

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

GLEISY SEMENCIO AVELINO DOS SANTOS

Doutorado

**ANÁLISE DAS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE AS  
SUBFAMÍLIAS DE CHARACIDAE (OSTARIOPHYSI:  
CHARACIFORMES) UTILIZANDO SEQUÊNCIAS DE DNA  
MITOCONDRIAL E NUCLEAR**

ORIENTADOR: Prof. Dr. CLAUDIO DE OLIVEIRA

Botucatu – SP  
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

GLEISY SEMENCIO AVELINO DOS SANTOS

**ANÁLISE DAS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE AS  
SUBFAMÍLIAS DE CHARACIDAE (OSTARIOPHYSI:  
CHARACIFORMES) UTILIZANDO SEQUÊNCIAS DE DNA  
MITOCONDRIAL E NUCLEAR**

Tese apresentada ao Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de DOUTOR em Ciências Biológicas, área de concentração: Zoologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. CLAUDIO DE OLIVEIRA

Botucatu – SP  
2011

## **Dedicatória**

A toda minha família, em especial meu marido Márcio Éder.

Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,  
Mas não esqueço de que minha vida  
É a maior empresa do mundo...  
E que posso evitar que ela vá à falência.  
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver  
Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.  
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e  
Se tornar um autor da própria história...  
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar  
Um oásis no recôndito da sua alma...  
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.  
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.  
É saber falar de si mesmo.  
É ter coragem para ouvir um “Não”!!!  
É ter segurança para receber uma crítica,  
Mesmo que injusta...  
  
Pedras no caminho?  
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...

**(Fernando Pessoa)**

## **Agradecimentos**

Expresso os meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização desse trabalho, em especial:

A Deus, que sempre me mostra o caminho a seguir, e me conduz nele com seu amor de Pai, me conduziu em mais uma etapa de minha vida.

Ao meu marido, Márcio Éder, com quem divido uma vida de amor, carinho e companheirismo, obrigada pelo seu apoio e incentivo, te amo.

Aos meus pais e minhas irmãs, cujo amor e carinho que nos une, me mostram que família é tudo na vida de uma pessoa.

Ao Prof. Dr. Claudio de Oliveira, pela orientação, pelos valiosos conhecimentos transmitidos, pela paciência e pela confiança em meu trabalho. Muito obrigada professor, por esses anos de trabalho juntos.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti pela dedicação e apoio ao laboratório de Biologia e Genética de Peixes e pelo exemplo de profissionalismo.

A minha querida amiga Patrícia, cuja amizade é além do laboratório.

A todos os colegas e amigos do laboratório de Biologia e Genética de Peixes, que durante esses anos convivemos mais entre nós do que com nossas próprias famílias, obrigada pelo companheirismo, pelo auxílio e pela vivência do dia a dia.

Ao programa de Pós-Graduação pelo auxílio na realização deste estudo e aos funcionários da secção de Pós-Graduação pelo apoio.

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

Aos funcionários do Departamento de Morfologia, à Luciana por todo auxílio, à D. Tera e D. Iolanda pelo convívio carinhoso desses anos.

À CAPES por quase um ano de bolsa concedida e a FAPESP pela concessão da bolsa de estudo e o financiamento do projeto de pesquisa.

## AVISO

Esta tese é parte dos requerimentos necessários à obtenção do título de Doutor, área de Zoologia, e como tal, não deve ser vista como uma publicação no senso do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (apesar de disponível publicamente sem restrições). Desta forma, quaisquer informações inéditas, opiniões e hipóteses, bem como nomes novos, não estão disponíveis na literatura zoológica. Pessoas interessadas devem estar cientes de que referências públicas ao conteúdo deste estudo, na sua presente forma, somente devem ser feitas com a aprovação prévias do autor.

## NOTICE

This thesis is a partial requirement for the Doctor degree in Zoology and, as such, should not be considered as a publication in the sense of the International Code of Zoological Nomenclature (although it is available without restrictions). Therefore, any new information, opinions, and hypotheses, as well as new names, are not available in the zoological literature. Interested people are advised that any public reference to this study, in its current form, should only be done after previous acceptance of the author.

## RESUMO

Entre os Ostariophysi, os Characiformes são peixes exclusivamente de água doce e encontram-se distribuídos nas Américas e na África, atingindo maior diversidade nas principais drenagens neotropicais. Esta ordem compreende cerca de 2000 mil espécies, dividida em 18 famílias, sendo quatro africanas e as demais neotropicais. A família Characidae é o grupo mais especioso entre os Characiformes, abrangendo cerca de 1100 espécies válidas, divididas em 14 subfamílias e com diversos gêneros considerados *incertae sedis*. Ao longo dos anos essa família vem sofrendo várias modificações na sua classificação, mas muito pouco se conhece sobre as relações filogenéticas de seus membros constituintes. A própria monofilia da família ainda é muito discutida. O objetivo principal do presente trabalho foi testar a hipótese segundo a qual a família Characidae é monofilética, através da análise de sequências de DNA mitocondrial (16S, Citocromo B e ATPase 8/6) e nuclear (Rag1, Rag2, Myh6, Sreb2 e Glyt) de representantes de cada uma das subfamílias de Characidae, de gêneros considerados *incertae sedis* em Characidae, de todas as demais famílias de Characiformes e de representantes de Cypriniformes (como grupo externo). O monofiletismo de Characiformes é confirmado no presente estudo, corroborando vários estudos anteriores. As 14 subfamílias reconhecidas em Characidae, não formam um grupo monofilético, em nenhuma das filogenias geradas (máxima verossimilhança, máxima parcimônia e análise Bayesiana), refutando a hipótese de monofilia de Characidae. Por outro lado, muitos grupos monofiléticos foram identificados em Characiformes, inclusive um grupo de caracídeos que é identificado como família Characidae, monofilética.



## ABSTRACT

Among the Ostariophysi, Characiformes are exclusively freshwater fish distributed in the Americas and Africa, reaching the greatest diversity in the major drainages in the neotropics. This order comprises some 2,000 species, divided into 18 families, being four African and the remaining Neotropical. The family Characidae is the richest group among Characiformes, comprising about 1100 valid species, divided in 14 subfamilies and several genera considered *incertae sedis*. Over the years this family has suffering several modifications in its classification, but very little is known about the phylogenetic relationships of its members. Even the monophyly of the family is still debated. The main objective of this study was to test the hypothesis that the family Characidae is monophyletic, through of analysis of mitochondrial DNA sequences (16S, Cytochrome B, and ATPase 8/6) and nuclear sequences (RAG1, RAG2, Myh6, Sreb2, and Glyt) of representatives of all the subfamilies of Characidae, of genera considered *incertae sedis* in Characidae, of representatives of all remained families of Characiformes, and representatives of Cypriniformes, as outgroup. The monophyly of Characiformes is confirmed in this study, corroborating several previous studies. The 14 subfamilies recognized in Characidae do not form a monophyletic group in any the generated phylogenies (maximum likelihood-ML, maximum parsimony-MP and Bayesian analysis-B), refuting the hypothesis of monophyly of Characidae. On the other hand, many monophyletic groups were identified in Characiformes, including a group of characids which is identified as a monophyletic family Characidae.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1 Ordem Characiformes	2
1.2 Família Characidae	4
1.3 Estudos moleculares e filogenéticos	8
<b>2. OBJETIVOS</b>	17
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	18
3.1 Materiais	18
3.2 Métodos	26
3.2.1 Extração de DNA	26
3.2.1.1 DNeasy Blood & Tissue	26
3.2.1.2 AquaPure Genomic	27
3.2.2 Amplificação dos fragmentos	27
3.2.3 Purificação do DNA	33
3.2.4 Reação de amplificação para o sequenciamento	33
3.2.5 Alinhamento das sequências e análise filogenética	35
<b>4. RESULTADOS</b>	37
4.1 Gene 16S	42
4.2 Gene Cytb	44
4.3 ATPase 8/6	46
4.4 Gene Rag1	48
4.5 Gene Rag2	50
4.6 Gene Myh6	52
4.7 Gene Sreb2	54
4.8 Gene Glyt	56
4.9 Análise conjunta dos genes 16S, Cytb, ATPase 8/6, Myh6, Rag1, Rag2, Sreb2 e Glyt	58
<b>5. DISCUSSÃO</b>	79
<b>6. CONCLUSÃO</b>	94

