

Universidade Estadual Paulista – UNESP  
Instituto de Biociências de Botucatu

*Kelly Terumi Abe*

**FILOGENIA MOLECULAR DE GASTEROPELECIDAE  
(OSTARIOPHYSI: CHARACIFORMES) E ESTUDO DE SUAS  
RELAÇÕES COM OUTROS CHARACIFORMES**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração: Zoologia

Orientador: Prof. Dr. Claudio de Oliveira

**Botucatu – SP**

**2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
*BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus*

Abe, Kelly Terumi.

Filogenia molecular de gasteropelecidae (Ostariophsi: characiformes) e estudo de suas relações com outros characiformes / Kelly Terumi Abe. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2007.

Orientador: Claudio de Oliveira

Assunto CAPES: 20804008

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

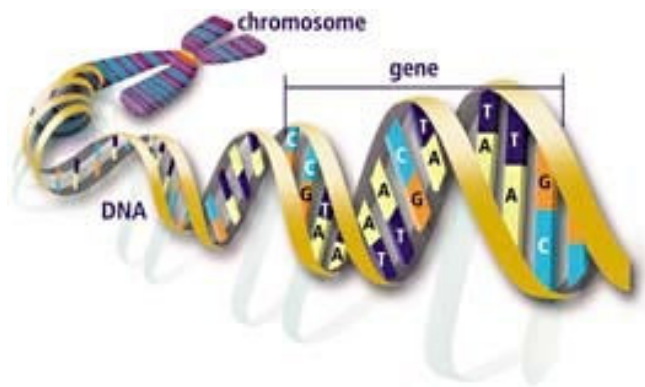
CDD 574.192

Palavras-chave: Characiformes; Filogenia; Gateropelecidae; Ostariophsi; Sistemática

À minha família, cujo apoio, estímulo,  
carinho e incentivo constantes,  
possibilitaram a realização deste  
trabalho,

Dedico...

***“Deus escreve certo por linhas tortas”***



## **Agradecimentos**

Quero expressar aqui meus sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. A todas essas pessoas fica a minha eterna gratidão, em especial:

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa concedida durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Claudio de Oliveira, meu orientador, pela amizade, incentivo e pela vasta experiência transmitida. O assunto aqui desenvolvido, por sua sugestão, foi em vários momentos motivo de desânimo e preocupação, no entanto, sua permanente confiança sempre me manteve na “filogenia dos gasteropelecides”. Um exemplo de profissional, e, principalmente, de pessoa. Obrigada por confiar em mim!

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, pelo apoio e exemplo de profissional.

Aos Profs. Drs. Cesar Martins e Adriane Pinto Wasko pelos muitos esclarecimentos e incentivos, e pelos momentos de descontração.

Aos companheiros do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes: Andréia Alves, Andréia Poletto, Carlos, Claudinha, Danillo, Emanuel, Fabio (Fio), Fernanda, Gleisy, Guilhermes (Varvito e Cabelo), Guida, Gustavo, Heraldo, Irani, Jefferson, José Carlos, Juliana, Karina, Kátia, Lessandra, Ligia, Luciana, Luiz Henrique, Marlon, Marina, Marisa, Natalia, Patrícia, Ricardo, Waldo e Wellcy. Obrigada pela alegria, pelas risadas e pelos vários momentos de descontração.

Ao Prof. Celso Benites, Salute meu grande amigo! Uma pessoa maravilhosa que tive a oportunidade de conhecer! Obrigada pelos conselhos e

pelas muitas conversas que tivemos. Ao Álex, pela eterna disponibilidade em ajudar sempre que precisei e, principalmente, pela amizade. Ao Márcio, pela amizade e ajuda.

A minha grande amiga Michelli, Virgin Jones, vou sentir tanta saudades das conversas, festas, alegrias e por vários momentos que passamos juntas. Você é uma amiga para todas as horas!

A Dani, uma pessoa maravilhosa, companheira e amiga. Obrigada pelas nossas conversas, pela paciência e pela ajuda nos bons e maus momentos, e principalmente, pelas risadas no laboratório, nas festas e nos congressos.

Ao Fernando Fernandes, Konrado, pela amizade, pelo apoio e incentivo e também pelos vários “puxões de orelha”.

A Rita, pelo carinho, amizade e pelas palavras de incentivo. Mesmo morando longe, continua sempre dando trabalho! A Dri, pela hospedagem em Ribeirão e pelas nossas longas conversas sobre tudo. A Cris, pelo belo exemplo de profissional e de pessoa.

Aos Profs. Mauro e Ernesto, pessoas fantásticas e, principalmente, incentivadoras!

Ao Ricardo Benine, pelos empréstimos dos livros e artigos, pelas conversas de incentivo e principalmente, pela grande ajuda nos momentos finais.

Ao técnico Renato Devidé, pela amizade e risadas constantes.

Aos amigos do Departamento de Morfologia: Angélica, Rosiclaire, Robson e Luis Justulin pelo agradável convívio.

Aos professores e funcionários do Departamento de Morfologia, principalmente ao José Eduardo, Dona Tera e Luciana. Obrigada pelas risadas na copa!

As minhas grandes amigas da graduação, Aline, “Tati & Dani” pessoas maravilhosas que tive o privilégio de encontrar no grande percurso da vida. Obrigada pela amizade, carinho, e pelos ótimos momentos que passamos juntas na graduação e que, ainda passaremos!

À minha mãe, que merece minha eterna gratidão pelo amor, carinho e pela brilhante educação e empenho na minha formação.

Aos meus irmãos, Daniela e Júnior, pelo carinho e estímulo em todos os momentos.

A toda minha família que sempre me deu apoio em todos os momentos da minha vida. Amo todos vocês!

A minha segunda família, os Gasteropelecidae, sem ela com certeza eu não teria motivo para realizar esse trabalho!

Enfim, a Deus por tudo e por mais esta oportunidade.

Muito obrigada!!!

## RESUMO

A família Gasteropelecidae compreende um pequeno grupo de espécies de Characiformes distribuídas no Panamá e em todos os países da América do Sul, com exceção do Chile. A família é composta por três gêneros e nove espécies que são prontamente reconhecidas pela presença de um coracóide extremamente expandido e pelo tamanho das nadadeiras peitorais que permitem aos animais desse grupo realizarem longos saltos fora da água. Até o momento não há nenhum estudo do ponto de vista evolutivo para nesta família. Assim, o objetivo principal do presente trabalho foi elaborar e testar hipóteses de relacionamento entre espécies e gêneros de Gasteropelecidae e destes com outros táxons de Characiformes. Para tanto, foram seqüenciados fragmentos de três genes mitocondriais (16S rRNA, citocromo B e citocromo oxidase I) e dois genes nucleares ( $\alpha$ -tropomiosina e sia) de 19 exemplares de 9 espécies (seis gêneros) de Characiformes, incluindo representantes dos três gêneros de Gasteropelecidae. Seqüências adicionais de 43 espécies de Characiformes, obtidas no GenBank foram utilizadas nos estudos filogenéticos. As análises filogenéticas foram conduzidas pelos métodos de Máxima Parcimônia (MP) e Análise Bayesiana. Todas as filogenias obtidas foram testadas utilizando o método de *bootstrap* com 1000 pseudoréplicas e as filogenias obtidas por MP foram também testadas utilizando o índice de decaimento de Bremer. Os resultados mostraram que a família Gasteropelecidae é monofilética. Exemplares de *Gasteropelecus* formaram um grupo independente, dentro da família, irmão do clado formado por *Thoracocharax* e *Carnegiella*. A família Gasteropelecidae apareceu em todas as análises como grupo-irmão do gênero *Triportheus*



(Characidae), o que é um resultado bastante interessante considerando que os dois grupos são morfologicamente bastante similares. Com esse resultado, a hipótese de que a família Characidae não é monofilética também foi corroborada.

## ABSTRACT

The family Gasteropelecidae comprises a small group of species in the order Characiformes. It is spread throughout Panama and all South America countries, except the Chile. The family is composed by three genera and nine species that are recognized by the presence of extremely large coracoids and by the size of the pectoral fins that permit to animals from this group realize long jumps out water. Any evolutive study on this family has been conducted until now. Therefore, the main purpose in the present study was to elaborate and to test hypothesis of relationship between species and genera of Gasteropelecidae and of this family with other Characiformes taxa. DNA fragments from three mitochondrial genes (16S rRNA, cytochrome b and cytochrome oxidase I) and two nuclear genes ( $\alpha$ -trophomyosin and sia) of 19 samples of 9 species (6 genera) of Characiformes were sequenced, including samples from three genera of the Gasteropelecidae. Additional sequences from 43 species of Characiformes, obtained from GenBank were used in the phylogenetic studies. Phylogenetic trees were obtained using the Maximum Parsimony (MP) and Bayesian analyses. All obtained phylogenies were tested with the bootstrap method with 1000 pseudo replications. The phylogenies obtained with MP were also tested using the Bremer Decay indices. The results showed that the family Gasteropelecidae is monophyletic, *Gasteropelecus* is the sister group of the clade composed by *Thoracocharax* and *Carnegiella*. The family Gasteropelecidae appeared in all analysis as a sister group of the genera *Triportheus* (Characidae), wich is an interesting result because those two groups are morphologically rather similar. With that result, the hypotheses that the family Characidae is not monophyletic also was corroborated.

**Lista das abreviações usadas no presente trabalho.**

<b>Abreviações</b>	<b>Significado</b>
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
HCl	Ácido clorídrico
Kb	10 <sup>3</sup> pares de bases
Mg	10 <sup>-3</sup> grama
MgCl	Cloreto de Magnésio
min	Minuto
ml	10 <sup>-3</sup> litro
mM	10 <sup>-3</sup> 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 <sup>-6</sup> litro
µM	10 <sup>-6</sup> molar

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 Aspectos sistemáticos e taxonômicos.....	01
1.2 Considerações sobre a família Gasteropelecidae.....	08
1.3 Considerações sobre os genes utilizados.....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	24
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
3.1. MATERIAIS.....	25
3.2 MÉTODOS.....	29
3.2.1. Extração de DNA genômico de tecidos sólidos.....	29
3.2.2 Reação de amplificação.....	30
3.2.3 Visualização do DNA amplificado em gel de agarose.....	35
3.2.4 Purificação do produto da PCR.....	35
3.2.5 Reação de amplificação para o seqüenciamento.....	36
3.2.6 Purificação do DNA amplificado na reação de seqüenciamento e análise das amostras em seqüenciador ABI prism 377.....	37
3.2.7 Alinhamento e análise das seqüências e análise filogenética.....	40
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1 Gene 16S rRNA.....	46
4.2 Gene citocromo b.....	48
4.3 Gene sia.....	50
4.4 Gene trop.....	52
4.5. Análise combinada dos genes 16S, citocromo B, sia e trop.....	54
4.6 Gene citocromo oxidase I.....	57
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	60
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	68
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	69
<b>8. APÊNDICES</b> .....	
Apêndice I - Alinhamento final dos genes 16S, citocromo b, sia e trop utilizados nas análises filogenéticas.....	82
Apêndice II – Alinhamento final das seqüências parciais do gene citocromo oxidase I.....	97

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos sistemáticos e taxonômicos

Os peixes constituem mais da metade do número total de espécies de vertebrados existentes (Pough, 2003). Segundo Nelson (2006) existem aproximadamente 54.711 espécies de vertebrados, destas espécies cerca de 27.977 são espécies válidas de peixes, e desse total cerca de 26.761 espécies são Actinopterygii (peixes com nadadeiras raiadas), 1.100 de Chondrichthyes (tubarões, raias e quimeras), 108 de Myxinoidea e Petromyzontoidea (feiticeiras e lampréias) e 8 de Actinistia e Dipnoi (celacanto e pirambóia). As outras 26.734 espécies estão divididas dentro do grupo dos tetrápodos (Nelson, 2006).

Dentre os peixes há um grande número de Actinopterygii (Pough, 2003). Segundo o autor, essa predominância indica que tanto os actinopterígeos fósseis quanto os viventes podem ter taxas de especiação, principalmente alopátrica, mais altas do que aquelas estimadas para as aves ou, até mesmo, para alguns insetos. Espécies de peixes, evoluindo no isolamento de lagos, parecem levar menos tempo para se especiar do que todos os organismos altamente derivados pesquisados (vertebrados e insetos) (Pough, 2003).

Apesar de ter um elevado número de espécies, em comparação com outros grupos de vertebrados, pouco se conhece sobre sistemática, evolução, ecologia, fisiologia, etologia, morfologia e genética de peixes (Böhlke *et al.* 1978). Ainda segundo Böhlke *et al.* (1978), as razões são muitas: o ambiente em que os peixes

vivem torna sua captura, observação e a determinação de seus parâmetros biológicos mais difícil, em comparação com a maioria dos outros vertebrados.

Segundo Nelson (2006) há cerca de 515 famílias de peixes reconhecidas, 9 famílias apresentam um número considerável de espécies (mais de 400 espécies em cada uma). Estas famílias, em ordem decrescente de número de espécies são Cyprinidae, Gobiidae, Cichlidae, Characidae, Loricariidae, Balitoridae, Serranidae, Labridae, e Scorpaenidae. Esse grupo de peixes é bastante representativo correspondendo um total de 33% (9.302) de todas as espécies do mundo e, dentre essas nove famílias cerca de 66% (6.106) das espécies são de água doce.

A ictiofauna de água doce da região Neotropical é a mais rica de todo o mundo (Buckup, 1998). De acordo com Reis *et al.* (2003), das 13.000 espécies de peixes de água doce estimadas para o planeta, aproximadamente 6.000 espécies são encontradas na região Neotropical, das quais 4.475 são consideradas válidas e cerca de 1.550 são conhecidas, porém ainda não descritas formalmente. Considerando todas as espécies encontradas cerca de 37% são Siluriformes, 33% Characiformes, 9% Ciclideos, 8% Cyprinotiformes, 3% Gymnotiformes e 7% outras ordens menores. 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).

Uma hipótese para o sucesso evolutivo para dessa superordem pode ser atribuído ao “aparato de Weber”, que consiste numa série de pequenos ossos articulados que se estendem da bexiga natatória até ao ouvido interno (Briggs,

2005). Utilizando a bexiga natatória como um amplificador e a corrente de ossos como condutores, o aparelho weberiano, aumenta muito a sensibilidade auditiva dos peixes, funcionando assim, como um enorme tímpano (Pough, 2003). Esse mecanismo é de grande valia pois serve de fuga contra os possíveis predadores e pode estar relacionado também a alimentação (Pough, 2003).

A superordem Ostariophysi compreende cinco grandes ordens: Gonorhynchiformes, Cypriniformes, Characiformes, Siluriformes e Gymnotiformes (Briggs, 2005). Os siluriformes apresentam uma distribuição mais ampla podendo ser encontrados nas Américas do Norte e Sul, Eurásia e África; os cypriniformes são encontrados na Eurásia, América do Norte e África; characiformes vivem na América do sul e África; e os gymnotiformes existem somente na América do Sul (Berra, 1981). Há duas famílias de siluriformes que se tornaram adaptadas à água salgada (Ariidae e Plotosidae), e não há ocorrência dos ostariophysi na Austrália, Ilha de Madagascar e no oeste da Índia (Berra, 1981).

Dentre os Ostariophysi, os Characiformes são peixes exclusivamente de água doce e encontram-se uma maior diversidade nas principais drenagens neotropicais (Buckup, 1998). O confinamento dos Characiformes nesses habitats, tem feito deles um importante grupo-modelo para diversos estudos biogeográficos (Orti e Meyer, 1997). A aparente relação entre certos grupos de peixes de água doce entre a África e América do Sul tem sido observada pelos ictiólogos por mais de um século (Lundberg, 1993). A distribuição geográfica e a radiação dos grupos no Novo Mundo pode ter surgido por vicariância devido a movimentação das placas tectônicas e como consequência a formação de uma fenda entre esses dois continentes, originando assim o Oceano Atlântico possivelmente entre 85-100

milhões de anos atrás (Buckup, 1998; Orti e Meyer, 1997). Contudo há ocorrência de fósseis na Europa e novos conhecimentos dentro das relações filogenéticas com certos grupos de Characiformes indicam que um simples modelo de vicariância não pode explicar a presente distribuição desse grupo. Por exemplo, vários grupos africanos e neotropicais não são monofiléticos embora fiquem restritos a essas faunas continentais (Buckup, 1998 e Lundberg, 1993). Com isso, diferentes hipóteses biogeográficas surgem por consequência de hipóteses da filogenia dos Ostariophysi, e está claro que uma reconstrução filogenética é necessária (Saitoh *et al.* 2003).

Characiformes 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). Podem ser encontradas espécies 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). Os representantes dessa ordem podem viver em variados tipos de ambientes aquáticos e apresentam também, uma dieta diversificada, incluindo animais detritívoros (curimatídeos), passando por representantes herbívoros (*Colossoma* sp.) e espécies predadoras de nadadeiras e escamas e um notório grupo muito conhecido pelo seu hábito predatório – as piranhas (Orti e Meyer, 1997). Algumas espécies conseguem retirar o oxigênio do ar, para isso elas apresentam adaptações morfo-fisiológicas sobrevivendo assim, em ambientes com baixas concentrações de oxigênio, por exemplo, em pequenas poças d'água (Orti e Meyer, 1997).



Dentro da ordem Characiformes estão espécies de grande importância ecológica e econômica para o Brasil. Assim, temos muitas espécies utilizadas na pesca comercial e esportiva e na aquicultura como os curimatás (*Prochilodontidae*), piaparas e piaus (*Anostomidae*), traíras (*Erythrinidae*), pacus, tambaquis, dourados e matrinhãs (*Characidae*), entre outros. Há ainda um enorme número de espécies, principalmente da família *Characidae*, e incluindo todas as espécies de *Gasteropelecidae*, exportadas na forma de peixes ornamentais, o que tem gerado importantes divisas para o país, embora tenha causado sérios impactos ambientais, além de servirem como indicador biológico pois esses animais vivem em igarapés, ou seja, lugares que devem manter um bom estado de conservação (Chao *et al.* 2001).

