Lussen, A., Falk, T.M., Villwock, W. (2003). Phylogenetic patterns in populations of Chilean species of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae): results of mitochondrial DNA analysis. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 29: 151-160.
- Mattern, M.Y. (2004). Molecular phylogeny of the Gasterosteidae: the importance of using multiple genes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 30: 366-377.
- Menezes, N.A. (1972). Distribuição e origem da fauna de peixes de água doce das grandes bacias fluviais do Brasil. In: Comissão Interestadual da Bacia do Paraná-Paraguai. *Poluição e Piscicultura*. São Paulo: USP. Faculdade de Saúde Pública, 73-78.
- Miya, M., Takeshima, H., Endo, H., Ishiguro, N.B. (2003). Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 26: 121-138.
- Moyer, G.R., Burr, B.M., Krajewski, C. (2004). Phylogenetic relationships of thorny catfishes (Siluriformes: Doradidae) inferred from molecular and morphological data. *Zool. J. Linnean Soc.*, 140: 551-575.

- 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.
- Myers, G. S. (1950). Studies on South American fresh-water fishes. II. The genera of Anostominae Characids. *Stanf. Ichth. Bull.* 3: 184-198; 3 figs.
- Near, T.J., Bolnick, D.I., Wainwright, P.C. (2004). Investigating phylogenetic relationships of sunfishes and black basses (Actinopterygii: Centrarchidae) using DNA sequences from mitochondrial and nuclear genes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32: 344-357.
- Nei, M., Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York, USA.
- Obmellier, L.E., Pfeiler, E. (2003). Phylogenetic relationships of elapomorph fishes inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 26: 202-214.
- Orti, G. (1997). Radiation of Characiform fishes: evidence from mitochondrial and nuclear DNA sequences. Pp: 219-243. In: Kocher, T.D., Stepien, C.A. (Eds.). *Molecular Systematics of Fishes*, London, Academic Press, 603 pp.
- 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.
- 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.

- Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C. (2003). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA), EDIPUCRS, Porto Alegre, 729 pp.
- Rüber, L., Britz, R., Kullander, S.O., Zardoya, R. (2004). Evolutionary and biogeographic patterns of the Badidae (Teleostei: Perciformes) inferred from mitochondrial and nuclear data. *Mol. Phylogenet. Evol.*, no prelo.
- Sambrook, J., Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 3^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- Shimabukuro-Dias, C.K., Oliveira, C, Reis, R.E., Foresti, F. (2004). Molecular phylogeny of the armoured catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32: 152-163.
- Stepien, C.A., Kocher, T.D. (1997) Molecules and morphology in studies of fish evolution In: Kocher, T.D., Stepien (eds) *Molecular Systematics of Fishes*. Academic Press, New York, 1-11.
- Stock, D. W., Gibbons, J. K., Whitt, G. S. (1991). Strengths and limitations of molecular sequences comparisons for inferring the phylogeny of the major groups of fishes. *J. Fish Biol.*, 39: 225-236.
- Swofford, D.L. (2002). PAUP* - Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J., Hillis, D.M. (1996). Phylogenetic inference. Pp. 407-514. In: Hillis, D.M, Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.). *Molecular Systematics*. Massachusetts, Sinauer Associates Inc, 655 pp.

- 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.
- Tundisi, J.G., Tundisi, T.M., Rocha, O. (1999). Ecosistemas de águas interiores. Pp. 153-192. In: Rebouças, A.C., Braga, B., Tundisi, J.G. (Eds.). *Águas doces do Brasil: capital ecológico, uso e conservação*. São Paulo, Escrituras, 717 pp.
- Vari, R.P. (1983). Phylogenetic relationships of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae and Chilodontidae (Pisces, Characiformes). *Smithson. Contrib. Zool.*, 378: 1-60.
- Vari, R.P. (1998). Higher level phylogenetic concepts within characiforms (Ostariophysi), a historical review. Pp. 111-122. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A. (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Edipucrs, 603 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* doi:10.1098/rstb.1716
- Weitzman, S.H., Vari, R.P. (1988). Miniaturization in South American freshwater fishes; an overview and discussion. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 101 (2): 444-465.
- Winterbottom, R. (1980). Systematics, osteology and phylogenetic relationships of fishes of the ostariophysan subfamily Anostominae (Characoidei, Anostomidae). *Life Sci. Contribution, Royal Ontario Museum*, 123: 1-112.
- Xia, X., Xie, Z. (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity*, 92: 371-373.

Zardoya, R., Meyer, A. (1997). The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of a "Living Fossil," the Coelacanth (*Latimeria chalumnae*). *Genetics*, Vol 146 (3): 995-1010.

18011Lsilvestrii
18012Lsilvestrii
19470Lelongatus
19492Lmacrocephalus
19493Lmacrocephalus
19698Lciffasciatus
19699Lciffasciatus
19827Loctofasciatus
19828Loctofasciatus
19845Sintermedius
19846Sintermedius
19847Sintermedius
19848Lobtusidens
19849Lelongatus
19851Lobtusidens
19853Lelongatus
19854Lobtusidens
19855Lelongatus
20121Lamblyrhynchus
21828Lamblyrhynchus
21829Lamblyrhynchus
21830Lamblyrhynchus
21936Lparanensis
21937Lparanensis
21939Lparanensis
21940Lparanensis
1601
1700
4156Lreinhardtii
4161Lreinhardtii
4162Lpiaui
4163Lpiaui
4174Ltaeniatus
4211Lelongatus
4212Lelongatus
4250Ltaeniatus
4281Ltaeniatus
4309Lpiaui
8077Sintermedius
8078Sintermedius
8086Llacustris
8087Lfriderici
9218Lobtusidens
9227Lobtusidens
9232Lobtusidens
9236Lobtusidens
9654Lobtusidens
9917Lelongatus
9923Lobtusidens
9932Lobtusidens
9935Lobtusidens
9936Lobtusidens
9938Lobtusidens
9939Lelongatus
9945Lobtusidens
12505Lmacrocephalus
12708Lstriatus
12912Lclabrinthycus
12913Lclabrinthycus
13060Lsp
15558Rhytidoussip
15559Rhytidoussip
15586Lelongatus
15587Lobtusidens
15940Llacustris
15941Llacustris
16074Lstaindachneri
16370Lmicrophthalmus
16871Lstriatus
16872Lelongatus
16873Lfriderici
17473Puncitatus
17474Cpuncitatus
17483Lstriatus
17676Lobtusidens
17677Lelongatus
18008Lsilvestrii
18009Lsilvestrii
18011Lsilvestrii
18012Lsilvestrii
19470Lelongatus
19492Lmacrocephalus
19493Lmacrocephalus
19698Lciffasciatus
19699Lciffasciatus
19827Loctofasciatus
19828Loctofasciatus
19845Sintermedius
19846Sintermedius
19847Sintermedius
19848Lobtusidens
19849Lelongatus
19851Lobtusidens
19853Lelongatus
19854Lobtusidens
19855Lelongatus
20121Lamblyrhynchus
21828Lamblyrhynchus
21829Lamblyrhynchus
21830Lamblyrhynchus
21936Lparanensis
21937Lparanensis
21939Lparanensis