<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	96
<b>8. ANEXO</b>	106

# INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

Os peixes apresentam enorme diversidade em sua morfologia, em seus habitats e em sua biologia. Esta diversidade, em parte, é o que nos faz entender sua história evolutiva e estabelecer um sistema de classificação (Nelson, 2006).

O número de espécies de peixes válidas ultrapassa 31.000 (Eschmeyer e Fong, 2010), constituindo um pouco mais da metade do número total de aproximadamente 56.000 espécies de vertebrados (Pough, 2008). Entre os peixes cerca de 13.000 espécies são de água doce e aproximadamente 6.000 dessas espécies encontram-se na região Neotropical, das quais 4.475 são consideradas válidas e cerca de 1.550 são conhecidas, porém ainda não descritas formalmente (Reis et al., 2003), o que torna a ictiofauna de água doce Neotropical a mais rica de todo o planeta.

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

## 1.1 Ordem Characiformes

Entre os Ostariophysi, os Characiformes são peixes exclusivamente de água doce e encontram-se distribuídos nas Américas e na África, atingindo maior diversidade nas principais drenagens neotropicais (Géry, 1977). Esta ordem compreende cerca de duas mil espécies (Eschmeyer e Fong, 2010), divididas em 18 famílias (Nelson, 2006), sendo quatro africanas, Alestidae, Citharinidae, Distichodontidae e Hepsetidae e as demais neotropicais (Nelson, 2006).

Os Characiformes apresentam uma grande variação na forma corporal, estrutura da mandíbula, dentição e anatomia interna (Vari, 1998). Além disso, nessa ordem são encontrados desde espécies predadoras que alcançam cerca de 100 cm de comprimento total até espécies cujas formas adultas não ultrapassam 15 mm de comprimento total, as chamadas espécies miniaturas (Weitzman e Vari, 1988).

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

Embora muitos grupos dentro da ordem Characiformes tenham sido 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 proposta por Buckup (1991) e posteriormente publicada (Buckup, 1998) (Figura 1). Esse estudo, ainda que bastante importante, deve ser visto com muita cautela, pois o autor

utilizou apenas 27 táxons em seu grupo-interno, sendo apenas sete gêneros de Characidae.

Characiformes tem sido considerado um grupo relevante para a compreensão da história da Terra, por causa de seu confinamento em água doce, no entanto, como a história filogenética do grupo é ainda mal resolvida e tendo em vista a tremenda diversidade de formas viventes, principalmente na região Neotropical, o registro fóssil de Characiformes é ainda insuficiente (Malabarba e Malabarba, 2010).

A maioria das famílias tem sido reconhecida como monofilética, exceto a especiosa família Characidae. Os recentes avanços técnicos em sistemática molecular, bem como novos achados fósseis, têm aberto um debate sobre o relacionamento e a história biogeográfica dos Characiformes (Malabarba e Malabarba, 2010).

No trabalho de Malabarba e Malabarba (2010) são revisados os dados disponíveis de filogenia, distribuição de fósseis e de espécies viventes de Characiformes, a fim de avaliar as hipóteses biogeográficas históricas anteriormente propostas. Os autores consideram que a ausência de algumas linhagens e a baixa diversidade de Characiformes na África, pode ser resultado de vicariância juntamente com o endemismo de linhagens antigas de Characiformes dentro do antigo continente Gondwana.

Characiformes foram reconhecidos como grupo primeiramente por Müller (1842) e Müller e Troschel (1845), citados por Malabarba e Malabarba (2010), que apresentaram uma chave dicotômica de todos os gêneros reconhecidos, separadamente dos táxons não Ostariophysi (Malabarba e Malabarba, 2010). Fink e Fink (1981), foram os primeiros a definir essa ordem filogeneticamente baseados em sete sinapomorfias. A última revisão quantitativa geral foi feita por Eschmeyer e Fong (2010).

O monofiletismo de Characiformes foi recentemente contestado por Peng et al. (2006) baseado em sequências completas de DNA mitocondrial, entretanto, esses resultados devem ser vistos com cautela, dado o número baixo de Characiformes e de outros Ostariophysi analisados nesse trabalho e o possível efeito da atração dos braços longos (Malabarba e Malabarba, 2010).

## 1.2 Família Characidae

A família Characidae é o grupo mais especioso entre os Characiformes, abrangendo cerca de 1100 espécies válidas (257 descritas nos últimos dez anos) (Eschmeyer e Fong, 2010). São reconhecidas até o presente 14 subfamílias em Characidae, Agoniatinae, Aphyocharacinae, Bryconinae, Characinae, Cheirodontinae, Clupeocharacinae, Glandulocaudinae, Iguanodectinae, Rhoadsiinae, Serrasalminae, Stethaprioninae, Tetragonopterinae (Reis et al., 2003), Stevardiinae (Weitzman et al., 2005), e Triportheinae (Buckup et al., 2007). Eschmeyer e Fong (2010) reconhecem todas essas subfamílias, exceto Serrasalminae, que é elevada a nível de família, e Triportheinae, e além disso reconhecem mais quatro subfamílias Aphyoditeinae, Gymnocharacinae, Heterocharacinae, e Salmininae, propostas por Mirande (2009). Ao longo dos anos essa família vem sofrendo várias modificações na sua classificação, mas muito pouco se conhece sobre as relações filogenéticas de seus membros constituintes. A própria monofilia da família ainda é muito discutida. Isto decorre, dentre outras causas, do fato de que muitas espécies da família são de pequeno porte, apresentando redução no sistema da linha lateral, na complexidade do sistema esquelético, no número de raios das nadadeiras, na quantidade de escamas e diminuição do tamanho dos olhos em relação ao da cabeça, além de possuírem uma série de outros caracteres associados à pedomorfia, os quais podem ser convergentes ou homoplásticos, devendo ser utilizados com restrições nas análises cladísticas (Weitzman e Malabarba, 1998). Dos vários trabalhos realizados em diversos táxons de Characidae, o realizado por Lucena (1993) propôs a primeira hipótese filogenética abrangente para a família (Figura 2). Nesse estudo, o autor considerou a família Characidae monofilética (nó 110) e incluiu neste clado gêneros de Characiformes africanos e outros pertencentes às famílias Cynodontidae e Acestrorhynchidae (Figura 2). Estudos filogenéticos posteriores sugeriram diversos rearranjos na família Characidae, questionando profundamente sua monofilia (Lucena e Menezes, 1998; Weitzman e Malabarba, 1998; Zanata, 2000).