O primeiro autor que propôs que os Characiformes constitui uma unidade natural foi Müller (1842) reunindo diferentes membros comparando-os previamente com outros grupos não-ostariophysian Regan (1911) foi o primeiro que utilizou o termo Characiformes, como Divisão, reconhecendo seis famílias (*Characidae*, *Gasteropelecidae*, *Xiphostomidae*, *Anostomidae*, *Hemiodontidae* e *Citharinidae*) e definindo-as por uma série de caracteres osteológicos.

Embora muitos grupos dentro da ordem Characiformes tenham sido objeto 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 sinapomórficos (ver referências em Reis *et al.* 2003), os estudos filogenéticos na ordem não são compatíveis com sua importância ecológica e econômica.

A primeira hipótese filogenética abrangente de base cladística para os Characiformes foi apresentada por Buckup (1991) e posteriormente publicada (Buckup, 1998). Esse estudo, ainda que bastante importante deve ser visto com muita cautela, pois o autor utilizou apenas de 27 táxons em seu grupo-interno, sendo apenas sete gêneros de Characidae. Nesse estudo nenhum representante de Gasteropelecidae e Serrasalminidae foram incluídos, como pode ser observado na Figura 1.

Malabarba & Weitzman (2003), em uma análise visando posicionar filogeneticamente seu novo gênero de Characidae *Cyanocharax*, propuseram, com base na presença de ganchos principalmente nos raios das nadadeiras pélvicas e anal de machos adultos, um grupo monofilético de “characids” incluindo Gasteropelecidae, Roestinae, Serrasalminae, Cheirodontinae, Characinae, Stethaprioninae, Iguanodectinae, Aphyocharacinae, Rhoadsiinae, parte de Tetragonopterinae juntamente com gêneros *Incertae Sedis*, os gêneros *Salminus*, *Brycon*, *Bryconops*, *Lignobrycon*, *Triportheus* e o chamado “Clade A”. Este último definido pela presença sinapomórfica de uma nadadeira dorsal com fórmula ii, 8 raios e quatro dentes na série interna do pré-maxilar. O “Clade A” de Malabarba & Weitzman (2003) inclui, além de *Cyanocharax* e todos os Glandulocaudinae, os gêneros *Piabina*, *Creagrutus*, *Caiapobrycon*, *Boehlkea*, *Bryconacidnus*, *Ceratobranchia*, *Hemibrycon*, *Knodus*, *Microgenys*, *Montocheirodon*, *Odontostoechus*, *Othonocheirodon*, *Piabarchus*, *Rhinobrycon*, *Rhinopetitia*, *Attonitus* e *Hypobrycon*. A família Gasteropelecidae, cujos membros apresentam espinhos ósseos nos raios das nadadeiras e o osso supra-orbital, foram agrupados com Roestinae, *Salminus*, *Serrasalminae*, *Brycon*, *Bryconops*,

*Lignobrycon* e *Triportheus* (Figura 2). Apesar de representar um avanço no entendimento das relações filogenéticas em Characiformes e particularmente em Characidae, o estudo foi baseado em relativamente poucos caracteres (todos observáveis sem dissecção) sendo que a maior parte dos táxons do “Clade A” é parte de uma grande politomia não resolvida. Além disso, recentemente Vari e Ferraris (no prelo) relataram a presença de ganchos nas nadadeiras de membros da família africana de Characiformes Distichodontidae.

Os estudos filogenéticos, utilizando dados de seqüência de DNA, com representantes da ordem Characiformes tiveram início em 1996 com a publicação de um estudo sobre a filogenia das piranhas e pacus (Ortí *et al.* 1996), sugerindo a existência de um padrão de relacionamento intergenérico ainda não conhecido para o grupo. Estudos abrangentes com representantes da ordem Characiformes foram publicados por Ortí e Meyer (1996 e 1997) e os resultados foram revistos e analisados, em conjunto, por Ortí (1997), como mostra a Figura 3. Essas filogenias resultantes desses dois trabalhos são bastante diferentes das demais propostas para a ordem Characiformes com base em caracteres morfológicos e muitos nós não são suportados por valores altos de *bootstrap*. Essas discrepâncias podem estar relacionadas ao pequeno número de grupos estudados e a pequena quantidade de dados moleculares avaliada. Por outro lado, as relações intergenéricas foram bem suportadas nas análises estatísticas. Na filogenia obtida com genes mitocondriais, Gasteropelecidae (representada pelos gêneros *Carnegiella* e *Gasteropelecus*) aparece como grupo-irmão de Anostomidae, Chilodontidae e Crenuchidae (Figura 4). Nas filogenias obtidas utilizando um gene nuclear

Gasteropelecidae (representada pelo gênero *Gasteropelecus*) aparece como grupo-irmão dos Characidae dos gêneros *Gymnocorymbus* e *Paracheirodon*.

Mais recentemente, Calcagnotto *et al.* (2005) estudaram 135 táxons da ordem Characiformes representando todas famílias da África e América do Sul, com exceção de Curimatidae e Gasteropelecidae, utilizando seis genes sendo dois do DNA mitocondrial (16S e citocromoB) e quatro nucleares (Rag2, Fkh, Sia e Trop). A análise de 3660 caracteres resultou em 18 árvores construídas com o método de máxima parcimônia. O uso de espécies de Siluriformes e Cypriniformes como grupos externos mostrou que a ordem Characiformes é monofilética. Os grupos africanos e sul-americanos não formaram unidades monofiléticas. Algumas das relações entre as famílias de Characiformes aparecem bem resolvidas como a monofilia de Distichodontidae e sua posição basal em relação aos demais Characiformes. A relação entre Alestidae e Characidae ficou evidente. Nesse estudo Cynodontidae e Serrasalminidae aparecem mais relacionados às famílias Parodontidae, Hemiodontidae, Anostomidae, Curimatidae, Chilodontidae e Prochilontidae. As relações entre representantes da família Characidae foram bem resolvidas, porém somente 24 gêneros foram amostrados.

## **1.2 Considerações sobre a família Gasteropelecidae**

A família Gasteropelecidae compreende um pequeno grupo de espécies de Characiformes distribuídas no Panamá e em todos os países da América do Sul com exceção do Chile (Weitzman e Palmer, 2003).

Os gasteropelecides chamados popularmente de borboletas ou “hatchetfishes”, podem ser diferenciados de todos os outros Characiformes por terem uma cabeça muito reduzida, serem de pequeno porte não ultrapassando 12 cm, e apresentarem uma pequena linha lateral. Quanto as nadadeira encontramos as seguintes diagnoses: a pélvica é diminuta, a dorsal está bem atrás do corpo tendo de 8 a 17 raios, a anal é longa e apresenta de 22 a 44 raios, a caudal é sempre furcada, a adiposa está presente, exceto no gênero *Carnegiella* e a peitoral é bem desenvolvida, podendo alcançar a nadadeira anal (Weitzman, 1960; Nelson, 2006). Ainda segundo Weitzman (1960) aparentemente há uma fusão dos ossos pós-temporal e supra-cleito, o cleitro de cada lado é fusionado, o pós-cleitro está ausente e os ossos frontais apresentam cristas formando 4 vales, estes são preenchidos com tecido sensorial podendo estar relacionado com a alimentação ou com a fuga de predadores, pois são capazes de sentir perturbações na água. Esses peixes são invertívoros de superfície e são também prontamente reconhecidos pela presença de um coracóide extremamente expandido e pelo tamanho das nadadeiras peitorais que permitem aos animais desse grupo realizarem longos saltos fora da água (Wiest, 1995). Associado a esse coracóide expandido esses peixes apresentam músculos bem desenvolvidos e fixados aos ossos das nadadeiras peitorais, estruturas estas bem semelhantes a asas das aves (Géry, 1977 e Wiest. 1995).

Alguns autores sugeriram que os gasteropelecides poderiam “voar” fora da água porém não conseguiam explicar esse movimento (Géry, 1977). A principio esses “vôos” seriam realizados com o auxílio das nadadeiras peitorais, mas estudos recentes mostraram que os animais somente planam quando fora da

água (Wiest, 1995; Weitzman e Palmer, 1996). Wiest (1995) estudou o comportamento de salto desses peixes, usando um equipamento especial de fotografia de alta velocidade (200 a 500 fotos por segundo) e observou que esses animais não usam as nadadeiras peitorais enquanto saltam. Eles deixam a superfície da água impulsionando as nadadeiras peitorais para baixo, contra a água, e com a ajuda da nadadeira caudal propulsiona o peixe para fora d'água. Algumas hipóteses para tentar explicar esse comportamento seriam: ele estaria relacionado à fuga de predadores, ou devido ao seu hábito alimentar (esses peixes podem comer pequenos insetos aéreos).

Segundo Weitzman e Palmer (2003), a família é composta por três gêneros e nove espécies. O gênero *Carnegiella* apresenta as espécies *C. marthae*, *C. myersi*, *C. schereri* e *C. strigata*, ocorrendo em diversas partes da bacia Amazônica. Algumas espécies também são nativas das Guianas e a espécie *C. marthae* ocorre na bacia do Orinoco (Venezuela). O gênero *Gasteropelecus* apresenta duas espécies: *G. maculatus* que ocorre no oeste e noroeste dos Andes da Colômbia e Panamá e está presente também na bacia do Maracaibo (Venezuela), a espécie *G. sternicla* encontra-se nas bacias do Amazonas e Orinoco além de rios costeiros das Guianas Inglesa e Francesa e do Suriname. Há possivelmente uma terceira espécie de *Gasteropelecus*, *G. levis* esta espécie é encontrada na parte oriental da bacia Amazônica (Weitzman e Palmer, 1996). E finalmente, o gênero *Thoracocharax* apresenta duas espécies, *T. stellatus* amplamente distribuída pelas bacias do Orinoco, Amazônica e do Rio Paraguai, e a espécie *T. securis* encontrada na bacia Amazônica (Weitzman e Palmer, 1996).

Ainda que a maioria das espécies da família já devam ter sido descritas, análises mais acuradas de amostras de diferentes localidades podem revelar a existência de espécies adicionais (Weitzman e Palmer, 2003). As espécies do gênero *Carnegiella* são um exemplo dessa problemática. *Carnegiella marthae*, as vezes chamadas de borboleta de asa-preta, há certamente uma diferença entre os números dos raios da nadadeira anal entre as espécimes do Rio Orinoco e do Rio Negro (entre 22 e 25 raios); com as espécimes da Amazônia Peruana e do Rio Madeira (26 e 30 raios) (Géry, 1977). A forma típica dos rios Orinoco-Negro têm sido chamada de *Carnegiella marthae marthae*, e a da Amazônia Peruana é denominada *Carnegiella marthae schereri* (Géry, 1977).

Denominada muitas vezes de “borboleta prateada”, *C. vesca* da região das Guianas e *C. strigata* da bacia Amazônica foram consideradas espécies distintas (Weitzman 1954 e 1970), com base no formato do corpo, padrão de coloração e algumas outras diferenças. Somente depois de alguns estudos de populações de muitas localidades as “borboletas prateadas” das bacias do rio Orinoco e Amazonas, e dos rios costeiros das Guianas, foram encontradas variações tanto padrão de cor quanto no formato do corpo muito mais complexas do que se pensava (Weitzman e Weitzman, 1982). Assim foi considerado que apesar ter existirem essas diferenças seria melhor considerar uma única espécie, *Carnegiella strigata* (Weitzman e Palmer, 1996). Porém, estudos mais aprofundados ainda precisam ser feitos para tentar resolver esse problema (Weitzman e Palmer, 2003).

Nesse sentido, o estudo citogenético conduzido com uma amostra de *Thoracocharax* coletada no Igarapé São Francisco (Rio Branco, Acre) mostrou que

a mesma apresentava características citogenéticas próprias e uma análise morfológica geral dos exemplares mostrou que haviam diferenças significativas entre esses animais e os tipos da espécie o que levou os autores a assinalarem o nome da espécie como *Thoracocharax cf. stellatus* (Carvalho *et al.* 2002), segundo recomendação do Dr. Heraldo A. Britskii que examinou detalhadamente os espécimes.

Os primeiros trabalhos relacionados a essa família foram feitos por Weitzman (1954) e aprofundado e revisto em 1960, sugerindo, com base principalmente em suas observações osteológicas, que o gênero *Thoracocharax* representava uma linhagem independente dentro do grupo (nomeada no trabalho de 1960 de tribo Thoracocharacini) e que os gêneros *Gasteropelecus* e *Carnegiella* representavam grupos irmão pertencentes à uma segunda linhagem (nomeada no trabalho de 1960 de tribo Gasteropelecini). Ainda segundo Weitzman (1954 e 1960), *Carnegiella* parecia representar uma forma neotênica de *Gasteropelecus* e diretamente derivada dela.

Do ponto de vista filogenético, há poucos trabalhos relacionados com essa família. Orti (1997) usando dois genes mitocondriais (12S e 16S rRNA) e um gene nuclear (Ependimina) obteve duas filogenias. Na filogenia obtida com os genes mitocondriais, Gasteropelecidae (representada pelos gêneros *Carnegiella* e *Gasteropelecus*) aparece como grupo-irmão de Anostomidae, Chilodontidae e Crenuchidae. Nas filogenias obtidas utilizando um gene nuclear Gasteropelecidae (representada pelo gênero *Gasteropelecus*) aparece como grupo-irmão dos Characidae dos gêneros *Gymnocorymbus* e *Paracheirodon*.



O posicionamento filogenético de Gasteropelecidae é ainda um problema. Buckup (1998) preferiu posicionar a família no grupo dos *incertae sedis* dentro de Characoidea, devido as suas características morfológicas, bastante peculiares. Malabarba & Weitzman (2003), usando caracteres morfológicos tentou posicionar filogeneticamente seu novo gênero de Characidae *Cyanocharax* inclui em seu estudo a família Gasteropelecidae. Apesar de representar um avanço no entendimento das relações filogenéticas em Characiformes, na topologia final formou-se uma grande politomia não resolvida incluindo a família Gasteropelecidae juntamente com as subfamílias Roestinae, Serrasalminae e os gêneros *Salminus*, *Brycon*, *Bryconops*, *Lignobrycon*, *Triportheus*.

Quanto aos estudos citogenéticos também há poucos estudos relacionados com esse grupo. Hinegardner e Rosen (1972) estudaram a quantidade de DNA em 275 espécies de peixes teleósteos, o máximo encontrado foi em *Corydoras aeneus* com 4,4 picogramas de DNA e o mínimo encontrado foi na espécie *Tetraodon fluviatilis* com 0,39 picograma de DNA. A média geral ficou em torno de 1,2 picograma já o conteúdo de DNA dos Gasteropelecidae representados por duas espécies, *Carnegiella strigata* e pelo *Gasteropelecus levis* foram de 1,4 picograma de DNA. Ainda segundo esses autores a quantidade de DNA encontrada no núcleo não significa que uma espécie é mais ou menos derivada que a outra.

Scheel (1973) fez uma caracterização cariotípica de 359 espécies de teleósteos, dentre eles 2 gêneros (2 espécies) de Gasteropelecidae. *Carnegiella strigata* com um número haplótipo  $n=24$  e com 45 braços de cromossomos, e outra espécie estudada foi *Gasteropelecus sternicla* com  $n= 27$  e 38 braços

cromossomais. Segundo Carvalho *et al.* (2002) os números diplóides variam de  $2n=48$  a  $2n=54$  em Gasteropelecidae e algumas diferenças foram observadas para populações locais. Uma característica comum para a família Gasteropelecidae é a presença de muitos cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos. Todas espécies analisadas apresentaram NORs simples. O conteúdo de DNA nuclear varia de  $2,18 \pm 0,09$  pg DNA/núcleo em *Thoracocharax cf. stellatus* a 2,8 pg em *Carnegiella strigata* e *Gasteropelecus levis*, sugerindo que pequenas mudanças no conteúdo de DNA foram fixadas durante a evolução do grupo. A espécie *Thoracocharax cf. stellatus* apresentou um sistema de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW (Carvalho *et al.* 2002).

### **1.3 Considerações sobre os genes utilizados**

O estudo das relações entre organismos tem recebido, nos últimos anos, um considerável impulso com o advento das técnicas de seqüenciamento de DNA. O estudo filogenético empregando seqüências parciais 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 (Miya *et al.* 2003; Obermiller e Pfeiler, 2003; Banford *et al.* 2004; Doadrio e Dominguez, 2004; Hrbek *et al.* 2004; Inoue *et al.* 2004; Shimabukuro-Dias *et al.* 2004; Peng *et al.* 2006 entre muitos outros).

Segundo Peng *et al.* (2006) o genoma mitocondrial inteiro tem sido seqüenciado em diversos grupos de vertebrados incluindo muitos peixes (carpa,

Chang *et al.* 1994; lampréia, Lee e Kocher, 1995; bacalhau, Johansen e Bakke, 1996; bichir, Noack *et al.* 1996; celacanto Zardoya e Meyer, 1997; peixe cachorro, Delarbre *et al.* 1998, catfish, Jondeung *et al.* 2007, entre outros).

Características peculiares, como herança uniparental, geralmente materna, a ausência de recombinação e as altas taxas evolutivas, quando comparado ao genoma nuclear, fizeram do DNA mitocondrial (mtDNA) uma ferramenta importante no estudo das relações evolutivas entre indivíduos, espécies e populações (Calcagnotto, 2004).

De acordo com Peng *et al.* (2006) o genoma mitocondrial em vertebrados é inteiramente conservado. Na verdade, a organização gênica conservada do mtDNA é encontrada em alguns grupos taxonômicos (mamíferos placentários, tartarugas, alguns peixes ósseos e cartilagosos e anfíbios), enquanto outros grupos (aves, alguns répteis e marsupiais) apresentam variação no número e na ordem dos genes (Nahum, 2004).

A taxa de substituições sinônimas (quando um nucleotídeo é substituído por outro sem causar alteração no aminoácido resultante) no genoma mitocondrial de vertebrados foi estimada em  $5,7 \times 10^{-8}$ /sítio/ano (Brown *et al.* 1982). Ainda segundo esse autor, este valor é cerca de 10 vezes maior do que o encontrado no genoma nuclear. Em relação às substituições não sinônimas (quando há alteração no aminoácido), há uma grande variação entre os 13 genes que codificam para proteínas, dependendo das restrições funcionais, a exemplo dos genes nucleares. A alta taxa de substituição de nucleotídeos pode ser devida a uma alta de mutação que, por sua vez, poderia estar sendo causada pelo excesso de resíduos metabólicos, ou pela ausência de um mecanismo de reparo (Li, 1997).