Mais recentemente, Malabarba e 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 caracídeos incluindo Roestinae, Gasteropelecidae, 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” (Figuras 3 e 4). 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 e Weitzman (2003) inclui, além de *Cyanocharax* e todos os Glandulocaudinae, os gêneros *Piabina*, *Creagrutus*, *Caiapobrycon*, *Boehlkea*, *Bryconacidnus*, *Ceratobranchia*, *Hemibrycon*, *Knodus*, *Microgenys*, *Montocheiroduon*, *Odontostoechus*, *Othonocheiroduus*, *Piabarchus*, *Rhinobrycon*, *Rhinopetitia*, *Attonitus* e *Hypobrycon* (Figura 3). Apesar de representar um avanço no entendimento das relações filogenéticas em Characidae, o estudo é baseado em relativamente poucos caracteres examinados (todos observáveis sem dissecação) sendo que a maior parte dos táxons do “Clade A” é parte de uma grande politomia não resolvida.

Além do citado acima, muitas questões sobre a composição e as relações internas das subfamílias de Characidae permanecem em aberto. Assim, por exemplo, Malabarba (1998), propôs uma nova diagnose para os Cheirodontinae, na qual a maioria dos 36 gêneros incluídos por Géry (1977) nessa subfamília foi excluída do grupo e considerada gêneros *incertae sedis* em Characidae. A subfamília Tetragonopterinae, outrora considerada como a subfamília mais bem sucedida entre os Characidae, estando presente em quase todos os ambientes neotropicais (Géry, 1977), não pode ser reconhecida como monofilética, assim como muitos de seus gêneros mais especiosos (Weitzman e Malabarba, 1998, Malabarba e Weitzman, 2003). Recentemente, para assegurar a monofilia de Tetragonopterinae, somente o gênero *Tetragonopterus* foi mantido no grupo e todos os demais gêneros de Tetragonopterinae foram considerados *incertae sedis* em Characidae (Reis, 2003). No último levantamento da fauna de água doce da região Neotropical, 88 gêneros e cerca de 620 espécies, anteriormente alocados em Tetragonopterinae, Cheirodontinae, Characinae, Bryconinae, Paragoniatinae e

Aphyocharacinae, foram alocados como *incertae sedis* em Characidae (Reis et al., 2003). Entre esses gêneros estão alguns dos gêneros mais especiosos e taxonomicamente pouco conhecidos de Characidae, como *Hyphessobrycon* (97 espécies), *Astyanax* (86 espécies), *Moenkhausia* (58 espécies), *Bryconamericus* (51 espécies), *Hemigrammus* (43 espécies) e *Creagrutus* (64 espécies) (Reis et al., 2003; Lima et al., 2003). Portanto, somente as subfamílias de Characidae que apresentavam alguma evidência de monofilia foram retidas no grupo, sendo elas: Clupeocharacinae (1 espécie), Agoniatinae (2 espécies), Tetragonopterinae (2 espécies), Roadsiinae (6 espécies), Aphyocharacinae (10 espécies), Stethaprioninae (12 espécies), Bryconinae (43 espécies), Cheirodontinae (46 espécies), Glandulocaudinae (50 espécies), Characinae (70 espécies) e Serrasalminae (72 espécies), num total de 79 gêneros e cerca de 325 espécies (Reis et al., 2003). Recentemente, Weitzman et al. (2005), mostraram que a subfamília Glandulocaudinae não era monofilética e propuseram a criação de uma nova subfamília, Stevardiinae. Assim, a subfamília Glandulocaudinae ficou restrita aos gêneros *Glandulocauda*, *Mimagoniates* e *Lophiobrycon* e seus demais gêneros passaram para a subfamília Stevardiinae.

Embora algumas das subfamílias de Characidae, tais como Serrasalminae (Machado-Allison, 1983), Glandulocaudinae (Weitzman e Menezes, 1998; Weitzman et al., 2005) e Cheirodontinae (Malabarba, 1998), tenham sido foco de estudos recentes, as relações filogenéticas entre as subfamílias de Characidae e entre essas e os demais Characiformes são ainda pouco conhecidas. De acordo com Weitzman e Malabarba (1998), para que haja progresso na elucidação das inter-relações filogenéticas dos táxons da família Characidae seriam necessárias análises mais detalhadas de muitos aspectos da anatomia dessas espécies, assim como o emprego de outros tipos de dados, como moleculares, fisiológicos e comportamentais.

Mirande (2009, 2010) analisou uma grande quantidade de gêneros e espécies de Characidae em seu trabalho, estudando 360 caracteres morfológicos para 160 espécies de Characidae e famílias relacionadas. Nesse estudo, o status de família, para Serrasalmidae, é suportado, e Acestrorhynchidae e Cynodontidae são incluídos em Characidae. *Engraulisoma taeniatum* é transferida de Characidae para Gasteropelecidae, com essas

alterações, o autor considera Characidae monofilético, sendo suportada por oito sinapomorfias, sendo apenas uma exclusiva. Várias novas subfamílias são propostas em Mirande (2009) e as subfamílias Aphyocharacinae, Aphyoditeinae, Characinae, Gymnocharacinae, e Stevardiinae são redefinidas. Os Glandulocaudinae são incluídos em Stevardiinae, juntamente com membros remanescentes do “clado A” de Malabarba e Weitzman (2003).

Mirande (2010), assim como no trabalho de 2009, estudou 360 caracteres morfológicos para 160 espécies de Characidae e famílias relacionadas (Figura 5). Neste trabalho o autor traz discussões e descrições morfológicas e comentários sobre implicações taxonômicas, alguns caracteres foram redefinidos ou adicionados do trabalho de 2009 e os resultados obtidos, foram ligeiramente diferentes do trabalho de 2009.

### 1.3 Estudos moleculares e filogenéticos

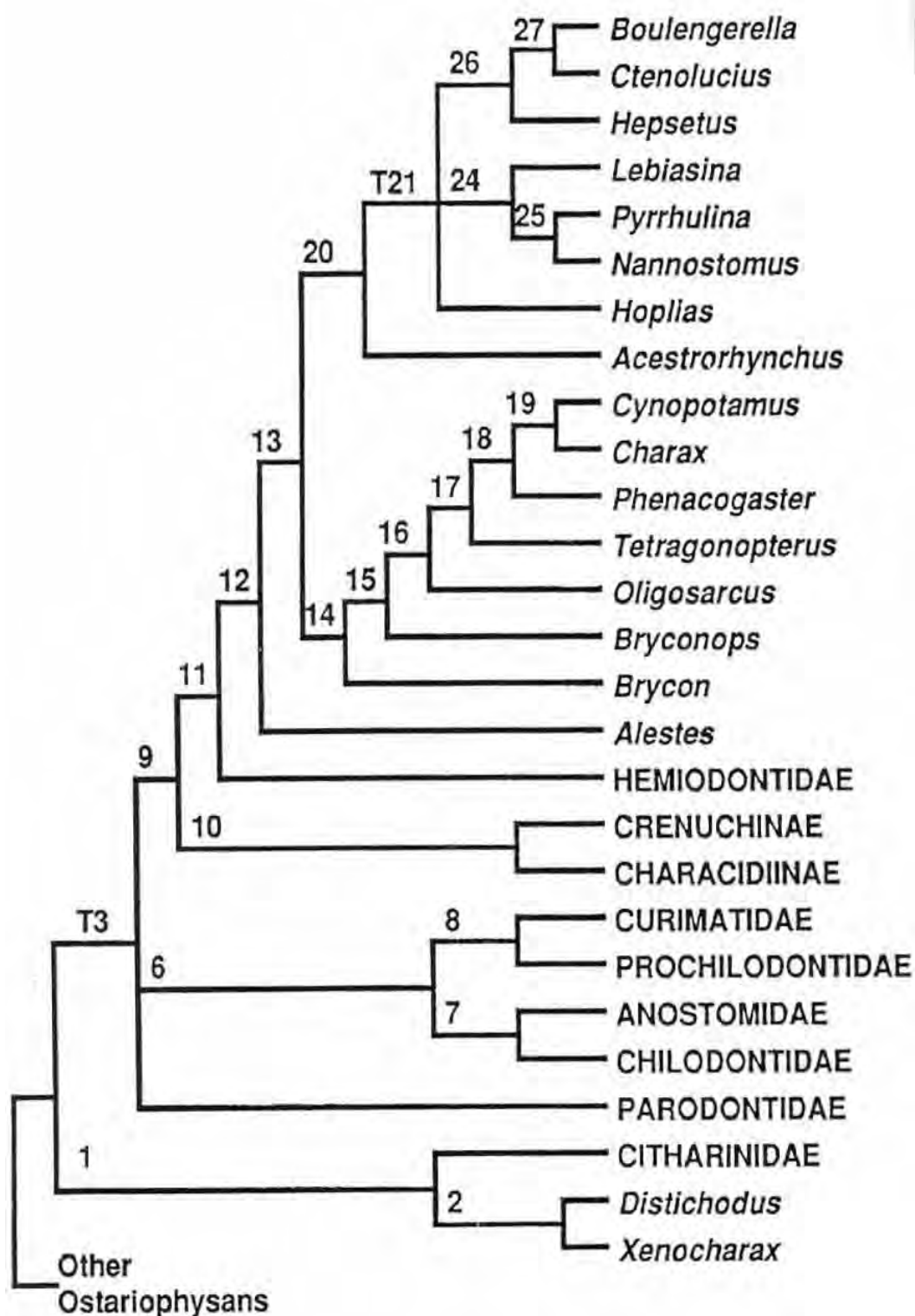
Estudos filogenéticos, utilizando dados de sequência de DNA com representantes da ordem Characiformes tiveram início em 1996 com a publicação de um estudo sobre a filogenia das piranhas e pacus (Ortí et al., 1996), sugerindo a existência de um padrão de relacionamento intergenérico ainda não conhecido 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). A filogenia molecular de consenso, utilizando dados de genes mitocondriais, obtida por Ortí (1997) está apresentada na Figura 6 e duas filogenias obtidas com o gene nuclear Ependimina estão apresentadas na Figura 7. Essas filogenias são bastante diferentes das demais propostas para a ordem Characiformes com base em caracteres morfológicos, mas 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 empregada. Por outro lado, as relações inter-genéricas foram bem suportadas nas análises estatísticas (Figura 7).

Castro et al. (2004), estudaram a relação entre o gênero *Henochilus* e os demais componentes da ordem Characiformes utilizando dados morfológicos e dados moleculares. Os resultados moleculares mostraram que o gênero *Henochilus* forma uma unidade monofilética com o gênero *Brycon* e os dois são grupos irmãos de *Salminus*, sendo essas relações suportadas por altos valores de *bootstrap*.

Calcagnotto et al. (2005), estudaram 135 taxa da ordem Characiformes representando todas as famílias da África e América do Sul, com exceção de Curimatidae e Gasteropelecidae, utilizando seis genes sendo dois do DNA mitocondrial (16S e citocromo B) e quatro nucleares (Rag2, Fkh, Sia e Trop) (Figura 8). 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. Muitas das relações entre as famílias de Characiformes foram bem resolvidas e a monofilia de vários grupos como Distichodontidae,

Citharinidae, Alestidae e Characidae foi recuperada. 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 (Figura 8).

Uma análise filogenética de Characidae utilizando dados moleculares, sendo três genes mitocondriais e um gene nuclear, foi apresentada por Javonillo et al. (2010) (Figura 9). Foram estudados 57 táxons representando sete subfamílias de Characidae, um membro de Gasteropelecidae e 22 gêneros de *incertae sedis*, além de sequências de DNA de outros Characidae, obtidas no GenBank. Através das análises por máxima parcimônia e análise Bayesiana, segundo os autores, foram rejeitadas as monofilias de certos grupos e de outros não. Assim, por exemplo, o “clado A”, proposto por Malabarba e Weitzman (2003) (Figura 5), foi corroborado como monofilético. Foi proposto no trabalho de Javonillo et al. (2010), um grupo irmão para o “clado A”, chamado pelos autores, de “clado B” o qual inclui *Exodon* e exemplares de Cheirodontinae, Aphyocharacinae, Tetragonopterinae e Characinae (excluindo *Gnathocharax*). E como grupo irmão dos cladogramas A e B, foi proposto o “clado C”, contendo representantes de gêneros de *incertae sedis* e membros de Stethaprioninae.