Pesole *et al.* (1999), analisando a variabilidade da taxa de substituição de nucleotídeos em diferentes regiões funcionais do mtDNA de mamíferos, verificaram que existe uma grande variabilidade em termos da dinâmica evolutiva da molécula. A taxa de substituição de nucleotídeos varia dependendo da região considerada. Os sítios não sinônimos, o domínio central da região controladora e os genes que codificam para tRNAs e rRNAs apresentam taxas mais baixas do que os sítios sinônimos e do que as duas regiões periféricas da região controladora (Pesole *et al.* 1999).

O tamanho do genoma mitocondrial pode variar de 6 Kb (*Plasmodium falciparum*) a 20.000 Kb (*Porphyra purpurea*) e é geralmente uma molécula circular e fechada, não há presença de íntrons e alguns genes se sobrepõem (Nahum, 2004).

Segundo Lewin (2004) há 13 genes que codificam proteínas. Ainda de acordo com esse autor, todas as proteínas fazem parte da cadeia respiratória, envolvidas na fosforilação oxidativa e transporte de elétrons. Os genes envolvidos nesses processos são os seguintes: citocromo b, as 3 subunidades do citocromo oxidase, uma das subunidades da ATPase e 7 subunidades de NADH desidrogenase. A molécula de mtDNA apresenta também 2 genes que codificam RNAs ribossômicos (rRNAs 12S e 16S), e 22 genes que codificam RNAs transportadores (tRNAs) (Brown, 1999). A presença desses genes para rRNAs e tRNAs significa que não há necessidade de importar esses genes para a mitocôndria vindos do citoplasma (Brown, 1999). Ainda de acordo com Brown (1999) os genes estão presentes apenas para 22 tRNAs, menos que o mínimo geralmente necessário para ler o código genético. Isto significa que as regras-

padrão de pareamento códon-anticódon têm que ser suplementadas por uma “superoscilação” que permite que alguns tRNAs reconheçam todos os quatro códons de uma única família. Peng *et al.* (2006) esta característica conservada facilita o alinhamento e a identificação das espécies

No genoma mitocondrial, dois grupos de genes são mais amplamente utilizados, os que codificam para rRNA e para proteínas. Os genes ribossomais são mais conservados, embora contenham uma região que possui variação suficiente para ser utilizada na reconstrução filogenética no nível de espécie. Entre os genes mitocondriais que codificam proteínas, há uma grande variedade de níveis de conservação. Por exemplo, o gene para COI é altamente conservado, enquanto os para ATPase 6 e 8 são altamente variáveis (Hillis *et al.* 1996).

O gene 16S rRNA faz parte da grande subunidade ribossomal do mtDNA assim como o 12S rRNA (Palumbi *et al.* 1996). As seqüências desse gene são razoavelmente conservadas e evolui mais devagar do que o genoma mitocondrial como um todo (Palumbi *et al.* 1996). Ainda segundo esse autor, existe uma considerável variação em algumas espécies, podendo ser usado para estudos em nível de população.

O gene citocromo b codifica uma proteína relacionada a cadeia de transporte de elétrons. A química e ação dessa proteína ainda não são bem conhecidas (Palumbi *et al.* 1996). Irwin *et al.* (1990) examinaram, a evolução do citocromo b em mamíferos e Martin e Palumbi (1993) compararam esses resultados da evolução dessas proteínas em tubarões. Ambos estudos observaram que o nível de conservação variou significativamente em diferentes

partes do gene citocromo b. A região final 3' do sentido da fita é mais variável, enquanto a parte codificante do gene é altamente conservado.

O gene da subunidade citocromo oxidase também participa da cadeia transportadora de elétrons (Palumbi, *et al.* 1996). Ainda segundo esse autor, esta seqüência de nucleotídeos é altamente conservada, característica importante, pois é fácil alinhar as seqüências e pode-se desenhar *primers* universais.

No presente trabalho foram utilizados fragmentos de três genes mitocondriais (16S rRNA, citocromo b e citocromo oxidase I) e dois genes nucleares (Sia e Trop). O uso desses genes tem sido utilizado com sucesso em estudos filogenéticos de diversos grupos de vertebrados apresentando resultados (peixes, Calcagnotto *et al.* 2005; sapos, García-París *et al.* 2003; aves, Ericson *et al.* 2006; cervídeos, Gilbert *et al.* 2006; cobras, Noonan *et al.* 2006; boi, Robiquet *et al.* 2005 entre outros).

O uso de genes nucleares em trabalhos de filogenia é bem interessante, pois esses genes apresentam taxas evolutivas mais lentas (os genes são mais conservados) do que em relação aos genes mitocondriais, conseqüentemente pode-se resolver as relações de grupos taxonômicos superiores, nível de família e ordens, por exemplo (Slowinski e Page, 1999). Ainda segundo esses autores, o ideal seria combinar dados obtidos de mtDNA e de nuDNA, pois as histórias dos genes são independentes, porém, existe uma desvantagem de reunir esses resultados, pois os dados deverão ser consistentes.

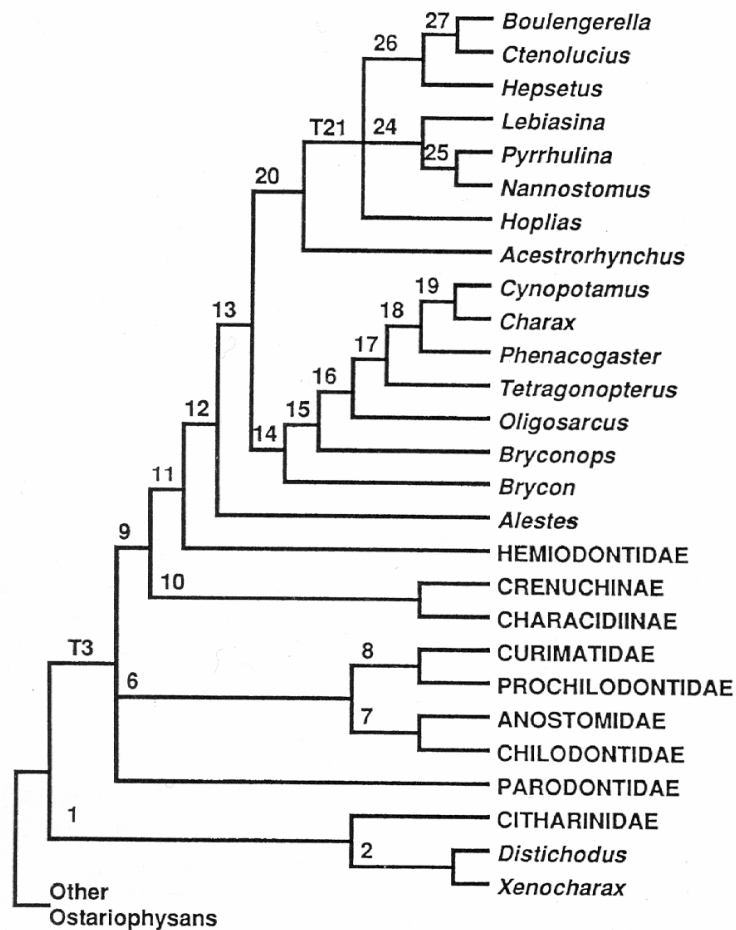
O gene nuclear  $\alpha$ -tropomiosina é responsável pela produção de uma proteína – tropomiosina – que em conjunto com outra proteína, Troponina,

medeiam a regulação da contração dos músculos esqueléticos por meio dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  (Alberts, *et al.* 2006).

De acordo com Matsuzawa *et al.*, (1998), em *Drosophila* o gene *sina* (*seven in absentia*) é um gene que está relacionado com o desenvolvimento do olho. Em vertebrados, existe um gene homólogo ao *sina*, chamado Siah (SINA-homologous) e está organizado em uma família (Siah-1A, Siah-1B e Siah-2). Segundo esses autores embora as funções das proteínas produzidas a partir dessa família de genes não sejam conhecidas totalmente, acredita-se que Siah-1B, identificada recentemente, pode estar relacionada com a proliferação celular.

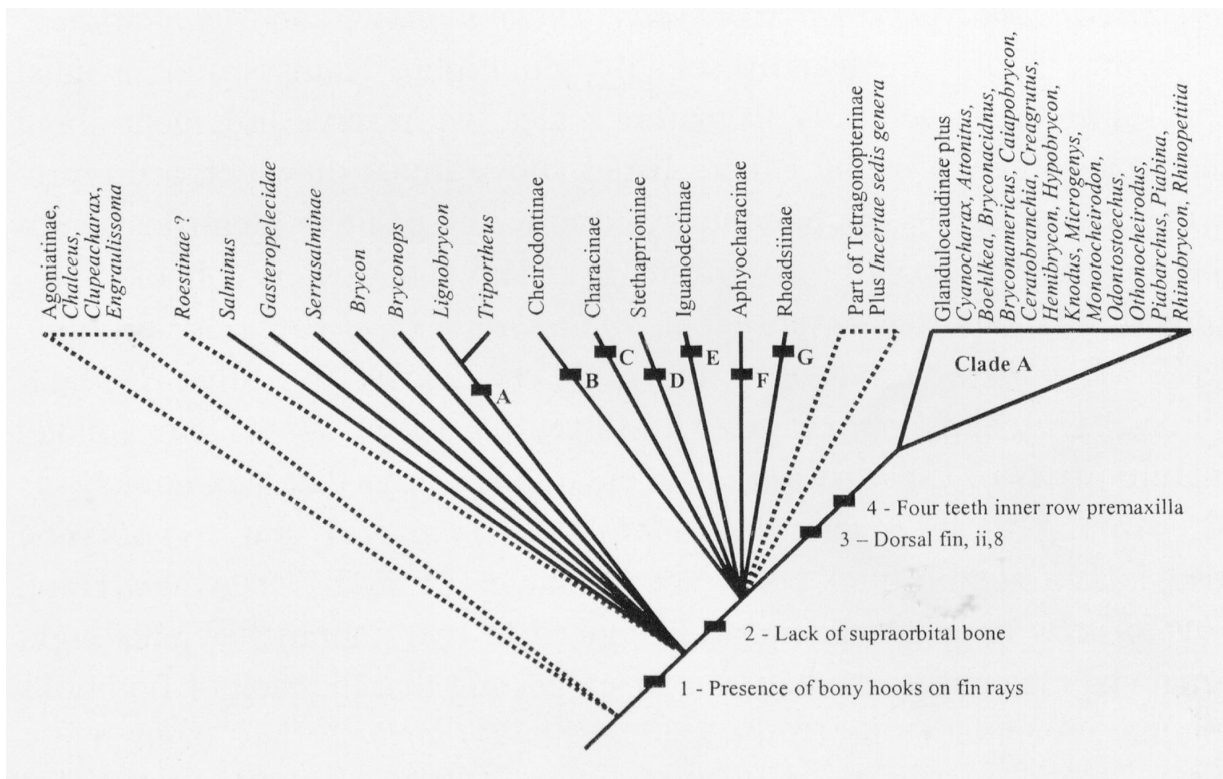
Kim *et al.*, (2006) analisaram pela primeira vez, a regulação do gene *siah* em humanos e concluíram que esse gene é controlado pela concentração de ácido retinóico. O ácido retinóico é um metabólito ativo da vitamina A e está relacionado com a regulação do desenvolvimento do sistema nervoso central, por exemplo, a migração das cristas neurais e pela diferenciação das células mielóides.

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; Lavoué *et al.* 2003; Hardman, 2004; Near *et al.* 2004; Moyer *et al.* 2004; Quenouille *et al.* 2004; Calcagnotto *et al.* 2005) e espera-se que nos próximos anos muitas filogenias baseadas em genes nucleares estejam disponíveis.

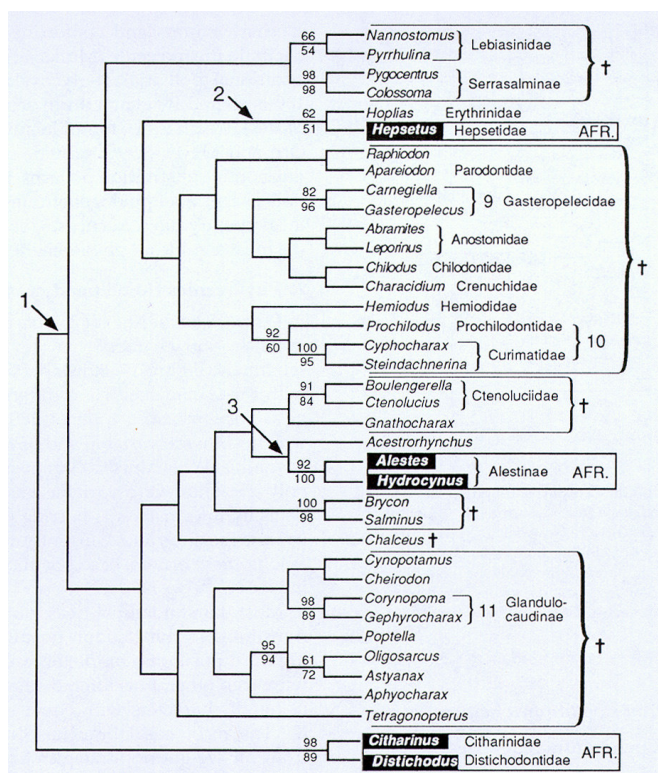


**Figura 1.** Hipótese de relacionamento entre as famílias de Characiformes e alguns gêneros de Characidae segundo Buckup (1998). Os números identificam os clados discutidos pelo autor da hipótese.





**Figura 2.** Cladograma resumindo o conhecimento atual sobre as relações de Characidae, Gasteropelecidae e Roestinae segundo Malabarba e Weitzman (2003).



**Figura 3.** Árvore de consenso obtida para 38 táxons de Characiformes utilizando seqüências parciais dos genes mitocondriais 12S e 16S rRNA, segundo Ortí (1997). Os números acima e abaixo dos ramos representam os valores de bootstrap obtidos nas análises de máxima parcimônia e “neighbor-joining” respectivamente. Os gêneros marcados em negro representam grupos africanos.



## 2. OBJETIVOS

O presente estudo está associado diretamente ao Projeto Temático “Relações filogenéticas em Characidae (Ostariophysi: Characiformes)” que tem por objetivo principal a análise das inter-relações filogenéticas de representantes de todos gêneros de Characidae reconhecidos como válidos e das famílias de Characiformes já consideradas. Ainda que a família Gasteropelecidae seja bem conhecida sob o ponto de vista taxonômico até o momento nenhum estudo evolutivo foi realizado com este grupo. Assim, o conhecimento atual sobre as relações internas do grupo e suas relações com outros Characiformes são praticamente desconhecidas. Por isso, como objetivos específicos foram:

- 1- Elaborar e testar hipóteses de relacionamento entre os gêneros e espécies da família Gasteropelecidae;
- 2- Elaborar e testar hipóteses de relacionamento da família Gasteropelecidae com outros táxons de Characiformes.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

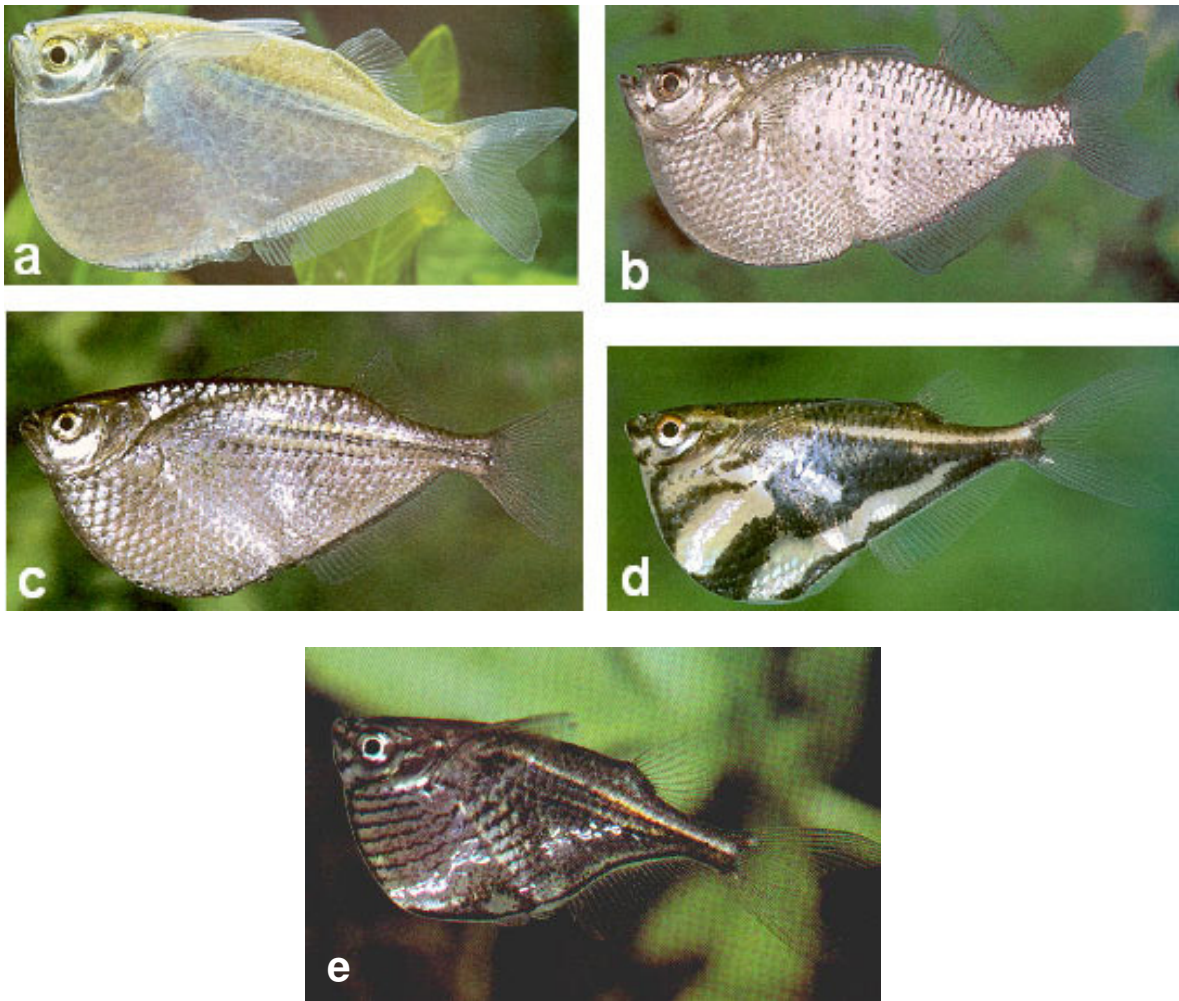
Foram analisados de 19 exemplares de 9 espécies (seis gêneros) de Characiformes, incluindo representantes dos três gêneros de Gasteropelecidae (Tabelas 1 e 2). A Figura 8 mostra representantes da família Gasteropelecidae. Os animais foram obtidos através de coletas realizadas ao longo do período de estudo, de amostras da coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do IB/UNESP, campus de Botucatu e através de doação do Smithsonian Institution do Panamá (*Gasteropelecus maculatus*) e da Universidade de Oriente da Venezuela (*Thoracocharax stellatus*). Todos os exemplares coletados foram fixados em formol 4%, conservados em álcool 70% e encontram-se depositados na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia, IB-UNESP de Botucatu, SP, para identificação e realização de estudos futuros de taxonomia e sistemática. Os pontos de coleta estão mostrados na Figura 9.

**Tabela 1.** Espécies da família Gasteropelecidae utilizadas no presente estudo.

LOTE LBP	REGISTRO	ESPÉCIE	LOCALIDADE	MUNICÍPIO	Latitude/Longitude
2512	17027 17030	<i>Carnegiella strigata</i>	Aquário	-	-
3167	19318	<i>Carnegiella strigata</i>	Rio Preto da Eva	Rio Preto da Eva/AM	S 02°45'16.6" W 59°37'30.9"
4177	22802	<i>Carnegiella strigata</i>	Igarapé Preto	Cruzeiro do Sul/AC	S 07°35'33.4" W 72°45'17.7"
4200	23602	<i>Carnegiella strigata</i>	Igarapé Puxirituba	Barcelos/AM	S 00°53'18.6" W 62°40'36/1"
4199	23601	<i>Carnegiella marthae</i>	Igarapé Puxirituba	Barcelos/AM	S 00°53'18.6" W 62°40'36/1"
1588	11714 11716	<i>Thoracocharax stellatus</i>	Rio das Garças	Barra do Garças/MT	S 15°54'18.1" W 52°19'24.2"
1694	12769	<i>Thoracocharax stellatus</i>	Lago do Vanico	Carero/AM	S 03°09'17.3" W 59°53'12.3"
4179	22801	<i>Thoracocharax stellatus</i>	Rio Moa	Mâncio Lima/AC	S 07°26'35.5" W 73°03'33.5"
3942	22595 22596	<i>Thoracocharax stellatus</i>	Rio Orinoco	Caicara del Orinoco/Bolivar/Venezuela	N 07° 38'30.3" W 66° 18'38.0"
3291	19869	<i>Gasteropelecus maculatus</i>	Rio Iglesia	Panamá	N 08°25'23" W 78°00'05"
3298	19871	<i>Gasteropelecus maculatus</i>	Rio Colicordia	Panamá	N 08°39'39,4" W 77°47'35.7"
4070	22803 22974	<i>Gasteropelecus sternichla</i>	Rio Japiim	Mâncio Lima/AC	S 07°34'28.8" W 72°55'24.9"

**Tabela 2.** Espécies adicionais da ordem Characiformes sequenciadas no presente estudo.

LOTE LBP	REGISTRO	ESPÉCIE	LOCALIDADE	MUNICÍPIO	Latitude/Longitude
1815	13112	<i>Bryconops</i> sp.	Córrego Água Funda	Barra do Garças/MT	S 15°52'40.1" W 52°18'15.0"
2711	7616	<i>Salminus hilarii</i>	Represa Jurumirim	Itatinga/SP	S 19°34,630' W 57°01,123'
850	9025	<i>Salminus brasiliensis</i>	Rio Mogi-Guaçu	Pirassununga/SP	S 21°55'37.6" W 47°22'04.4"
39	3501	<i>Triporthesus pantanesis</i>	Rio Miranda	Corumbá/MS	S 19°34,630' W 57°01,123'
2663	15580	<i>Triporthesus orinocensis</i>	Laguna de Castilleros	Caicara Del Orinoco/Bolivar/Venezuela	N 07°30'50,9" W 66°09'19,8"



**Figura 8.** Representantes da família Gasteropelecidae. (a) *Thoracocharax stellatus*; (b) *Gasteropelecus maculatus*; (c) *Gasteropelecus sternicla*; (d) *Carnegiella strigata*, (e) *Carnegiella marthae*.



**Figura 9.** Locais de coleta de *Carnegiella strigata*: (A) Rio Preto da Eva, Rio Preto da Eva, AM; (B) Igarapé Preto, Cruzeiro do Sul, AC; (C) Igarapé Puxirituba, Barcelos, AM; *Carnegiella marthae*: (C) Igarapé Puxirituba, Barcelos, AM; *Thoracocharax stellatus*: (D) Rio das Garças, Barra do Garças, MT; (E) Lago do Vanico, Carero, AM (F) Rio Moa, Mâncio Lima, AC; (G) Rio Orinoco, Caicara del Orinoco, Bolivar, Venezuela; *Gasteropelecus maculatus*: (H) Rio Iglesi, Panamá; *Gasteropelecus sternichla*: (I) Rio Japiim, Mâncio Lima, AC; *Bryconops* sp.: (J) Córrego Água Funda, Barra do Garças, MT; *Salminus hilarii*: (L) Represa Jurumirim, Itatinga, SP; *Salminus brasiliensis*: (M) Rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, SP; *Triportheus pantanensis*: (N) Rio Miranda, Corumbá, MS; *Triportheus orinocensis*: (O) Laguna de Castelleros, Caicara del Orinoco, Bolivar, Venezuela. Os números no mapa indicam as bacias hidrográficas da região Neotropical: (1) Bacia do Amazonas, (2) Bacia do Orinoco, (3) Bacia das Guianas, (4) Bacia do Magdalena, (5) Bacia da Região Costeira Ocidental, (6) Bacia do Nordeste, (7) Bacia do São Francisco, (8) Bacia do Prata, (9) Bacia da Região Costeira Oriental, (10) Bacia da Patagônia.



## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Extração de DNA genômico de tecidos sólidos

O DNA total foi extraído de tecidos preservados em etanol 95%, usando a técnica descrita por Sambrook *et al.* (1989), que consiste resumidamente dos seguintes passos: liberação do DNA pela ação combinada de detergentes, proteinase K e RNase, lavagem com fenol/clorofórmio e precipitação do DNA pelo cloreto de sódio e etanol, conforme descrito a seguir:

- a) fragmentar os pedaços de fígado, brânquias ou músculos em cadinhos com macerador;
- b) adicionar ao tecido 500 µl de solução de digestão (NaCl 5M; Tris-HCl 2M pH=8,0; EDTA 0,5M pH=8,0; SDS 10%; Proteinase K 10mg/ml; Água Milli-Q)
- c) transferir o tecido macerado com a solução para um microtubo de 1,5ml;
- d) colocar em banho-maria a 55°C por 2 horas. Passado esse tempo, cada microtubo recebe 2,0µl de RNase (10mg/ml), permanecendo por mais duas horas no banho a essa temperatura;
- e) retirar os tubos do banho-maria e adicionar 500µl de Fenol;
- f) agitar os tubos suavemente por cerca de 10 minutos, até misturar bem os componentes;
- g) centrifugar por 15 minutos a 13.000 rpm
- h) transferir o sobrenadante (DNA) para microtubos novos, tomando cuidado para não pegar a camada de proteínas;

- i) repetir os itens e a h por 2 vezes;
- j) adicionar Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (25:24:1)
- k) repetir os passos f ao h
- l) acrescentar 1/10 volume de NaCl 5M (50µl) + 2 volumes de etanol 100% (1000µl) gelado e agitar suavemente para precipitar o DNA;
- m) centrifugar por 30 minutos a 13.000 rpm;
- n) descartar o sobrenadante, acrescentar 1000µl de etanol 70% gelado e centrifugar por 15 minutos a 13.000 rpm;
- o) descartar o sobrenadante e levar o microtubo para a estufa a 37°C até evaporar todo o álcool;
- p) adicionar até 200µl de água Milli-Q para eluir o DNA.

A integridade do DNA foi checada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A quantidade de DNA foi avaliada por comparação com um marcador de peso molecular (*Low DNA Mass* – Invitrogen), mediante o programa computacional Kodak Digital Science 1D.

### **3.2.2 Reação de amplificação**

Para amplificar os fragmentos dos genes de todas as espécies usadas no presente trabalho, utilizou-se a tecnologia de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e *primers* (Tabela 3) específicos desenhados a partir das seqüências prévias publicadas por Calcagnoto *et al.* (2005). Alguns *primers* (Cyt b H 15915b, L5698-Asn e H7271-COI) foram desenvolvidos pelo Dr. Claudio de Oliveira e têm sido

utilizados com sucesso em projetos de seqüenciamento de diversos grupos de peixes.

**Tabela 3:** Seqüências dos *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos dos genes.

Gene	Seqüência do <i>Primer</i> *	Referência
16S ar	ACG CCT GTT TAT CAA AAA CAT	Kocher <i>et al.</i> , (1989)
16S br	CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T	Kocher <i>et al.</i> , (1989)
Cyt b L 14841	CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA	Kocher <i>et al.</i> , (1989)
Cyt b H15915b	AAC CTC CGA TCT TCG GAT TAC AAG AC	Kocher <i>et al.</i> , (1989)
L-5698-Asn	AGG CCT CGA TCC TAC AAA GKT TTA GTT AAC	Inoue <i>et al.</i> , (2001)
H 7271- COI	GTG GTG GCG TCA TAC AAT AAA	Novo
TROP F	GAG TTG GAT CGC GCT CAG GA GCG	Calcagnotto <i>et al.</i> , (2005)
TROP R	CGG TCA GCC TCT TCA GCA ATG TGC TT	Novo
Sia/T3 <sup>b</sup>	ATT AAC CCT CAC TAA AGT CGA GTG CCC CGT GTG YTT YGA YTA	Calcagnotto <i>et al.</i> , (2005)
Sia/T7 <sup>b</sup>	AAT ACG ACT CAC TAT AGG AAG TGG AAG CCG AAG CAG SWY TGC ATC AT	Calcagnotto <i>et al.</i> , (2005)

\* Sentido 5' → 3'

As amplificações foram realizadas num termociclador MJ Research, INC, modelo PTC-200™ Programmable Thermal Controller, utilizando a seguinte reação:

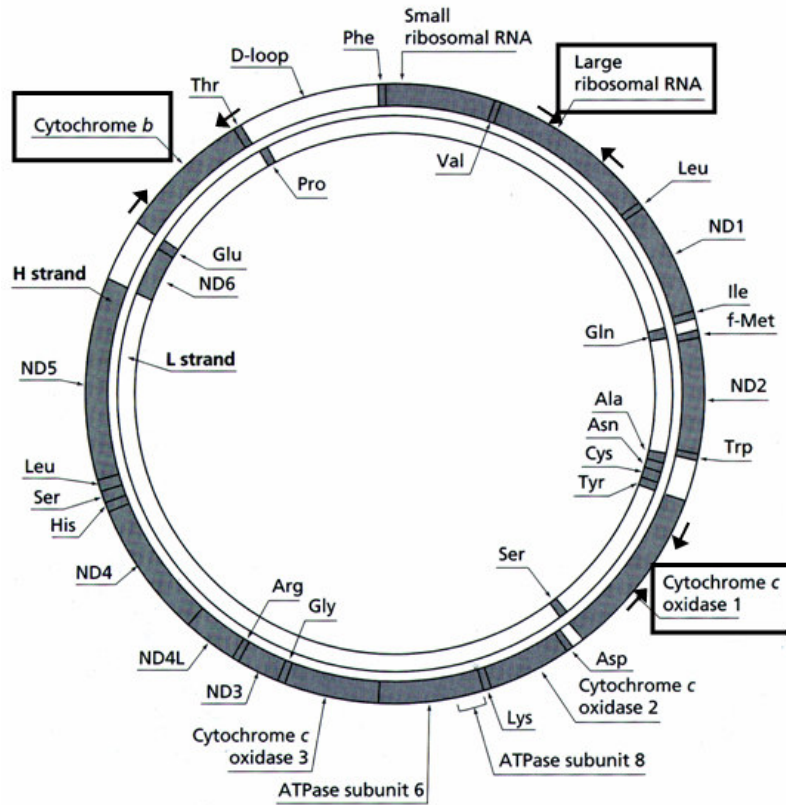
Água Milli-Q	19,4µl
dNTP (8mM)	0,5µl
Tampão 10X	2,5µl
<i>Primer Forward</i> (10µM)	0,5µl
<i>Primer Reverse</i> (10µM)	0,5µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,5µl
Taq (5U/µl)	0,1µl
DNA concentração	1,0µl *
Volume Final	25,0µl

\* quantidade variável devido a concentração do DNA

Cada ciclo da técnica da PCR consiste, basicamente, da denaturação, anelamento e extensão. Esses ciclos variaram dependendo do *primer* utilizado seguindo as condições básicas usadas por Calcagnotto *et al.* (2005), porém ao longo do trabalho, esses ciclos sofreram adaptações para obter melhores resultados como mostra na Tabela 4. A Figura 10 mostra um esquema da molécula de mtDNA localizando as posições dos genes utilizados no presente estudo. A posição correta e o tamanho do fragmento obtido dos genes utilizados no presente trabalho foi baseada no seqüenciamento total do genoma mitocondrial de *Cyprinus carpio* (carpa), contendo 16.575 bp, e apresenta o seguinte número de acesso X61010 no GenBank, como pode ser observado na Tabela 5. Na Figura 11 está apresentado o segmento do gene  $\alpha$ -tropomiosina seqüenciado no presente estudo.

**Tabela 4:** Condições da PCR usadas para cada gene.

<i>Primer</i>	Denaturação (95°)	Ciclos	Extensão (68°C)
16S	10 min	35X 95°C/30s, 48°C/45s, 68°C/45s	7 min
Cyt b	5 min	30X 95°C/30s, 48°C/45s, 68°C/90s	7 min
COXI	30 seg	30X 95°C/30s, 50°C/1min, 68°C/2min	5 min
Trop	10 min	30X 95°C/30s, 55°C/30s, 68°C/45s	7 min
Sia	5 min	30X 95°C/30s, 48°C/30s, 68°C/45s	7 min



**Figura 10.** Esquema da molécula de mtDNA, mostrando a localização dos genes utilizados no presente estudo.

**Tabela 5.** A posição dos segmentos dos genes utilizados no presente estudo, baseado no seqüenciamento total do genoma mitocondrial da espécie *Cyprinus carpio* (número de acesso X61010), contendo 16.575 pb.

Gene	Posição do gene	Posição do Primer Forward	Posição do Primer Reverse	Tamanho do fragmento obtido
16S rRNA	2021-3701	2919	3542	623
Citocromo oxidase I	6369-7949	6402	7108	706
Citocromo b	15293-16575	15357	16495	1138

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 cttccgttaa acacaaataa  
 54601 agatagtctg aggttgtagg aaaaaactgc cattgacttc catagtattt ttttgctctt  
 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 cagggccctg aaggatgagg agaagatgga gctgcaggag atccagttga aggaggccaa  
 Intron 4  
 54961 gcacattgct gaggaggctg atcgcaagta tgaggaggtc agttttctct ctttcttata  
 55021 aaccattata ctctaaacgg atcatttcca acaaataaca gtgatgtaaa caagtacact  
 Exon 5  
 55081 taaactcctt gtgatggtgt acaggtggcc cgtaagctgg tgattgttga gggtgagctg  
 Intron 5  
 55141 gagcgtactg aggagcgcgc tgagctcaat gaggggtaaa tactaactat ttaacaatat

**Figura 11.** Segmento do gene  $\alpha$ -tropomiosina de *Danio rerio* (Genbank AL845510) mostrando o segmento seqüenciado no presente estudo. Em vermelho estão os nucleotídeos que se anelam aos primers utilizados.

### 3.2.3 Visualização do DNA amplificado em gel de agarose

- a) preparar o gel de agarose a 1% (0,1g de agarose/1ml de tampão TAE 1X);
- b) depositar a agarose, ainda líquida, sobre a placa. Colocar o pente e esperar solidificar. Retirar o pente e cobrir com TAE diluído (1X) na cuba de eletroforese;
- c) aplicar o *DNA Ladder 1 Kb plus*, depois o produto de PCR das amostras (2 $\mu$ l de amostra + 3 $\mu$ l do corante *Blue Juice* 10X)
- d) corar com brometo de etídio (100 mg/ml) durante 30 segundos
- e) descorar por 10 minutos
- f) fotografar em câmera digital e analisar as bandas obtidas por meio do programa Kodak “Electrophoresis Documentation and Analysis System 120” a partir do marcador utilizado.

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

### 3.2.4 Purificação do produto da PCR

Protocolo do PEG (PolyEthylene Glycol) desenvolvido por Travis Glenn e está disponível no endereço [http://www.uga.edu/srel/DNA\\_Lab/PEG\\_Precip'00.rtf](http://www.uga.edu/srel/DNA_Lab/PEG_Precip'00.rtf)

- a) 25 $\mu$ l do produto de PCR;
- b) adicionar 25 $\mu$ l do PEG ao produto de PCR;
- c) incubar a 37 °C por 15 minutos;
- d) centrifugar por 15 minutos a 14.000rpm;

- e) retirar o sobrenadante por aspiração;
- f) adicionar 63µl de etanol 80% gelado;
- g) centrifugar por 1 minuto a 14.000rpm;
- h) retirar o sobrenadante por aspiração;
- i) repetir os passos f a h;
- j) descartar o sobrenadante e colocar os microtubos na estufa a 37°C até secar o produto de PCR
- k) eluir o produto de PCR em 12,5µl TE 1X.