**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.

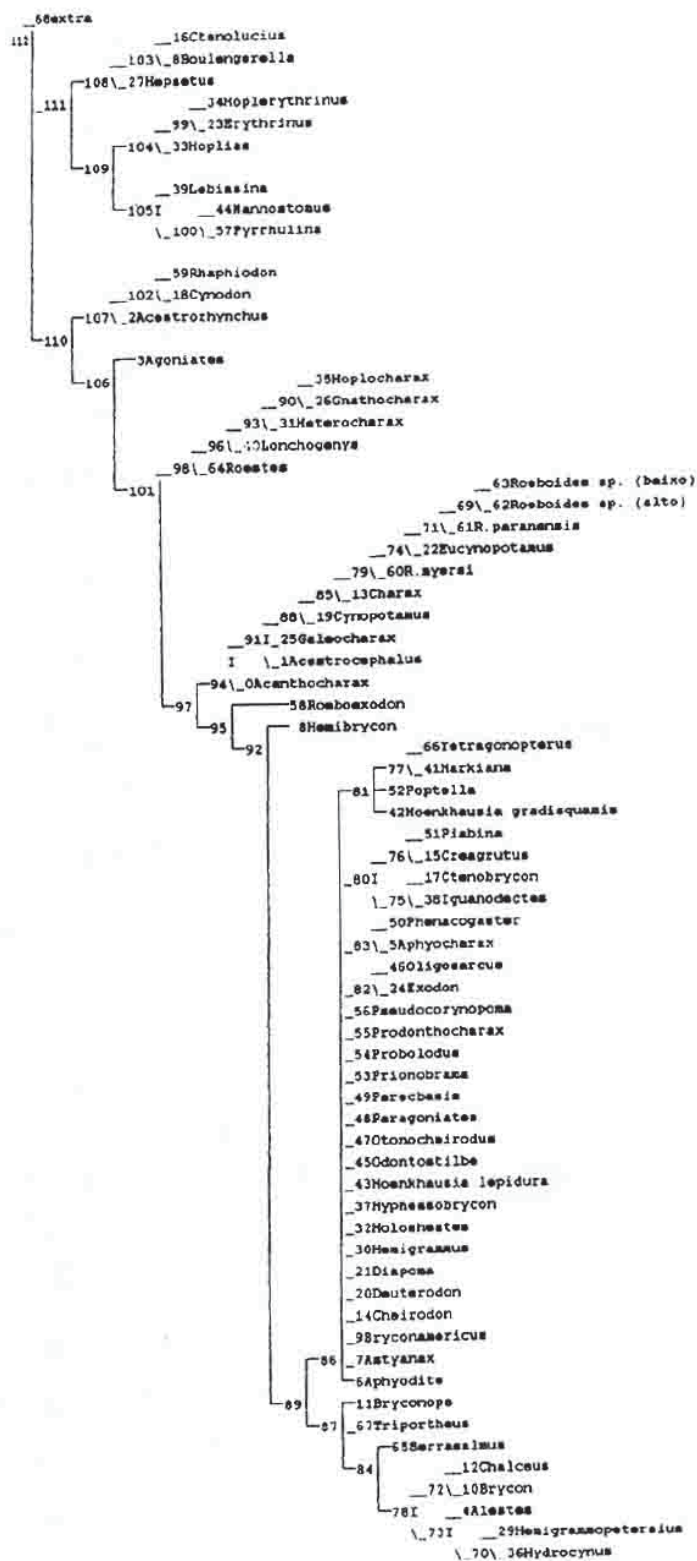
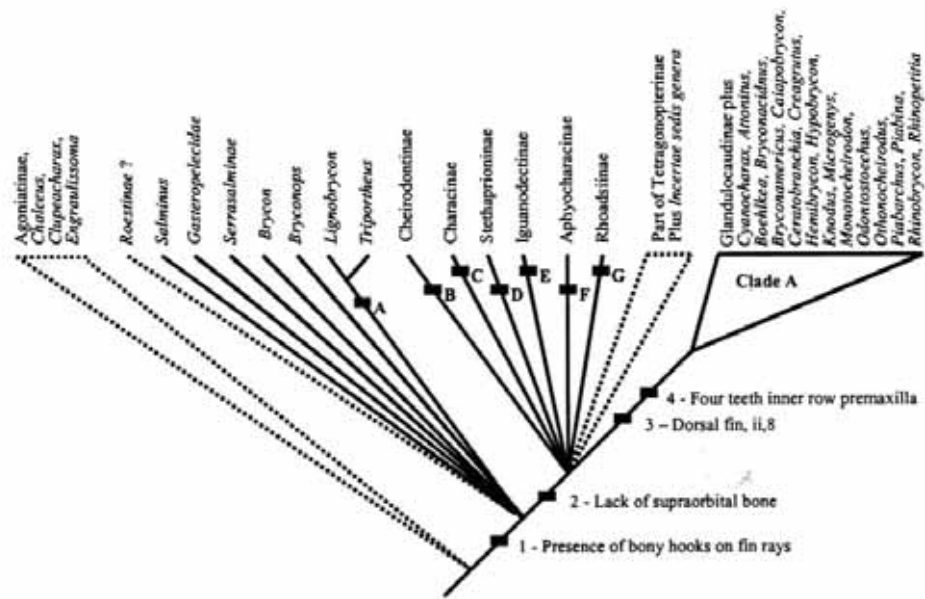
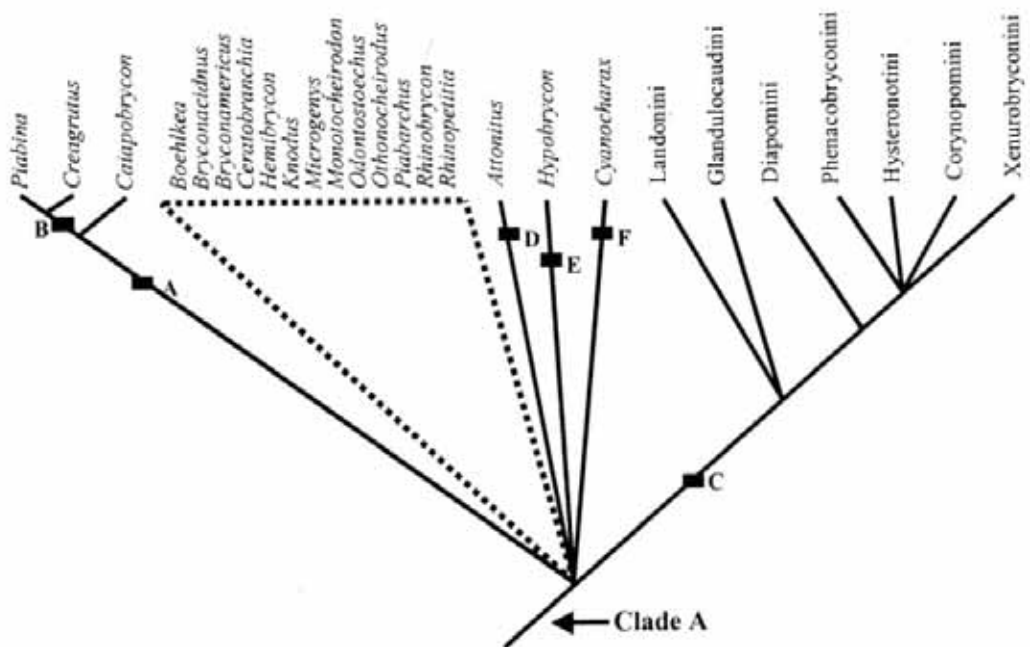


Figura 2. Hipótese sobre as relações de diversos gêneros de Characidae, segundo Lucena (1993).

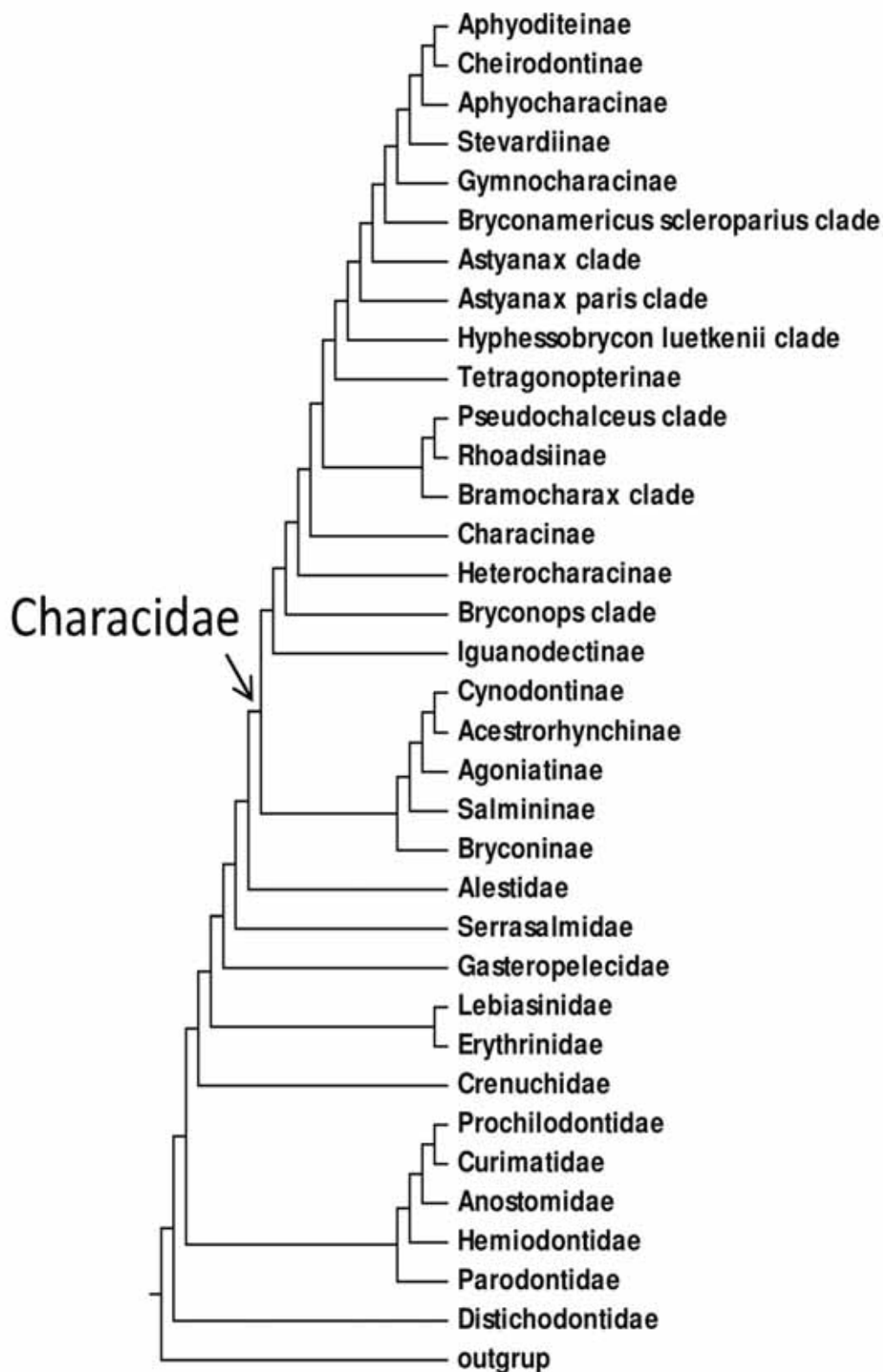


**Figura 3.** Cladograma resumindo o conhecimento atual sobre as relações de Characidae, Gasteropelecidae e Roestinae segundo Malabarba e Weitzman (2003).

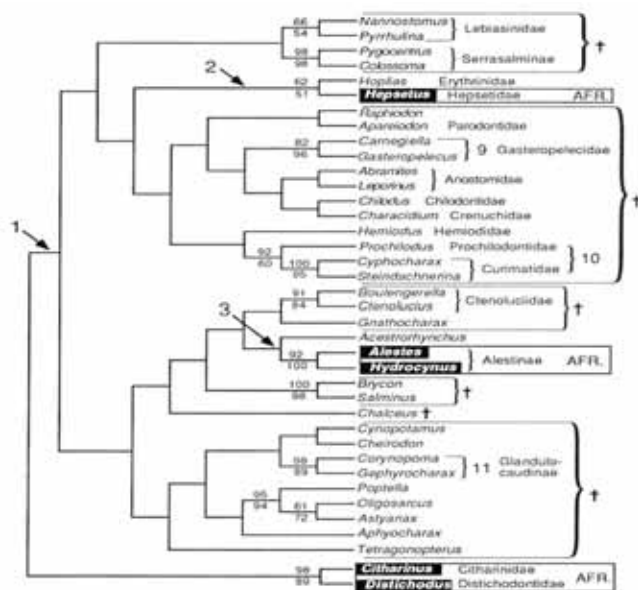


**Figura 4.** Cladograma mostrando as relações conhecidas entre os membros do "Clade A" segundo Malabarba e Weitzman (2003).

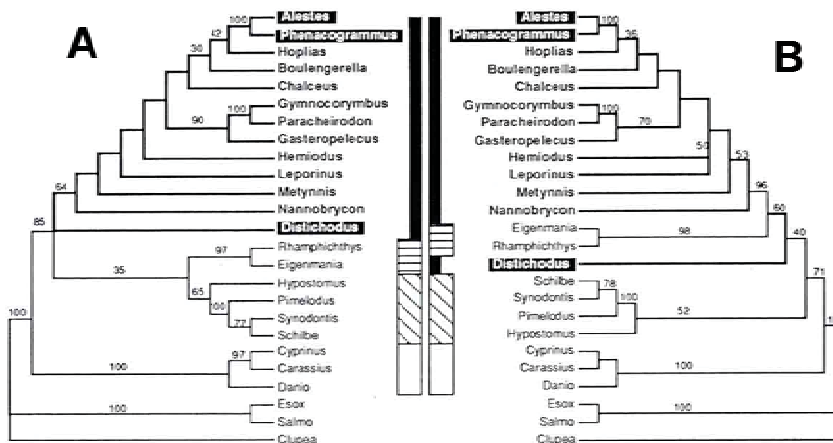




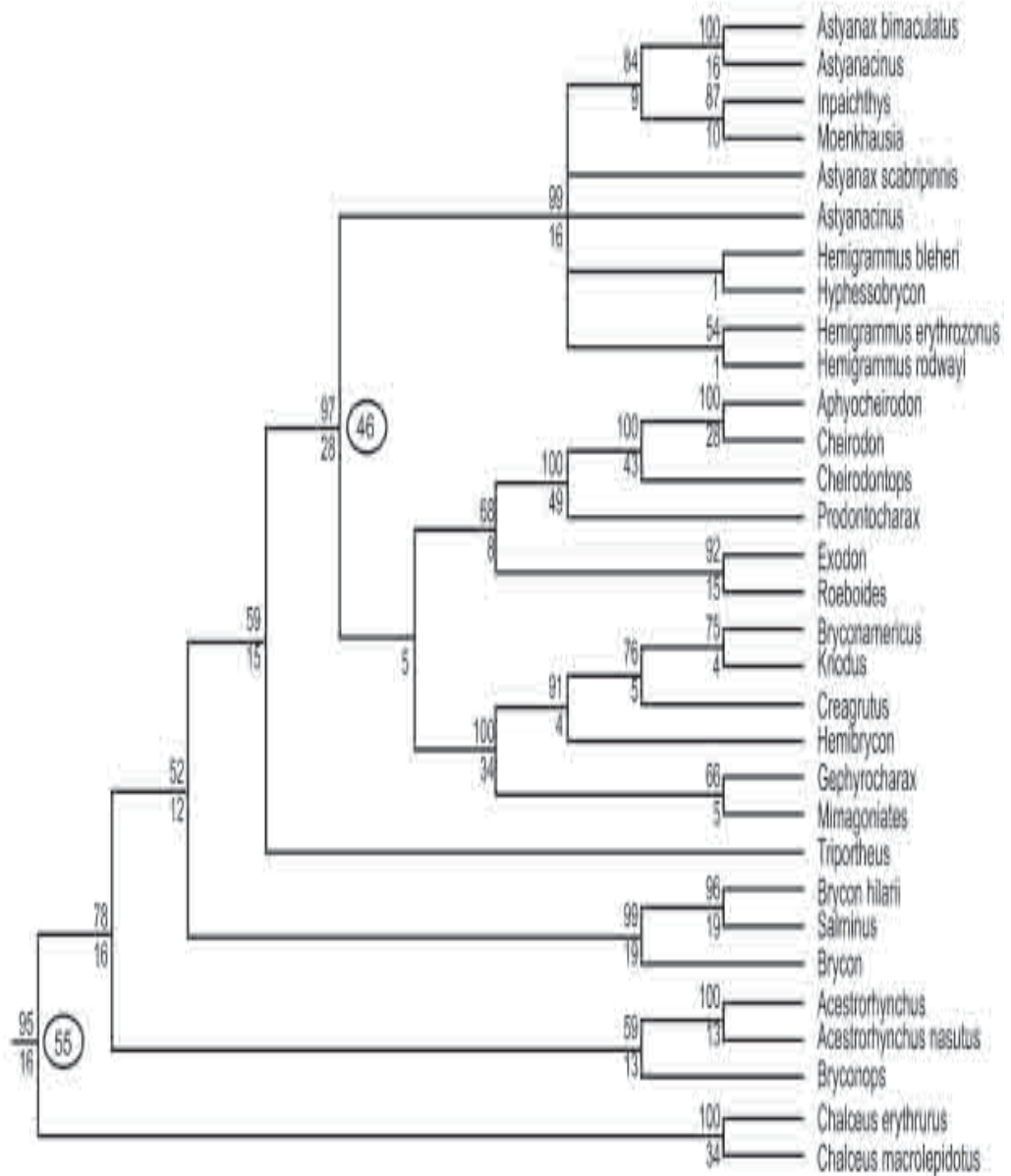
**Figura 5.** Resumo da hipótese apresentada por Miranda (2010).