### 3.2.5 Reação de amplificação para o seqüenciamento

Os *primers* utilizados na reação de PCR de seqüenciamento são os mesmos das reações de amplificação, na concentração de 10µM. Somente para o gene mitocondrial Cyt b foram feitas duas réplicas do primer forward e reverse para cada produto de PCR purificado, devido ao seu tamanho (cerca de 1.200 pares de bases).

Para cada amostra a ser seqüenciada preparar a reação (MIX):

Pré-Mix (Kit)	2µl
<i>Primer F e R</i>	2µl
DNA	Até 5µl
Água Milli-Q	Xµl
Volume total	9µl

As condições da PCR de seqüenciamento foram: um ciclo inicial de denaturação a 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C por 45 segundos,



50°C por 30 segundos para anelamento dos *primers* e 60°C por 2 minutos, estendendo a cadeia.

### **3.2.6 Purificação do DNA amplificado na reação de seqüenciamento e análise das amostras em seqüenciador ABI prism 377**

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

- a) adicionar 1µl de acetato de sódio 1,5M/ EDTA 250MM e 80µl de etanol 95% gelado em cada microtubo contendo o produto de seqüenciamento;
- b) misturar no vórtex rapidamente e centrifugar a 4°C por 30 minutos a 14.000rpm. Remover o sobrenadante cuidadosamente por aspiração;
- c) adicionar 400µl de etanol 70% gelado e, em seguida centrifugar por 10 minutos a 14.000rpm;
- d) descartar cuidadosamente o sobrenadante por aspiração manter o material protegido da luz e secá-lo por cerca de 1 hora na estufa a 37°C. O *pellet* seco pode ficar guardado por até 2 meses a 4°C protegido da luz.

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

- a) lavar as placas com detergente Extran 1%, enxaguar bem (aproximadamente 10 minutos) com água da torneira quente e, em seguida, enxaguar com 2,0l de água Milli-Q a 85°C. Colocar em suporte adequado para secagem;

- b) colocar o cassete de montagem da placa sobre a bancada e sobre este a placa anterior. Sobre as bordas da placa anterior, colocar os espaçadores e, em seguida colocar a placa posterior. As anotações em relevo na placa devem ficar voltadas para fora;
- c) alinhar as placas e deslizá-las até o encaixe de recorte da placa anterior com o pino existente na extremidade do cassete;
- d) fechar as presilhas e colocar o adaptador onde será encaixada a seringa com gel de poliacrilamida;
- e) preparar o gel de poliacrilamida (5% Long Ranger, 6M Uréia, 1X TBE) como segue:

Uréia	18g
Água Milli-Q	25ml
Long Ranger 50%	5ml
TBE 10X	5ml
Persulfato de amônio	250 $\mu$ l
TEMED	35 $\mu$ l

- f) misturar os quatro primeiros reagentes e filtrar em membrana com poros de  $\leq 0,45\mu\text{m}$ . Adicionar o persulfato e o TEMED no momento da aplicação do gel nas placas;
- g) misturar suavemente a solução e, em seguida, transferir o gel para uma seringa de 50ml que deve ser imediatamente acoplada ao local de aplicação do gel para preenchimento das placas anteriormente preparadas;
- h) aplicar o gel nas placas e, em seguida colocar o pente invertido no local apropriado entre as placas (lado oposto ao da aplicação);

- i) esperar no mínimo 1 hora e 30 minutos para total polimerização;
- j) remover o pente e lavar as placas sem retirá-las do cassete. As placas deverão estar completamente limpas, sem restos de poliacrilamida ou fragmentos de papéis utilizados para limpeza e secagem;
- k) preparar 1,5l de TBE 1X para encher as cubas anódica e catódica;
- l) colocar a cuba de cor âmbar na parte de baixo do seqüenciador, encaixar o cassete com as placas no seqüenciador e fechar as presilhas;
- m) fechar a porta do seqüenciador e fazer um *Plate check* das placas para verificar se elas estão limpas;
- n) encher as cubas com o tampão TBE 1X. Não se deve ultrapassar os limites marcados como máximo;
- o) iniciar a pré-corrída para estabilização do meio e para atingir a temperatura de 51 °C;
- p) durante a pré-corrída ressuspender as amostras em 4,0µl de tampão carregamento (Formamida: Blue dextran - 5:2). Passar os tubos pelo vórtex e denaturar as amostras por 5 minutos a 95°C. Colocá-las imediatamente no gelo após a denaturação;
- q) após 10 minutos de corrída, aplicar de 40µl de tampão de carregamento no gel. Fechar a porta e deixar correr por dois minutos. Abrir a porta e retirar o excesso de corante com a seringa cheia de tampão de corrída;
- r) colocar o pente de modo que toque todo o gel ao mesmo tempo, deslizando-o de forma que não se incline. Introduzi-lo apenas 2mm no gel. Depois de introduzido não se pode ser removido, pois ocasionará vazamento das amostras;

- s) aplicar 0,8µl de amostra nos pocinhos ímpares;
- t) fechar a porta do seqüenciador e esperar 5 minutos e aplicar o restante das amostras nos pocinhos pares, evitando assim a mistura das amostras;
- u) cancelar a pré-corrída
- v) verificar o número de linhas, o tamanho da placa, a matriz adequada, o número de horas de corrida e importar a lista de amostras;
- w) iniciar a corrida
- x) após o término da corrida (7 horas), posicionar as linhas sobre as amostras que aparecem na imagem do gel.

### **3.2.7 Alinhamento e análise 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 (Golobof *et al.* 2006). As filogenias obtidas foram testadas utilizando o método de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) usando-se 1000 réplicas e o índice de decaimento de Bremer (Bremer, 1988). As análises probabilísticas (bayesianas) foram realizadas com o programa MrBayes 3.1 (Huelsenbeck e Roquist, 2001). As árvores de parcimônia foram geradas usando as proporções Ti/Tv de 1:1 e 1:2 e considerando os *gaps* como dados perdidos ou como uma quinta base.

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 de três genes mitocondriais, 16S rRNA, citocromo b e citocromo oxidase I e dois genes nucleares, sia e trop. Os resultados obtidos das amostras seqüenciadas estão apresentados na Tabela 6. Os alinhamentos finais das seqüências obtidas estão apresentados nos Apêndices I e II. Seqüências adicionais de Characiformes foram obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), como mostra a Tabela 7.**

Tabela 6. Amostras seqüenciadas no presente estudo.

LOTE	REGISTRO	ESPÉCIE	GENES				
			GRUPO INTERNO	16S	Cox I	Cyt B	Sia
2512	17027	<i>Carnegiella strigata</i>	Ok	Ok	OK		OK
	17030		OK	OK	OK		OK
3167	19318	<i>Carnegiella strigata</i>	Ok	Ok	OK	Ok	
4177	22802	<i>Carnegiella strigata</i>	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
4200	23602	<i>Carnegiella strigata</i>	Ok	Ok	Ok		
4199	23601	<i>Carnegiella marthae</i>	Ok	Ok	Ok		
1588	11714	<i>Thoracocharax stellatus</i>	Ok	Ok	Ok	Ok	
	11716		Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
1694	12769	<i>Thoracocharax stellatus</i>	Ok	Ok	Ok	Ok	
4179	22801	<i>Thoracocharax stellatus</i>	Ok	Ok	Ok		Ok
200	8740	<i>Thoracocharax stellatus</i>		Ok			
3942	22595	<i>Thoracocharax stellatus</i>	Ok	Ok	Ok		
	22596		Ok	Ok	Ok	Ok	
3291	19869	<i>Gasteropelecus maculatus</i>	Ok	Ok	Ok	Ok	
3297	19868	<i>Gasteropelecus maculatus</i>	OK		Ok	Ok	
3298	19871	<i>Gasteropelecus maculatus</i>		Ok			
4070	22974	<i>Gasteropelecus sternicla</i>		Ok			
	22803			Ok			
<b>GRUPO EXTERNO</b>							
Characidae							
1815	13112	<i>Bryconops</i> sp		Ok	Ok	Ok	Ok
2711	7616	<i>Salminus hilarii</i>	Ok	Ok	Ok		Ok
850	9025	<i>Salminus brasiliensis</i>	Ok	Ok	Ok	Ok	
39	3501	<i>Triportheus pantanensis</i>	Ok	Ok	Ok		Ok
2663	15580	<i>Triportheus orinocensis</i>	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok

**Tabela 7.** Seqüências adicionais obtidas no GenBank, com o seu respectivo código de acesso.

Família/Espécie	Genes e códigos de acesso			
	16S	Cyt B	Sia	Trop
Anostomidae				
<i>Leporinus</i> sp	AY788044	AY791416	AY790102	AY817252
<i>Anostomus anostomus</i>	AY787954	AY791352	AY790012	AY817187
Chilodontidae				
<i>Chilodus punctatus</i>	AY787997		AY790056	AY817215
Prochilodontidae				
<i>Prochilodus nigricans</i>	AY788075	AY791437	AY790133	AY817278
Hemiodontidae				
<i>Hemiodus gracilis</i>	AY788027	AY791405	AY790086	AY817240
Parodontidae				
<i>Parodon</i> sp	AY788065	AY791427	AY790123	AY817269
Serrasalminidae				
<i>Colossoma macropomum</i>	AY788000	AY791386	AY790059	AY817218
<i>Piaractus brachipomus</i>	AY788067	AY791429	AY790125	AY817271
Cynodontidae				
<i>Hydrolycus pectoralis</i>	AY788033		AY790091	AY817244
Characidae				
<i>Acestrorhynchus</i> sp			AY790014	
<i>Astyanacinus</i> sp	AY787969	AY791365	AY790028	
<i>Astyanax bimaculatus</i>	AY787955		AY790013	AY817180
<i>Brycon hilarii</i>	AY787976	AY791370	AY790035	AY817198
<i>Bryconops</i> sp	AY787985	AY791376	AY790044	AY817207
<i>Bryconamericus diaphanus</i>	AY787984	AY791375	AY790043	AY817206
<i>Chalceus erythrurus</i>	AY787990	AY791379	AY790049	AY817211
<i>Chalceus macrolepidotus</i>	AY787999	AY791385	AY790058	AY817217
<i>Cheirodon</i> sp	AY787995	AY791382	AY790054	
<i>Creagrutus</i> sp	AY788001		AY790055	
<i>Exodon paradoxus</i>	AY788013	AY791397	AY790072	AY817227
<i>Hemibrycon beni</i>	AY788020	AY791402	AY790079	AY817234
<i>Knodus</i> sp	AY788041	AY791414	AY90099	AY817249
<i>Mimagoniates lateralis</i>	AY788051	AY791420	AY790109	AY817259
<i>Prodontocharax</i> sp	AY788064	AY791426	AY790122	



**Tabela 7.** Continuação...

Família/Espécie	Genes e códigos de acesso			
	16S	Cyt B	sia	trop
<i>Roeboides</i> sp	AY787994	AY791381	AY790053	AY817214
<i>Salminus maxillosus</i>	AY788080	AY791438	AY790137	AY817282
<i>Triportheus angulatus</i>	AY788082		AY790139	AY817283
Ctenolucidae				
<i>Ctenolucius hujeta</i>	AY787998	AY791384	AY790057	AY817216
Lebiasinidae				
<i>Nannostomus beckfordi</i>	AY788059		AY790117	AY817265
Crenuchidae				
<i>Characidium fasciatum</i>	AY787992	AY791380	AY790051	AY817213
<i>Characidium vidali</i>	AY788003	AY791388	AY790062	AY817221
<i>Melanocharacidium</i> sp	AY788083	AY791439	AY790140	AY817284
Erythrinidae				
<i>Hoplias</i> sp	AY788031	AY791409	AY790090	AY817242
Alestidae				
<i>Alestes baremoze</i>	AY787963	AY791360	AY790022	AY817185
<i>Hydrocynus brevis</i>	AY788018	AY791400	AY790077	
<i>Ladigesia roloffii</i>	AY788046	AY791417	AY790104	AY817254
<i>Micralestes acutidens</i>	AY788047	AY791418	AY790105	
Hepsetidae				
<i>Hepsetus odoe</i>	AY788030	AY791408	AY790089	AY817241
Citharinidae				
<i>Citharinus citharus</i>	AY787989	AY791378	AY790048	
<i>Citharinus</i> sp	AY788037	AY791411	AY790095	
Distichodontidae				
<i>Distichodus notospilus</i>	AY788010	AY791395	AY790069	
<i>Xenocharax spilurus</i>	AY788084	AY791440	AY790141	
<i>Ichthyborus</i> sp	AY788038	AY791412	AY790096	

#### 4.1 Gene 16S rRNA

Foram obtidas seqüências do gene mitocondrial 16S rRNA de 14 exemplares dos três gêneros da família Gasteropelecidae e de 4 espécies de outras famílias de Characiformes; servindo assim, como grupo externo, somando a essas amostras seqüenciadas foram adquiridas mais 41 seqüências no GenBank. O tamanho das seqüências do gene 16S rRNA variou de 485 pares de bases (pb) em *Thoracoharax* (animal 11714) a 600 pb em *Melanocharacidium* sp. (seqüência AY788083), com um valor médio de 576 pb. Após o procedimento de alinhamento e correção manual desse alinhamento, obteve-se uma matriz com 640 caracteres dos quais 306 foram conservados, 318 foram variáveis e 234 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 31,3% de adenina (A), 23,5% de citosina (C), 22,6% de guanina (G) e 22,6% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de  $d = 0,124 \pm 0,007$ , segundo o modelo da distância  $p$  (Nei e Kumar, 2000). Uma análise gráfica foi realizada através da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Tamura-Nei 93 que não indica há saturação nestes nucleotídeos (Figura 12).

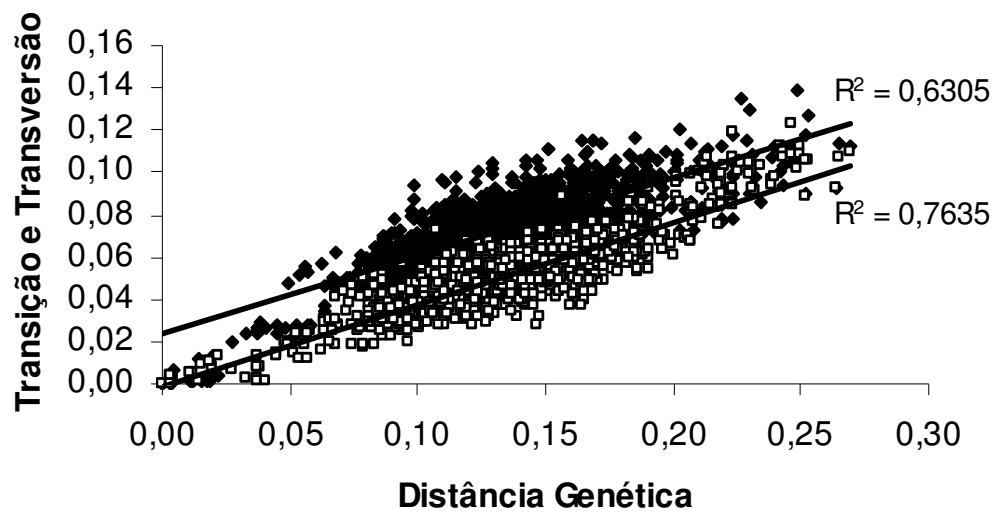


Figura 12. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de Tamura-Nei 93, e a frequência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para o gene 16S rRNA.

## 4.2 Gene citocromo b

Para o gene mitocondrial citocromo b foram obtidas seqüências de 14 exemplares dos três gêneros da família em estudo, e, 5 seqüências de outras famílias de Characiformes e foram obtidas mais 35 seqüências do GenBank. O tamanho médio das seqüências do gene Cyt b foi de 994 pb, a menor seqüência foi de 876 pb em *Bryconops* sp. (seqüência AY791376) e várias amostras obtiveram o tamanho máximo que foi de 1006 pb. As amostras que tiveram esse tamanho foram as seguintes: *Piaractus brachipomus* (AY788013), *Exodon paradoxus* (AY788080), *Salminus brasiliensis* (AY787976), *Ctenolucius hujeta* (AY788031), *Hoplias* sp. (AY787989), *Citharinus citharus* (AY787954), *Anostomus anostomus* (AY788000), *Bryconamericus diaphanus* (AY787990), *Roeboides* sp. (AY787956) *Melanocharacidium* sp. (AY788018), *Hydrocynus brevis* (AY788037), *Citharinus* sp. (AY788084), e *Xenocharax spilurus* (AY791440). Após o procedimento de alinhamento manual, obteve-se uma matriz com 1006 caracteres dos quais 476 foram conservados, 531 foram variáveis e 480 foram filogeneticamente informativos para as análises de parcimônia. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 0,6. A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 26,8% de adenina (A), 28,9% de citosina (C), 14,3% de guanina (G) e 30,0% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de  $d = 0,213 \pm 0,006$ , segundo o modelo da distância  $p$  (Nei e Kumar, 2000). E finalmente realizou-se uma análise gráfica da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética entre os nucleotídeos, indicando que não há saturação nestes dados (Figura 13).

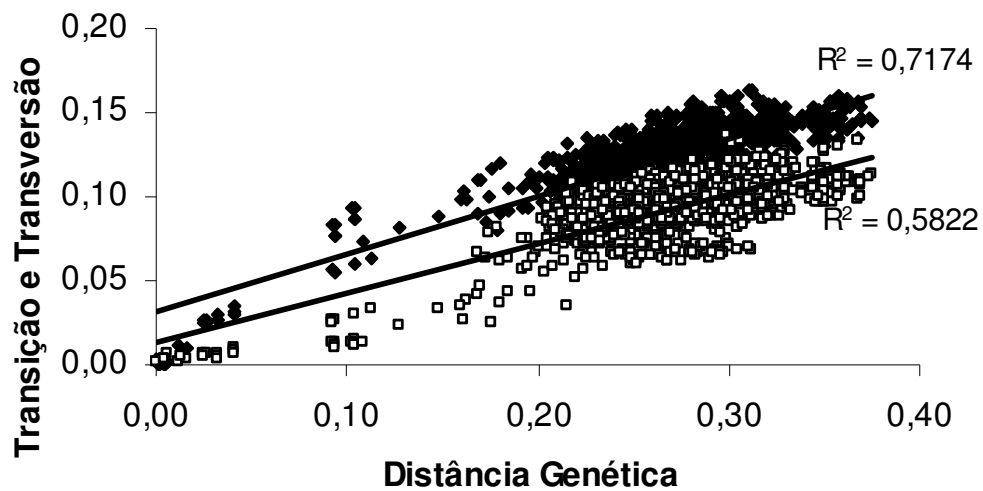


Figura 13. Gráfico mostrando o número de substituições (transições e transversões) versus a distância genética (modelo de Tamura-Nei 93). Transições são os losângulos, transversões são os quadrados, para o gene mitocondrial citocromo b.