**Figura 6.** 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.



**Figura 7.** Árvores de consenso obtidas para Characiformes e outros grupos externos utilizando seqüências parciais do gene ependimina, segundo Ortí (1997). Em (a) foram utilizadas todas as posições e em (b) foram excluídas as transições nas terceiras posições dos códons. Os números acima dos ramos representam os valores de bootstrap obtidos nas análises de máxima parcimônia. Os gêneros marcados em negro representam grupos africanos.



**Figura 8.** Árvore de consenso obtidas para Characidae, segundo Calcagnoto et al. (2005).

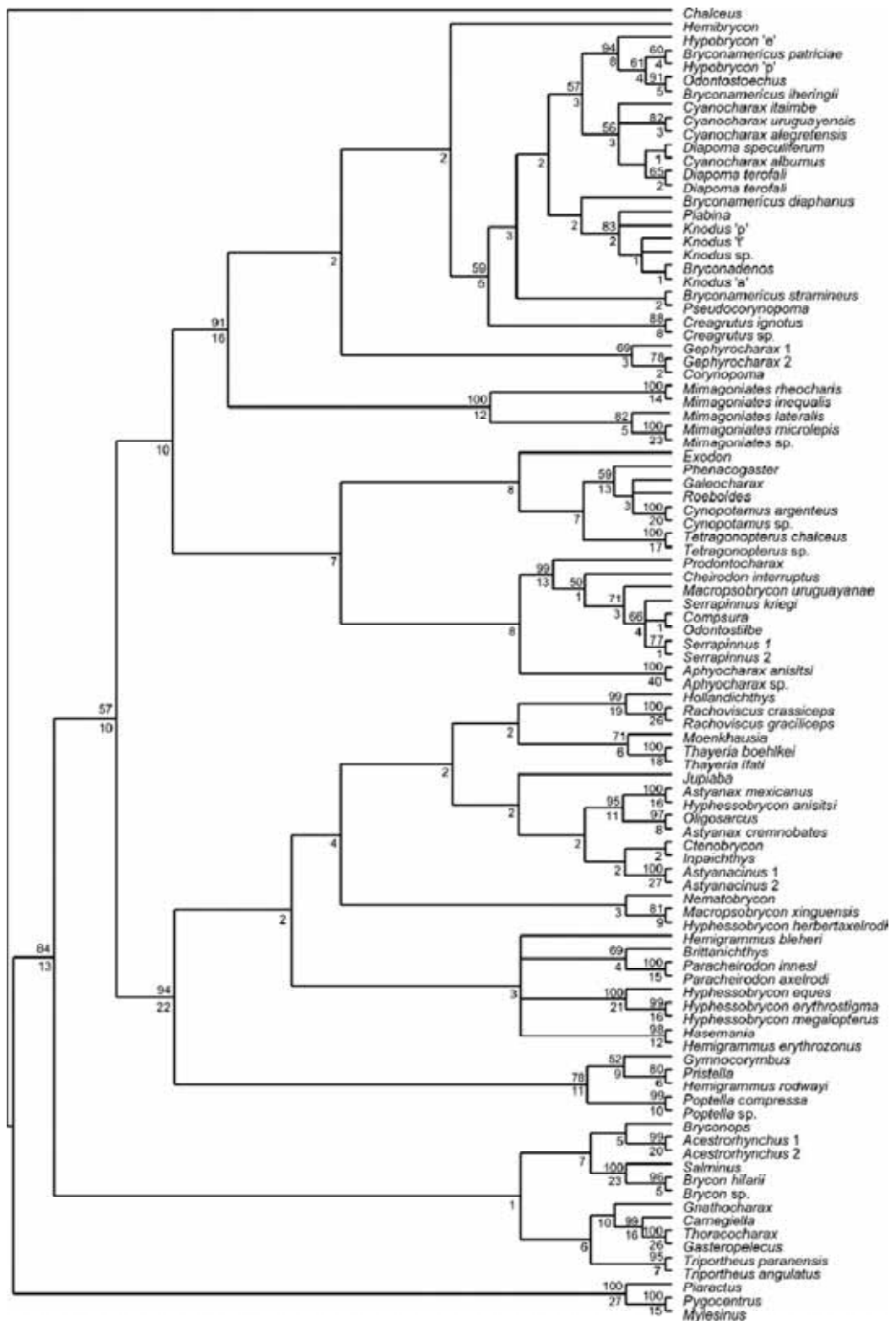


Figura 9. Hipótese de Javonillo et al. (2010). Os números acima dos nós são valores de bootstrap e os abaixo o índice de decaimento de Bremer.

## OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS

Considerando que a família Characidae é o grupo com maior diversidade taxonômica entre os Characiformes (65% das espécies da Ordem); que a grande maioria de suas espécies é de pequeno porte, o que dificulta as análises filogenéticas baseadas em caracteres morfológicos; que atualmente a família não pode ser diagnosticada como um grupo monofilético; e que as relações filogenéticas entre seus táxons constituintes são pouco conhecidas, o estudo de sequências de DNA de genes mitocondriais e nucleares pode ser de grande valia para um melhor entendimento das relações filogenéticas entre as subfamílias de Characidae e dessas com outras famílias de Characiformes. A amplitude da família não permite ainda uma análise extensiva de todos seus gêneros constituintes, razão pela qual no presente estudo optou-se por analisar as subfamílias já identificadas testando seus padrões de relacionamento dentro de Characidae e Characiformes e um número significativo de gêneros considerados *incertae sedis* na família por Lima et al. (2003).

O objetivo principal do presente trabalho foi testar a hipótese segundo a qual a família Characidae, como reconhecida por Reis et al. (2003), é monofilética.