### 4.3 Gene sia

Para o gene nuclear sia foram obtidas seqüências de 8 exemplares dos três gêneros da família Gasteropelecidae, 3 de outras famílias e 42 seqüências adicionais foram obtidas do GenBank. O tamanho das seqüências do gene sia variou de 365 pb em *Astyanax bimaculatus* (seqüência AY787955) a 475 pb em várias espécies: *Chilodus punctatus* (AY787997), *Piaractus brachipomus* (AY788067) *Hydrolycus pectoralis* (AY788033), *Chalceus macrolepidotus* (AY787999), *Exodon paradoxus* (AY788013), *Brycon hilarii* (AY787976) *Characidium fasciatum* (AY787992), *Hepsetus odoe* (AY788030), *Citharinus citharus* (AY787989), *Anostomus anostomus* (AY787954), *Colossoma macropomum* (AY788000), *Chalceus erythrurus* (AY787990), *Knodus* sp. (AY788041) *Mimagoniates lateralis* (AY788051), *Roeboides* sp. (AY787994), *Cheirodon* sp. (AY787995), *Creagrutus* sp. (AY788001), *Prodontocharax* sp. (AY788064), *Characidium vidali* (AY788003), *Alestes baremoze* (AY787963), *Hydrocynus brevis* (AY788018) *Distichodus notospilus* (AY788010), *Citharinus* sp. (AY788037), *Bryconops* sp. (13112), *Gasteropelecus maculatus* (19868), *Gasteropelecus maculatus* (19869), *Thoracocharax stellatus* (11714), *Thoracocharax stellatus* (11716), *Thoracocharax stellatus* (12769), *Thoracocharax stellatus* (22596) *Carnegiella strigata* (19318), com um valor médio de 462 pb. Após o procedimento de alinhamento e correção manual desse alinhamento, obteve-se uma matriz com 584 caracteres dos quais 337 foram conservados, 138 foram variáveis e 109 foram filogeneticamente informativos para as análises

de parcimônia. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 0,7. A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 17,8% de adenina (A), 35,0% de citosina (C), 27,3% de guanina (G) e 19,9% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de  $d = 0,068 \pm 0,007$ , segundo o modelo da distância  $p$  (Nei e Kumar, 2000). A análise gráfica da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética indica ausência saturação nestes nucleotídeos (Figura 14).

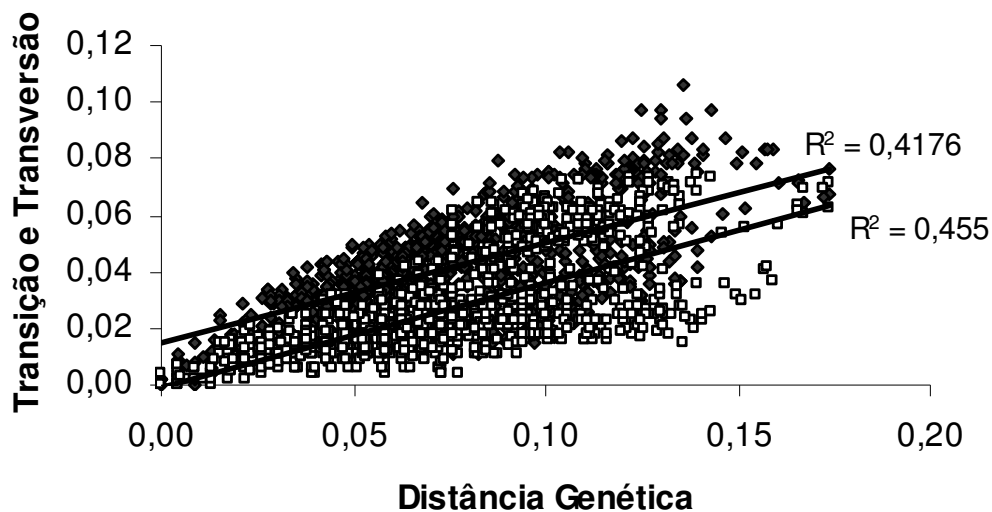


Figura 14. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de Tamura-Nei 93, e a freqüência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para o gene nuclear sia.

#### 4.4 Gene trop

Para o gene nuclear trop foram obtidas 5 seqüências de dois gêneros da família Gasteropelecidae: *Carnegiella* e *Thoracachorax*, 4 de outras famílias e 30 seqüências adicionais foram obtidas no GenBank. O tamanho valor médio das seqüências foi de 291 pb. Na amostra *Hepsetus odoe* (seqüência AY788030) foi encontrada a menor seqüência com 202 pb e em *Roeboides* sp. (AY787994) foi a maior com 494 pb. A matriz de caracteres formada após o alinhamento manual foi de 538 caracteres dos quais 60 foram conservados, 448 foram variáveis e 193 foram considerados filogeneticamente informativos para as análises de parcimônia. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 0,8. A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 26,1% de adenina (A), 17,7% de citosina (C), 32,7% de guanina (G) e 25,5% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de  $d = 0,234 \pm 0,013$ , segundo o modelo da distância *p* (Nei e Kumar, 2000). Os resultados das análises das transições e transversões contra a distância genética (Figura 15) indicam uma ausência de saturação de nucleotídeos.



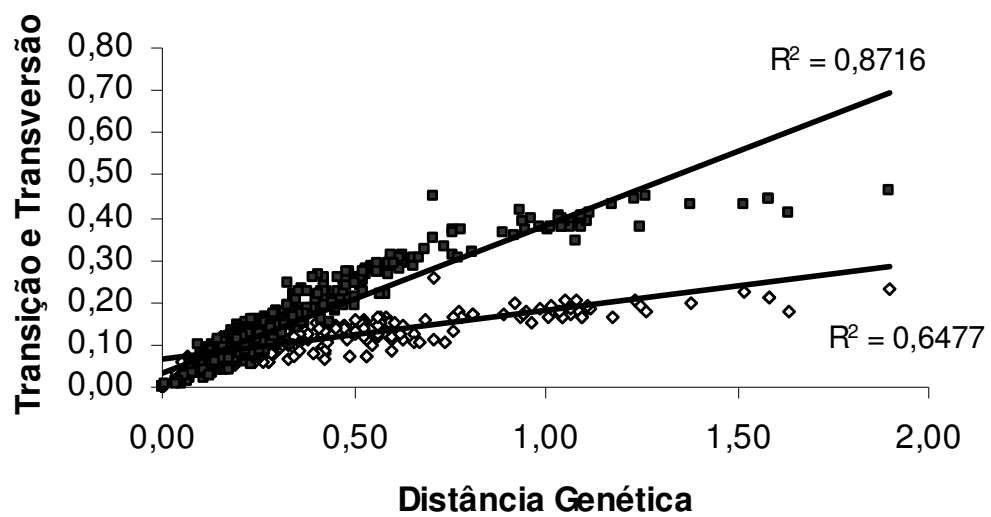


Figura 15. Gráfico do gene nuclear trop mostrando o número de transições (losangos) e transversões (quadrados) em relação à distância genética estimada pelo modelo de Tamura-Nei 93.

#### 4.5. Análise combinada dos genes 16S, citocromoB, sia e trop

Os dados de 64 seqüências combinadas de Characiformes resultaram numa matriz de 2469 pares de bases (pb), dos quais 857 foram conservados, 1604 foram variáveis, 575 foram únicos e 1013 foram filogeneticamente informativos. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 0,8. A composição em porcentagem de bases para as regiões seqüenciadas foi a seguinte: 26,1% de adenina (A), 25,4% de timina (T), 27,6% de citosina (C) e 20,0% de guanina (G). O tamanho médio das seqüências foi de 1985 pb, a menor seqüência foi observada 2429 em *Astyanax bimaculatus* (seqüência AY787955) contendo 1143 pb, e a maior seqüência foi em *Roeboides* sp. (animal AY787994) com 2429 pb. A distância média entre as seqüências foi de  $d = 0,176 \pm 0,004$ , segundo o modelo da distância  $p$  (Nei e Kumar, 2000). Os resultados das análises das transições e transversões contra a distância genética (Figura 16) indicam uma ausência de saturação de nucleotídeos.

Nas análises de parcimônia foram testadas a exclusão ou não de regiões de difícil alinhamento, foi testado se os gaps seriam melhores tratados como uma quinta base ou como dados ausentes e testou-se ainda o sistema de pesagem de transições e transversões de 1:1 e 1:2. A árvore consenso melhor resolvida foi obtida tratando os caracteres como não ordenados, excluindo as regiões de difícil alinhamento, tratando os gaps como quinta base e considerando proporção Ti/Tv de 1:1. Para esta árvore, os resultados obtidos foram: comprimento da árvore = 7177 passos, índice

de consistência (CI) = 0,2476, índice de homoplasia (HI) = 0,7524 e índice de retenção (RI) = 0,4941. Essa análise foi realizada em 1000 pseudoréplicas de *bootstrap* gerando 4071 árvores. A árvore de consenso foi muito similar à obtida nas análises probabilísticas, assim apenas os valores de *bootstrap* estão apresentados na Figura 17. Para a análise de parcimônia foi calculado também o índice de decaimento de Bremer e os valores obtidos são mostrados na topologia final do presente estudo (Figura 17).

Em relação às análises probabilísticas foi usado o método bayesiano que resultou em uma filogenia consenso com boa parte dos nós apresentando alta sustentação, conforme apresentado na Figura 17.

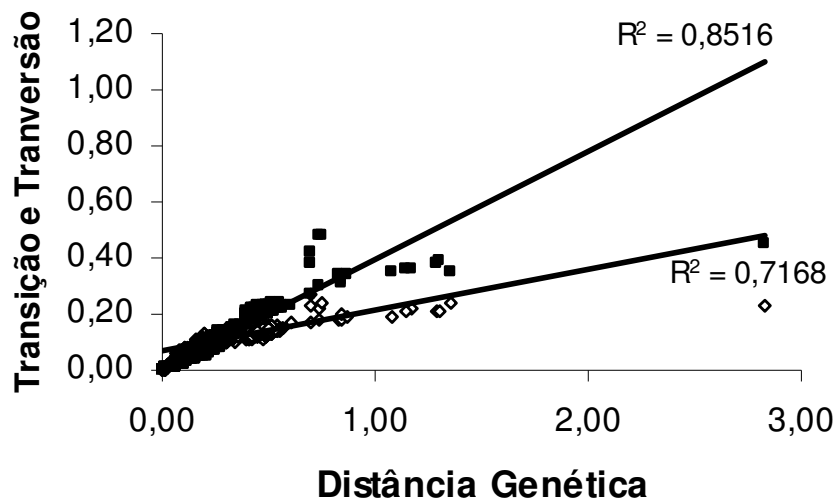


Figura 16. Gráfico mostrando o número de substituições (transições e transversões) versus a distância genética, calculada pelo método de Tamura-Nei 93 todas as seqüências obtidas no presente trabalho.



#### 4.6 Gene citocromo oxidase I

Foram obtidas seqüências parciais do gene mitocondrial citocromo oxidase I de 17 exemplares dos três gêneros da família Gasteropelecidae, e, de 4 espécies de outros grupos de Characiformes. O tamanho das seqüências variou de 531 pb em *Thoracocharax stellatus* (animal 12769) a 654 pb em várias espécies. *Carnegiella strigata* (animais 17027, 17030, 23602 e 22802); *Carnegiella marthae* (animal 23601); *Thoracocharax stellatus* (animal 22801); *Gasteropelecus maculatus* (animal 19869); *Gasteropelecus sternicla* (animais 22803 e 22974); *Salminus brasiliensis* (animal 9025); *Triportheus orinocensis* (animal 15580) e finalmente *Triportheus pantanensis* (animal 3501), com um valor médio de 630 pb. Após o procedimento de alinhamento e correção manual desse alinhamento, obteve-se uma matriz com 654 caracteres dos quais 412 foram conservados, 242 foram variáveis e 228 foram filogeneticamente informativos para as análises de parcimônia. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 1,3. A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 25,0% de adenina (A), 25,1% de citosina (C), 18,0% de guanina (G) e 31,8% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de  $d = 0,165 \pm 0,010$ , 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 indica que não há saturação nestes nucleotídeos (Figura 18).

Considerando que o alinhamento do gene citocromo oxidase I foi direto, não houve necessidade de colocação de *gaps* no alinhamento final. Assim testou-se apenas o sistema de pesagem de transições e transversões de 1:1 e 1:2. A árvore consenso melhor resolvida foi obtida considerando

proporção Ti/Tv de 1:1. Para esta árvore, os resultados obtidos foram: comprimento da árvore = 674, índice de consistência (CI) = 0.5297, índice de homoplasia (HI) = 0.4703 e índice de retenção (RI) = 0.7490. A árvore de consenso foi muito similar à obtida nas análises probabilísticas, assim apenas os valores de bootstrap estão apresentados na Figura 19. Para a análise de parcimônia foi calculado também o índice de decaimento de Bremer e os valores obtidos são mostrados na topologia final do presente estudo (Figura 19).

Em relação às análises probabilísticas foi usado o método bayesiano que resultou em uma filogenia consenso com a grande maioria dos nós apresentando alta sustentação, conforme apresentado na Figura 19.

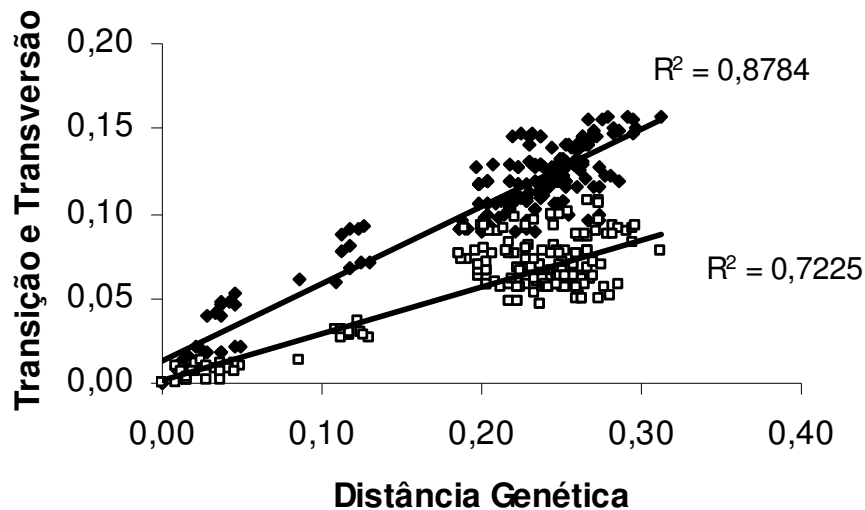
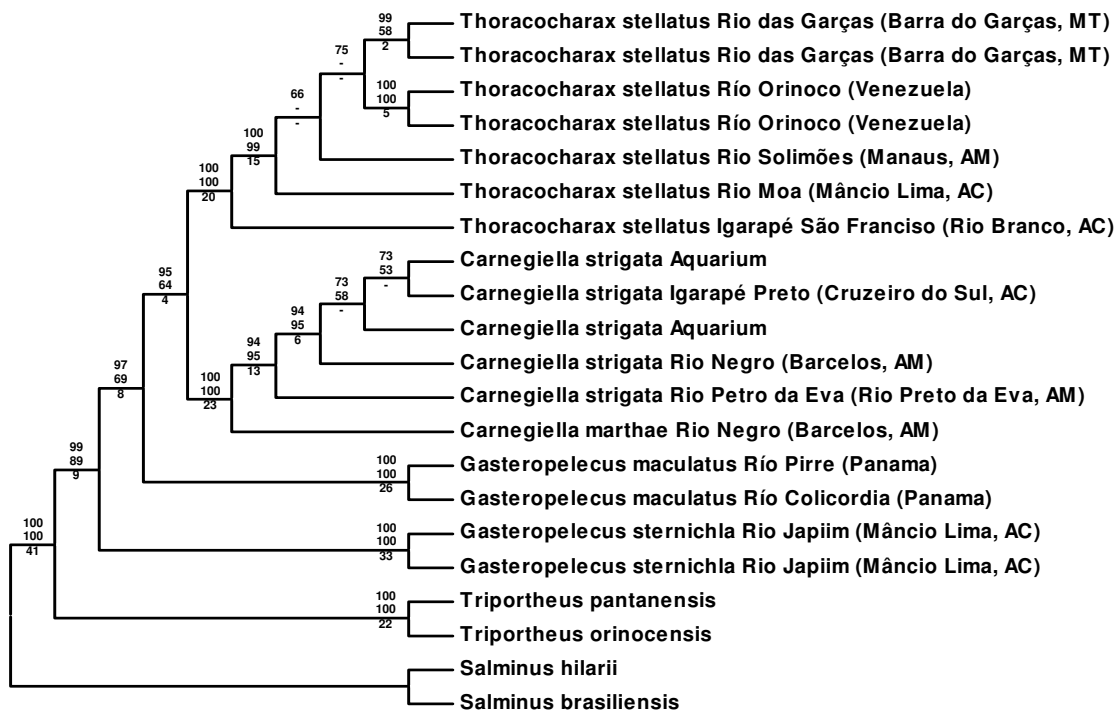


Figura 18. Gráfico do gene citocromo oxidase I mostrando o número de transições e transversões em relação a distância genética estimada pelo modelo de Tamura-Nei 93.



**Figura 19.** Árvore consenso obtida na análise bayesiana. Na análise de MP foi utilizada a proporção  $Ti/Tv$  1:1 ( $CI = 0,5297$ ,  $HI = 0,4703$  e  $RI = 0,7490$ ). Os dois primeiros números acima dos ramos são os valores de *bootstrap* da análise bayesiana e de MP, respectivamente, com base em 1000 réplicas. Os números abaixo dos ramos representam o índice de decaimento de Bremer

## 5. DISCUSSÃO

As análises utilizando dois genes mitocondriais (16S rRNA e citocromo b) e dois genes nucleares (*trop* e *sia*), pelos métodos bayesianos e MP, resultaram em topologias similares, com altos valores de suporte (*bootstrap*) para a maioria dos nós menos internos, como mostra a Figura 17. Para os nós mais internos o suporte foi muito baixo ou nulo, com exceção da separação das famílias Citharinidae e Distichodontidae das demais famílias de Characiformes, que foi fortemente sustentada, com já observado por Calcagnoto *et al.*, (2005). Nesse estudo foi dada ênfase aos resultados das análises bayesianas dos dados considerando-se principalmente os achados de Simmons e Miya (2004) que demonstram que esse tipo de análise, apesar de ser menos conservativo, é mais resolutivo na identificação de relações antigas entre táxons.

Considerando que o interesse imediato nesse trabalho é discutir as relações dentro da família Gasteropelecidae e dessa família com os demais Characiformes a presente discussão está focada apenas nesses dois tópicos. Os demais ramos das filogenias obtidas foram extensivamente discutidos por Calcagnoto *et al.*, (2005), basicamente sob a mesma base de dados. Todos os dados obtidos nesse estudo corroboraram a hipótese de que a família Gasteropelecidae é monofilética, como tem sido aceito por todos os autores.

As análises dos gasteropelecídeos mostraram que a família é composta por dois grupos de espécies. O primeiro grupo é formado apenas por *Gasteropelecus*. O segundo grupo é formado por *Thoracachorax* e *Carnegiella*. Nesse sentido esses resultados não corroboram a hipótese de Weitzman (1960) que sugeria que



o gênero *Thoracocharax* representava uma linhagem independente dentro do grupo (nomeada como Thoracocharacini) e que *Gasteropelecus* e *Carnegiella* representavam grupos irmão pertencentes a uma segunda linhagem (tribo Gasteropelecini).

De acordo com Weitzman (1954), o gênero *Gasteropelecus* seria o mais primitivo dentre os gasteropelecines e a espécie *G. maculatus* seria a mais próxima do gênero *Carnegiella*. Dentro de *Carnegiella*, *C. marthae* e *C. schereri* seriam as duas espécies mais primitivas e representariam o grupo-irmão de *C. strigata* e *C. vesca* que formariam o grupo mais derivado, dentro desse gênero. Em estudos posteriores, a espécie *C. vesca* foi considerada sinônimo de *C. strigata* por Weitzman e Palmer (1996). Weitzman e Weitzman (1982) consideraram a espécie *Carnegiella myersi* a mais primitiva dentro da família.

Ainda segundo Weitzman (1954) o gênero *Thoracocharax* apresentaria uma linhagem intermediária entre a mais primitiva (*Gasteropelecus*) e a mais derivada (*Carnegiella*). Contudo, os resultados obtidos pelos dados moleculares contradizem com os morfológicos. Uma vez que, *Thoracocharax* apareceu como grupo irmão de *Carnegiella* e *Gasteropelecus* apareceu como grupo irmão do taxa anteriormente descrito.

Em todas as análises de MP e ML conduzidas no presente estudo, as amostras de *C. strigata* de várias localidades formaram um único grupo monofilético reforçando a hipótese de que *C. vesca* (como havia sido identificada inicialmente uma das amostras do presente estudo proveniente de Cruzeiro do Sul, Acre) é sinônimo de *C. strigata* (Weitzman e Palmer, 1996). Essas amostras apareceram também sempre como grupo-irmão da espécie *C. marthae*.

Weitzman e Weitzman (1982) fizeram um estudo filogenético das quatro espécies do gênero *Carnegiella*: *C. myersi*, *C. strigata*, *C. schereri* e *C. marthae*. Dentre todas as espécies, a *C. myersi* foi considerada a espécie mais primitiva - embora apresentando uma série de autopomorfias, por exemplo, o número raios da nadadeira peitoral (3 raios), enquanto nas outras espécies é encontrado apenas 1 raio, a presença de uma pigmentação mais escura da região dorsal para a base da nadadeira peitoral.

Ainda segundo Weitzman e Weitzman (1982), *C. marthae* seria a espécie mais derivada, apresentando algumas autopomorfias tais como: o número de raios da nadadeira anal, variando entre 19 e 21 raios, dentre todas as espécies, *C. marthae* é que apresenta o corpo mais pigmentado, entre outras características. Ainda de acordo com Weitzman e Weitzman (1982), *C. strigata* seria a “segunda espécie mais primitiva” devido as suas características morfológicas. Estes resultados não puderam ser checados no presente estudo pois só foram obtidas amostras de *C. strigata* e *C. marthae*.

Os resultados obtidos apenas para o gene Citocromo Oxidase I também confirmam a monofilia de Gasteropelecidae, como pode ser observado na Figura 19. Confirmaram também que os gêneros *Carnegiella* e *Thoracocharax* estão mais relacionados entre si e o gênero *Gasteropelecus* é o grupo irmão dos outros gêneros. Esses resultados também corroboram a hipótese de Weitzman (1954). Por outro lado, o gênero *Gasteropelecus* apareceu como não monofilético. Considerando que estão sendo discutidas as relações obtidas apenas para um gene mitocondrial, outros dados terão que ser obtidos para se confirmar ou não o polifiletismo desse gênero. Além disso, *Gasteropelecus sternicla* apareceu como a

mais basal de toda a família, contradizendo a hipótese de Weitzman (1954) que afirmava que *G. maculatus* seria a mais basal.

No presente estudo, o gênero *Triportheus* apareceu, em todas as análises, como grupo-irmão de Gasteropelecidae.

O gênero *Triportheus* pertence ao grupo de gêneros considerados *Incertae sedis* dentro da família Characidae (Reis *et al.* 2003) é composto por 16 espécies encontradas nas principais drenagens da América do Sul. A última revisão do gênero foi feita por Malabarba (2004) que descreveu mais três espécies. Nesse trabalho não houve uma intenção para tentar posicionar esse gênero ou discutir suas relações internas.

Weitzman (1954) comparou a então subfamília Gasteropelecinae com *Brycon*, *Astyanax*, *Bryconamericus* e *Triportheus* e sugeriu, com base em características osteológicas, uma possível relação dos gasteropelecines com o gênero *Triportheus*. Entre essas características estariam o formato do osso coracóide. Porém o coracóide de *Triportheus* não é fusionado como em gasteropelecines. A cintura peitoral de *Triportheus* não é tão especializada quanto de gasteropelecidade, mas é bem parecida. Segundo Weitzman (1954) *Triportheus* e a então subfamília Gasteropelecinae poderiam ter tido um ancestral comum. Os resultados dos dados moleculares do presente trabalho, corroboram essa hipótese.

Neste estudo, os exemplares analisados da família Characidae formaram três clados principais. O primeiro clado foi formado pelos gêneros *Chalceus*, *Brycon* e *Salminus*. O segundo clado foi formado por vários gêneros: *Bryconops*, *Acestrorhynchus*, *Roeboides*, *Mimagoniates*, *Hemibrycon*, *Knodus*, *Creagrutus*,

*Bryconamericus*, *Prodontocharax*, *Cheirodon*, *Exodon*, *Astyanacinus* e *Astyanax*. E o terceiro clado formado pelo gênero *Triportheus* e os Gasteropelecidae.

De acordo com Lucena (1993) o clado formado pelos gêneros *Brycon* e *Triportheus* (por apresentarem as seguintes características: a área do osso frontal, está localizada lateralmente ao canal supra-orbital, ausência de uma fossa no occipital, o supra-orbital esta ausente e finalmente, o canal sensorial pré-opercular ultrapassa a borda ântero-dorsal do opérculo) é considerado grupo-irmão do clado formado por representantes da maioria das subfamílias dos caracídeos, especialmente Aphyocharacinae, Cheirodontinae, Glandulocaudine, Iguanodectinae, Stethaprioninae e Tetragonopterinae.

Calcagnotto *et al.*, (2005) relacionaram *Acestrorhynchus* (Acestrorhynchinae) com *Brycon*, *Salminus* e *Triportheus*. Essa hipótese havia sido postulada por Weitzman e Malabarba (1998), devido à presença de um osso supra-orbital. Hubert *et al.* (2005) também corroboram essa hipótese de relacionamento entre *Acestrorhynchus* e *Triportheus*. Considerando que no trabalho de Calcagnotto *et al.* (2005) somente uma espécie de *Triportheus* e uma espécie de *Salminus* haviam sido analisadas, nesse estudo foram sequenciadas mais duas espécies de cada gênero com o intuito de checar se as relações seriam confirmadas e esses grupos apareceriam como unidades monofiléticas. Como mostrado na Figura 17 isso realmente se confirmou.

Weitzman (1962) estudou com profundidade o esqueleto de vários caracídeos (Glandulocaudinae, Rhoadsiinae, Chalcininae, Triportheinae, Bryconinae, Iguanodectinae, Acestrorhynchidae, Characinae, Stethaprioninae, Stichonodontidae, Agoniatinae, Stevardiinae, Diapominae, Tetragonopterinae e

Gymnocharacinae). Dentre todos os caracídeos estudados, alguns que apresentavam uma morfologia bastante diferenciada como: Erythrininae, Lebiasininae, Hemiodontinae, Citharininae, Anostominae, Serrasalminae e Gasteropelecinae, foram posteriormente classificados como subfamílias e só foram apresentados como família alguns anos depois por Greenwood *et al.*, (1966) devido justamente à essas diferenças morfológicas verificadas por Weitzman (1962).

Buckup (1998) sugeriu posicionar Gasteropelecidae dentro da superfamília Characoidea (Gasteropelecidae e Characidae) e classificou essa família como *Incertae sedis*, devido as suas características morfológicas peculiares. Malabarba e Weitzman (2003) tentaram posicionar filogeneticamente seu novo gênero de Characidae: *Cyanocharax*. Como resultado, foi observado a formação de grandes politomias envolvendo os táxons estudados e entre elas uma que agrupava Gasteropelecidae, *Triportheus*, *Brycon*, *Salminus*, Serrasalminae, *Bryconops*, *Lignobrycon* e Roestinae.

Em uma análise da morfologia externa de *Triportheus pantanensis*, *Triportheus orinocensis* e *Gasteropelecus maculatus*. Observa-se que as características que aproximam os *Triportheus* dos gasteropelecídeos seriam as seguintes: posição superior da boca, coracóide desenvolvido, assim como, as nadadeiras peitorais, a nadadeira anal é alongada e a dorsal esta localizada na região posterior da metade do corpo. Uma característica interessante encontrada foi o padrão de coloração, tanto *Triportheus* quanto *Gasteropelecus* apresentam um padrão de pigmentação bem parecido ao longo do corpo dessas desses dois gêneros (nossos dados não publicados).

O primeiro estudo filogenético contendo amostras de Gasteropelecidade e usando seqüências de nucleotídeos foi feito por Orti e Meyer (1997), resultando numa hipótese de relação com a família Anostomidae. Hubert *et al.* (2005) estudaram as relações filogenéticas entre 57 Characiformes, inclusive a família Gasteropelecidae. Desse estudo, resultou uma topologia não muito robusta. Gasteropelecidae (representada pelos gêneros *Carnegiella* e *Gasteropelecus*) ficou agrupada com a família Ctenoluciidae e esse clado foi o mais basal entre todos os characiformes neotropicais, ficando próximo às famílias africanas Citharinidae e Distichodontidae. Esse resultado não foi corroborado no presente estudo pois Gasteropelecidae aparece relacionada como *Triportheus* e Ctenoluciidae (representada por *Ctenolucius*) aparece como grupo irmão de vários táxons de Characidae, porém sem suporte estatístico (Figura 17).

Para tentar resolver a questão taxonômica levantada no presente estudo, considerando a possível relação entre *Triportheus* e Gasteropelecidae, haveria duas possibilidades: a família Gasteropelecidae seria rebaixada à subfamília de Characidae [como proposto inicialmente por Weitzman (1960)] e uma nova subfamília seria criada para o gênero *Triportheus*, uma vez que esse gênero está incluído no grupo dos *Incertae sedis* de Characidae. Uma outra possibilidade seria manter a família Gasteropelecidae e elevar o nível taxonômico de *Triportheus*, de *Incertae sedis* para família. Novos dados serão extremamente úteis para resolução desse problema e também para um melhor entendimento das relações entre os Characiformes.

Em termos gerais os resultados desse estudo também corroboram a hipótese de que Characidae não é monofilético, como sugerido em vários

trabalhos que estudaram esse problema (Lucena e Menezes, 1998; Weitzman e Malabarba, 1998; Zanata, 2000).

## 6. CONCLUSÕES

- 1- Os resultados moleculares, baseado em genes mitocondriais e nucleares foram capazes de confirmar o monofiletismo da família Gasteropelecidae.
- 2- O gênero *Gasteropelecus* é grupo irmão do clado formado por *Carnegiella* e *Thoracocharax*.
- 3- Em relação aos outros Characiformes, a família Gasteropelecidae representou o grupo-irmão do gênero *Triportheus*. Assim a família Characidae não teve seu monofiletismo corroborado.
- 4- A análise do gene citocromo oxidase I apontou para um possível polifiletismo do gênero *Gasteropelecus*.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A. Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2006). Fundamentos da biologia celular. 2ªed., Artmed. Porto Alegre. 740 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
- Berra, T.M. (1981). Na Atlas of distribution of the freshwater fish families of the world. University of Nebraska Press. 197 pp.
- Böhlke, J.E., Weitzman, S.H., Menezes, N.A. (1978). Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. *Acta Amazonica*, 8 (4): 657-677.
- Bremer, K. (1988). The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution*, 42: 795-803.
- Briggs, J.C. (2005) The biogeography of otophysan fishes (Ostariophysi: Otophysi): a new appraisal. *J. Biogeogr.*, 32: 287-294.
- Brown, T. A. (1999). Genética – um enfoque molecular. 3ªed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 336 pp.
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A., Wilson, A.C. (1982). Mitochondrial DNA sequences of primates. Temp and mode of evolution. *J. Mol. Evol.*, 18: 225-239.

- Buckup, P.A. (1991). The Characidiinae: a phylogenetic study of the South American darters and their relationships with other characiform fishes. Tese de Doutorado, University of Michigan, Ann Arbor. 391 pp.
- 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. Edipucrs, Porto Alegre. 603 pp.
- Calcagnotto, D. (2004). Taxas de evolução e o relógio molecular. Pp 51-63. In: Matioli, S.R. (Ed.). Biologia Molecular e Evolução. Holos Editora, Ribeirão Preto. 202 pp.
- Calcagnotto, D., Schaefer, S.A., DeSalle, R. (2005). Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. Mol. Phylogenet. Evol., 36: 135-153.
- Carvalho, M.L., Oliveira, C., Foresti, F. (2002). Description of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Thoracocharax cf. stellatus* (Teleostei, Characiformes, Gasteropelecidae). Genetics and Molecular Biology 25: 299-303.
- Chang, Y.C., Hunag, F.L., Lo, T.B., (1994). The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. J. Mol. Evol. 38: 138–155.
- 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.
- Delarbre, C., et al., 1998. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. Genetics 150: 331–344.

- Doadrio, I., Dominguez, O. (2004). Phylogenetic relationships within the fish family Goodeidae based on cytochrome b sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 31: 416-430.
- Ericson, G.P., Zuccon, D., Ohlson, J.I, Johansson S., Alvarenga, H., Prum, R.O. (2006). Higher-level phylogeny and morphological evolution of tyrant flycatchers, cotingas, manakins, and their allies (Aves: Tyrannida). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 40: 471-483.
- 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. 664pp.
- Fink, S.V., Fink, W.L. (1981). Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). *Zool. J. Linn. Soc., London*, 72: 297-353.
- García-París, M. Buchholz, D. R., Parra-Olea, G. (2003). Phylogenetic relationships of Pelobatoidea re-examined using mtDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 28: 12-23.
- Géry, J. (1977). *Characoids of the world*. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey. 672 pp.
- Gilbert, C., Ropiquet, A., Hassanin, A. (2006). Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): Systematics, morphology, and biogeography. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 40: 101-117.

- Golobof, P., Farris, J., Nixon, K. (2006). T.N.T.: Tree analysis using new technology. Program and documentation available from the authors. [www.zmuc.dk/public/phylogeny](http://www.zmuc.dk/public/phylogeny).
- Greenwood, P.H., Rosen, D.E., Weitzman, S.H., Myers, G.S. (1966). Phyletic studies of teleostean fishes with a provisional classification of living forms. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 131:339-456.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Sump. Ser.*, 41: 95-98.
- Hardman, M. (2004). The phylogenetic relationships among *Noturus* catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) as inferred from mitochondrial gene cytochrome *b* and nuclear recombination activating gene 2. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 30: 395-408.
- Hillis, D.M., Mable, B.K., Larson, A., Davis, S.K., Zimmer, E.A. (1996). *Nucleic Acids IV: Sequencing and Cloning*. Pp. 321-381. In: Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B (Eds.). *Molecular Systematics* 2nd. ed., Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, 655 pp.
- Hinegardnaer, R., Rosen, D. R. (1972). Cellular DNA Content and the evolution of Teleostean fishes. *The American Naturalist*, 106 (951): 621-644.
- Hrbek, T., Stolting, K.N., Bardakci, F., Kuçuk, F., Wildekamp, R.H., Meyer, A. (2004). Plate tectonics and biogeographical patterns of the Pseudophoxinus (Pisces: Cypriniformes) species complex of central Anatolia, Turkey. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32: 297–308.

- Hubert, N., Bonillo, C., Paugy, D. (2005). Early divergence among the Alestidae (Teleostei, Ostariophyses, Characiformes): Mitochondrial evidences and congruence with morphological data. *C. R. Biologies*, 328: 477-491.
- Huelsenbeck, J.P., Roquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17: 754-755.
- Inoue, J.G., Miya, M., Tsukamoto, K., Nishida, M. (2001). Complete mitochondrial DNA sequence of *Conger myriaster* (Teleostei: Anguilliformes): novel gene order for vertebrate mitochondrial genomes and the phylogenetic implications for anguilliform families. *J. Mol. Evol.* 52:311–320.
- Inoue, J.G., Miya, M., Tsukamoto, K., Nishida, M. (2004). Mitogenomic evidence for the monophyly of elopomorph fishes (Teleostei) and the evolutionary origin of the leptocephalus larva. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32: 274–286.
- Irwin, D.M., Kocher, T.D. Wilson, A.C. (1991). Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.*, 32: 128-144.
- Johansen, S., Bakke, I., 1996. The complete mitochondrial DNA sequence of Atlantic cod, *Gadus morhua*: relevance to taxonomic studies among codfish. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 5: 203–214.
- Jondeung, A., Sangthong, P., Zardoya, R. (2007). The complete mitochondrial DNA sequence of the Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas*), and the phylogenetic relationships among Siluriformes. *Gene*, 387(1-2): 49-57.
- Kim, S.J., Choi, H.J., Jin, U.H., Lee, Y.C., Kim, C.H. (2006). Transcriptional regulation of the human Sia- $\alpha$ 2,3-Gal- $\beta$ 1,4-GlcNAc-R:  $\alpha$ 2,8-sialyltransferase (hST8Sia III) by retinoic acid in human glioblastoma tumor cell line. *Bioch. Biophys. Acta*, 1759: 451-457.

- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 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).
- Lavoué, S., Sullivan, J.P., Hopkins, C.D. (2003). Phylogenetic utility of the first two introns of the S7 ribosomal protein gene in African electric fishes (Mormyroidea: Teleostei) and congruence with other molecular markers. *Biol. J. Linn. Soc.*, 78: 273-292.
- Lee, W.J., Kocher, T.D., 1995. Complete sequence of a sea lamprey (*Petromyzon marinus*) mitochondrial genome: early establishment of the vertebrate genome organization. *Genetics* 139: 873–887.
- Lewin, B. (2004). *Genes VIII*. Pearson Education. Inc., upper Saddle River, New Jersey. 1027 pp.
- Li, W.H. (1997). *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts, 487 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.
- Lucena, C.A.S. (1993). Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi,

- Characiformes). Tese de Doutorado, Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da USP, 158 pp.
- Lucena, C.A.S., Menezes, N.A. (1998). A phylogenetic analysis of the Roestes Günther and Gilbertolus Eigenmann, with a hypothesis on the relationships of the Cynodontidae and Acestrorhynchidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). Pp: 261-278. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A.S. (Eds.). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. EDIPUCRS, Porto Alegre. Pp. 261-278.
- Lundberg, J.G. (1993). African-South American freshwater fish clades and continental drift: problems with paradigm. Pp 156-199. In: Goldblatt, P. (Ed.). Biological Relationships between Africa and South America. Yale University Press. New Haven. 630 pp.
- Malabarba, L.R.(1998). Monophyly of the Cheirodontinae, characters and major clades (Ostariophysi: Characida. Pp: 193-233. 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.
- Malabarba, L. R., Weitzman, S. H. (2003). Description of a new genus with six new species from Southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae). Comun. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS, Sér. Zool., 16 (1): 67-151.
- Malabarba, M. C. (2004). Revision of the Neotropical genus *Triportheus* COPE, 1872 (Characiformes, Characidae). Neotropical Ichthyology, 2(4): 167-204.

- Martin, A.P., Palumbi, S.R. (1993). Protein evolution in different cellular environments: Cytochrome b in sharks and mammals. *Mol. Biol. Evol.* 10: 873-891.
- Matsuzawa, S.I., Takayama, S., Froesch, B.A., Zapata, J.M., Reed, J.C. (1998). P53-inducible human homologue of *Drosophila* *seve in absentia* (Siah) inhibits cell growth: suppression by BAG-1. *The Embo Journal*, 17(10): 2736-2747.
- 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.
- Müller, J. (1842). Beobachtungen über die Schwimmblase der Fische, mit Bezug auf einige neue Fischgattungen. *Arch. Ana. Physiol.*, for 1842: 307-329.
- 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.
- Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the world*. 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 600 pp.



- Nahum, L.A. (2004). Evolução dos genomas. Pp. 82-96. In: Matioli, S.R. (Ed.). *Biologia Molecular e Evolução*. Holos Editora, Ribeirão Preto. 202 pp.
- Noack, K., Zardoya, R., Meyer, A., 1996. The complete mitochondrial DNA sequence of the bichir (*Polypterus ornatipinnis*), a basal rayfinned fish: ancient establishment of the consensus vertebrate gene order. *Genetics* 144: 1165–1180.
- Noonan, B.P., Chippindale, P.T. (2006). Dispersal and vicariance: The complex evolutionary history of boid snakes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 40: 347-358.
- Obermellier, 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.
- Orti, G. Meyer, A. (1997). The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Syst. Biol.*, 46: 75-100.
- Palumbi, S.R. (1996). *Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction*. Pp. 205-247. In: Hills, D.M., Moritz, C., Mable, B (Eds.). *Molecular Systematics* 2nd. ed., Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, 655 pp.

- Peng, Z., Wang, J., Shunping, H. (2006). The complete mitochondrial genome of the helmet catfish *Cranoglanis boudierus* (Siluriformes: Cranoglanididae) and the phylogeny of otophysan fishes. *Gene*, 376: 290-297.
- Pesole, G., Gissi, C., De Chirico, A., Saccone, C. (1999). Nucleotide substitution rate of mammals mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol.* 48: 427-434.
- Posada, D., Crandall, K.A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Pough, F.H., Janis, C.M., Heiser, J.B. (2003). *A vida dos vertebrados*. 3° ed., Atheneu Editora. São Paulo. 699 pp.
- 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.
- Regan, C.T. (1911). The classification of the teleostean fishes of the order Ostariophysi – Cyprinoidea. *Ann. Mag. Nat. Hist.*, 8 (8): 13-32.
- Ropiquet, A., Hassanin, A. (2005). Molecular evidence for the polyphyly of the genus *Hemitragus* (Mammalia, Bovidae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 36:154–168.
- Saitoh, K., Miya, M., Inoue, J.G., Ishiguro, N.B., Nishida, M. (2003). Mitochondrial genomics of ostariophysan fishes: perspectives on phylogeny and biogeography. *J. Mol. Evol.* 56: 464–472.

- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E.F. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Scheel, J.J. (1973). *Fish chromosomes and their evolution*. Internal Report of Denmarks Akvarium, Charlottenlund, Denmark, 22 pp.
- 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.
- Simmons, M.P. and M. Miya. (2004). Efficiently resolving the basal clades of a phylogenetic tree using Bayesian and parsimony approaches. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 31: 351-362.
- Slowinski, J.B., Page, R.D.M. (1999). How should species phylogenies be inferred from sequence data? *Syst. Biol.*, 48: 814-825.
- 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.
- 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.
- Vari, R.P., Ferraris, C.J. (no prelo). A new species of *Nannocharax* (Characiformes: Distichodontidae) from Cameron, with the description of contact organs and breeding tubercles in the genus. Proceedings of the Biological Society of Washington.
- Weitzman, S.H. (1954). The osteology and relationships of the South American characoid fishes of the subfamily Gasteropelecinae. Stanford Ichthyol. Bull., 4(1): 213-263.
- Weitzman, S.H. (1960). Further notes on the relationships and classification of the South American characoid fishes of the subfamily Gasteropelecinae. Stanford Ichthyol. Bull., 7(4): 217-239.
- Weitzman, S.H. (1960 a). The phylogenetic relationships of *Triportheus*, a genus of South American Characid fishes. Stanford Ichthyol. Bull., 7(4): 239-244.
- Weitzman, S.H. (1962). The osteology of *Brycon meeki*, a generalized characid fish, with an osteological definition of the family. Stanford Ichthyol. Bull., 8(1): 1-77.
- Weitzman, S.H., Malabarba, L.R. (1998). Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). Pp. 161-170. 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.
- Weitzman, S.H., Palmer, L. (1996). Do freshwater hatchetfishes really fly? Tropical Fish Hobbyist, 45:195-206.

- Weitzman, S.H., Palmer, L. (2003). Family Gasteropelecidae (Freshwater hatchetfishes). Pp. 101-103. In: Reis, R. E., Kullander, S. O., Ferraris, C. J. (Eds.). Check list of the freshwater fishes of South and Central America (CLOFFSCA). Porto Alegre, EDIPUCRS, 729 pp.
- 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.
- Weitzman, S.H., Weitzman, M. (1982). Biogeography and evolutionary diversification. Pp. 403-422. In Neotropical freshwater fishes, with comments on the refuge theory. In: Prance, G.T. (Ed.), Biological Diversification in the Tropics. Columbia University Press, New York.
- Wiest, F.C. (1995). The specialized locomotory apparatus of the freshwater hatchetfish family Gasteropelecidae. Journal of Zoology, 236: 571-592.
- Xia, X., Xie, Z. (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. J. Heredity, 92: 371-373.
- Zanata, A.M. (2000). Estudo das relações filogenéticas do gênero *Brycon* Muller & Troschel, 1844 (Characidae; Characiformes). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 358 pp.
- Zardoya, R., Meyer, A., 1997. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of a 'living fossil', the coelacanth (*Latimeria chalumnae*). Genetics, 146: 995–1010.

































AY788037\_Citharinus\_sp  
AY788038\_Ichthyborus\_sp  
AY788084\_Xenocharax\_spillurus  
13112Bryconopssp  
3501Triportheuspantanalensis  
15580Triportheus\_orinocensis  
AY788082\_Triportheus\_angulatus  
19868Gasteropelecmacl6S  
19869Gasteropelecmacl6S  
11714Thoracocharaxsp  
11716Thoracocharaxsp  
12769Thoracocharaxsp  
22595Thoracocharaxl6S  
22596Thoracocharaxl6S  
22801Thoracocharaxstel  
19318Carnegiellastrigl6S  
23601Carnegiellamartl6S  
23602Carnegiellastrigl6S  
17027Carnegiellastrigl6S  
17030Carnegiellastrigl6S  
22802Carnegiellavesca

??  
??  
??  
TGAGGAGAAGATGGAACTGCAGGAGATCCAACTGAAGGAGGCCAAGCACATTGCTGAGGAGGCTGACCG  
TGAGGAGAAAATGGAGCTGCAGGAGATCCAGCTGAAGGAGGCCAAGCACATTGCTGAGGAGGCTGATCG  
TGAGGAGAAGATGGAGCTGCAGGAGATCCAGCTGAAGGAGGCCAAGCACATTGCTGAGGAGGCTGATCG  
TGAGGAGAAAATGGAGCTGCAGGAGATCCAGCTGAAGGAGGCCAAGCACATTGCTGAGGAGGCTGACCG  
??  
??  
TGAGGAGAAGATGGAACTGCAGGAGATCCAACTGAAGGAGGCCAAGCACATTGCTGAGGAGGCTGACCG  
TGAGGAGAAAATGGAGCTGCAGGAGATCCAGCTGAAGGAGGCCAAGCACATTGCTGAGGAGGCTGATCG  
??  
??  
TGAGGAGAAGATGGAGCTGCAGGAGATCCAGCTGAAGGAGGCCAAGCACATTGCTGAGGAGGCTGACCG  
??  
??  
TGAGGAGAAGATGGAGCTGCAGGAGATCCAGCTGAAGGAGGCCAAGCACATTGCTGAGGAGGCTGACCG  
TGAGGAGAAGATGGAGCTGCAGGAGATCCAGCTGAAGGAGGCCAAGCACATTGCTGAGGAGGCTGACCG



22595Thoracocharaxcf.stellatus ACTTAGCTGGTGTGCATCAATTCCTGGGGCCAAATTTTATTACAACATTAATTAACATGAAGCCCTCCATCTATTCTCAATACCAAACCCCAATTAIT  
22596Thoracocharaxcf.stellatus ACTTAGCTGGTGTGCATCAATTCCTGGGGCCAAATTTTATTACAACATTAATTAACATGAAGCCCTCCATCTATTCTCAATACCAAACCCCAATTAIT  
22801Thoracocharaxstellatus ACTTAGCCGGTGTGCATCAATTCCTGGGGCCAAATTTTATTACAACATTAATTAACATGAAGCCCTCCATCTATTCTCAATACCAAACCCCAATTAIT  
19869Gasteropeleucusmaculatus ATCTGGCCGGTGTGCATCAATTTAGGGGCAATTAATTTATTACAACATTAATTAACATGAAGCCCTCCATCTATTCTCAATACCAAACCCCAATTAIT  
19871Gasteropeleucusmaculatus ATCTGGCCGGTGTGCATCAATTTAGGGGCAATTAATTTATTACAACATTAATTAACATGAAGCCCTCCATCTATTCTCAATACCAAACCCCAATTAIT  
22803Gasteropeleucussternichla ATTTAGCTGGTGTTCCTCAATTTAGGGGCAATTAATTTATTACAACATTAATTAACATGAAGCCCTCCATCTATTCTCAATACCAAACCCCAATTAIT  
22974Gasteropeleucussternichla ATTTAGCTGGTGTTCCTCAATTTAGGGGCAATTAATTTATTACAACATTAATTAACATGAAGCCCTCCATCTATTCTCAATACCAAACCCCAATTAIT  
7616Salminusshilarii ACCTTGTGGTGTTCCTCAATTTAGGGGCAATTAATTTATTACAACATTAATTAACATGAAGCCCTCCATCTATTCTCAATACCAAACCCCAATTAIT  
9025Salminusbrasiliensis ACCTTGTGGTGTTCCTCAATTTAGGGGCAATTAATTTATTACAACATTAATTAACATGAAGCCCTCCATCTATTCTCAATACCAAACCCCAATTAIT  
3501Triportheusparanaensis ATCTCGAGGAGTCTCTCAATTTAGGGGCAATTAATTTATTACAACATTAATTAACATGAAGCCCTCCATCTATTCTCAATACCAAACCCCAATTAIT  
15580Triportheusorinocensis ACCTCGAGGAGTCTCTCAATTTAGGGGCAATTAATTTATTACAACATTAATTAACATGAAGCCCTCCATCTATTCTCAATACCAAACCCCAATTAIT

501 600  
17027Carnegiellastrigata TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT  
17030Carnegiellastrigata TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT  
19318Carnegiellastrigata TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT  
22802Carnegiellavesca TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT  
23602Carnegiellamarthae TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT  
11714Thoracocharaxsp TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT  
11716Thoracocharaxsp TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT  
12769Thoracocharaxsp TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT  
8740Thoracocharaxcf.stellatus TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT  
22595Thoracocharaxcf.stellatus TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT  
22596Thoracocharaxcf.stellatus TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT  
22801Thoracocharaxstellatus TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT  
19869Gasteropeleucusmaculatus TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT  
19871Gasteropeleucusmaculatus TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT  
22803Gasteropeleucussternichla TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT  
22974Gasteropeleucussternichla TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT  
7616Salminusshilarii TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT  
9025Salminusbrasiliensis TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT  
3501Triportheusparanaensis TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT  
15580Triportheusorinocensis TGTATGAGCTGTTTGTAGTAACCGCAGTCTCTCTCTCTCTCCCTGCGTGTCTAGCAGCTGGAATTACAATACTTTTAAACAGACCGGAAACCTTAAACACT

601 654  
17027Carnegiellastrigata ACATTTTTGACCCCTCCGGAGGGAGAGATCCAAATCTTTATCAACATTTAATTT  
17030Carnegiellastrigata ACATTTTTGACCCCTCCGGAGGGAGAGATCCAAATCTTTATCAACATTTAATTT  
19318Carnegiellastrigata ACATTTTTGACCCCTCCGGAGGGAGAGATCCAAATCTTTATCAACATTTGTTT  
22802Carnegiellavesca ACATTTTTGACCCCTCCGGAGGGAGAGATCCAAATCTTTATCAACATTTAATTT  
23601Carnegiellamarthae ACATTTTTGACCCCTCCGGAGGGAGAGATCCAAATCTTTATCAACATTTAATTT  
23602Carnegiellastrigatta ACATTTTTGACCCCTCCGGAGGGAGAGATCCAAATCTTTATCAACATTTAATTT  
11714Thoracocharaxsp ACCTTCTCGACCCGAGGGG????????????????????????????????  
11716Thoracocharaxsp ACCTTCTCGACCCGAGGGGAGGGAGACCCAAATCTTT????????????  
12769Thoracocharaxsp ACA??  
8740Thoracocharaxcf.stellatus ACCTTCTCGACCCGAGGGG????????????????????????????  
22595Thoracocharaxcf.stellatus ACCTTCTTTGACCCGAGGGG????????????????????????????  
22596Thoracocharaxcf.stellatus ACCTTCTTTGACCCGAGGGG????????????????????????????  
22801Thoracocharaxstellatus ACCTTCTTTGACCCGAGGGGAGGGAGACCCAAATCTTTATCAACATTTAATTT  
19869Gasteropeleucusmaculatus ACATTTTTGACCCGCTGGAGGGAGGGAGACCCAAATCTCTATCAACATTTAATTT  
19871Gasteropeleucusmaculatus ACATTTTTGACCCGCTGGAGGGAGGGAGACCCAAATCTCTATCAACAA????  
22803Gasteropeleucussternichla ACATTTTGGACCCAGTGGAGGGAGGGAGACCCAAATCTTTATCAACAGTTATTC  
22974Gasteropeleucussternichla ACATTTTGGACCCAGCGGGAGGGAGATCCAAATCTTTATCAACATTTAATTT  
7616Salminusshilarii ACTTTTTGACCTCTCGGGGGGAGGGTACCCCAATCTATCAACAA????  
9025Salminusbrasiliensis ACATTTTTGACCCCTCGAGGGAGGGGAGACCCAAATCTATCAACACTGTTC  
3501Triportheusparanaensis ACTTTCTGGACCCCTCGGGGGGAGGGAGACCCAAATTTATATCAACACTGGTC  
15580Triportheusorinocensis ACTTTCTGGATCCTCGGGGGGAGGGAGACCCAAATCTTATATCAACACTAGTC