Objetivos operacionais:

1. Sequenciar segmentos do genoma mitocondrial e nuclear de representantes de cada uma das subfamílias de Characidae, *sensu* Reis et al. (2003), Weitzman et al. (2005) e Buckup (2007), de representantes de gêneros considerados *incertae sedis* em Characidae e de grupos externos significativos (demais famílias de Characiformes e representantes de Cypriniformes).
2. Elaborar e testar hipóteses de relacionamento das subfamílias de Characidae com outros táxons de Characiformes.

# MATERIAIS E MÉTODOS

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

No presente estudo foi utilizada a classificação publicada por Nelson (2006), que reconhece 18 famílias de Characiformes: Acestrorhynchidae, Alestidae (Alestiidae), Anostomidae, Characidae (com as subfamílias Agoniatinae, Aphyocharacinae, Bryconinae, Characinae, Cheirodontinae, Clupeocharacinae, Glandulocaudinae, Iguanodectinae, Rhoadsiinae, Serrasalminae, Stethaprioninae, Tetragonopterinae), Chilodontidae, Citharinidae, Crenuchidae, Ctenoluciidae, Curimatidae, Cynodontidae, Distichodontidae, Erythrinidae, Gasteropelecidae, Hemiodontidae, Hepsetidae, Lebiasinidae, Parodontidae e Prochilodontidae. Foram consideradas também como subfamílias de Characidae, Stevardiinae, proposta por Weitzman et al. (2005) e Triportheinae, proposta por Buckup (2007).

No presente estudo foram analisados representantes de todas as subfamílias reconhecidas em Characidae, totalizando 70 amostras, 60% dos gêneros *incertae sedis* em Characidae com 71 amostras e representantes de todas as 18 famílias de Characiformes, com 72 amostras analisadas.

Praticamente todas as amostras foram obtidas através de coletas de campo, algumas foram obtidas em aquários e outras doadas por diversas instituições. Tecidos de representantes das famílias africanas de Characiformes: Citharinidae, Distichodontidae e Hepsetidae foram obtidas através de doação do Dr. Guillermo Ortí da University of Washington.

Como grupo externo foram analisadas duas espécies de Cypriniformes. Dados de 14 espécies de Characiformes foram obtidos do GenBank (Calcagnotto et al., 2005 e Javonillo et al., 2010).

A lista de todos os exemplares utilizados neste trabalho é mostrada na Tabela 1, juntamente com as localidades de coleta.

Todos os exemplares coletados para o presente estudo foram fixados em formol 10%, conservados em etanol 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 taxonômicos futuros.

Tabela 1. Relação de exemplares utilizados nas análises filogenéticas e seus respectivos dados sobre localidade de coleta.

Grupo/espécies	Lote	Animal	Localidade	Latitude/longitude
<b>Characidae/Agoniatinae</b>				
<i>Agoniatas anchovia</i>	LBP 6740	33471	Lago Catalão/Manaus/AM/Brasil	S 03°09.761' W 59°54.487'
<i>Agoniatas halecinus</i>	LBP 5503	26594	Igarapé Uiratapura/Laranjal do Jari/AP/Brasil	S 00°34'03" W 52°34'41"
<b>Characidae/Aphyocharacinae</b>				
<i>Aphyocharax alburnus</i>	LBP 1587	11774	Rio das Garças/Barra do Garça/MT/Brasil	S 15°54'18.1" W 2°19'24.2"
<i>Aphyocharax anisitsi</i>	LBP 3764	22190	Rio Negro/Aquidauana/MS/Brasil	S 19°34'33.7" W 56°14'49.5"
<i>Aphyocharax pusillus</i>	LBP 4046	22920	Rio Moa/Cruzeiro do Sul/AC/Brasil	S 7°37'20.0" W 2°47'42.2"
<b>Characidae/Bryconinae</b>				
<i>Brycon amazonicus</i>	LBP 2187	15565	Laguna de Castilleros/Caicara del Orinoco/Bolivar/Venezuela	N 07°30'50,9" W 66°09'19,8"
<i>Brycon insignis</i>	LBP 2369	16075	Lagoa Feia/Campos dos Goytacazes/RJ/Brasil	S 22°00' W 41°20'
<i>Henochilus wheatlandii</i>	LBP 1221	25846	Rio Santo Antônio/São Sebastião do Rio Preto/MG/Brasil	-
<b>Characidae/Characinae</b>				
<i>Acestrocephalus sardina</i>	LBP 6876	33172	Rio Negro/São Gabriel da Cachoeira/AM/Brasil	S 00°08.156' W 67°05.057'
<i>Charax leticiae</i>	LBP 1480	12700	Rio Taquari - Pesqueiro Recnato Alegre/Coxim/MS/Brasil	S 18°25'42.5" W 54°50'02.8"
<i>Cynopotamus kincaidi</i>	LBP 3225	19449	Lagoa marginal/Nobres/MT/Brasil	S 14°40'32,8" W 56°13'14,0"
<i>Cynopotamus venezuelae</i>	LBP 6132	29515	Rio Santa Rosa/Machiques de Perijá/Zulia/Venezuela	N 09°38'53,8" W 72°34'56,4"
<i>Galeocharax knerii</i>	LBP 3496	20164	Rio Tietê/Birigui/SP/Brasil	S 21°06'25.2" W 50°15'52.7"
<i>Gnathocharax steindachneri</i>	LBP 4496	24494	Igarapé Puxirituba/Barcelos/AM/Brasil	S 00°53'18.6" W 62°40'36/1"
<i>Heterocharax macrolepis</i>	LBP 4494	24485	Igarapé Puxirituba/Barcelos/AM/Brasil	S 00°53'18.6" W 62°40'36/1"
<i>Hoplocharax goethei</i>	LBP 4495	24489	Igarapé Puxirituba/Barcelos/AM/Brasil	S 00°53'18.6" W 62°40'36/1"
<i>Phenacogaster calverti</i>	LBP 5582	27299	Afluente Parnaíba/Santa Filomena/PI/Brasil	S 09°09'51" W 45°51'15"
<i>Roeboides guatemalensis</i>	LBP 2755	18529	Río Llano Sucio/Santa Rita Arriba/Colón/Panamá	N 09°19'26.2" W 79°46'08.2"
<b>Characidae/Cheirodontinae</b>				
<i>Acinocheirodon melanogramma</i>	LBP 8104	37551	Córrego Cachoeira/Bocaiúva/MG/Brasil	S 17°08'54.9" W 43°49'32.3"
<i>Aphyocheirodon hemigrammus</i>	LBP 8306	40025	Rio Araras/Araras/SP/Brasil	S 22°22'42.4" W 47°25'37.9"
<i>Cheirodon australe</i>	LBP 3115	19803	Río La Laja/Monte Aguila/VIII Region/Chile	S 37°12'54.8" W 72°26'49.1"
<i>Cheirodon ibicuihensis</i>	LBP 4777	25598	Rio Guaíba/Barra do Ribeiro/RS/Brasil	S 30°18'03.9" W 51°20'40.8"
<i>Compsura heterura</i>	LBP 4733	24984	Rio Ceará-Mirim/Natal/RN/Brasil	S 05°37'47" W 35°37'09"
<i>Heterocheirodon yatai</i>	LBP 4872	24954	Rio Yi/Durazno/Durazno/Uruguai	S 33°23'49" W 56°24'10"
<i>Kolpotocheirodon theloura</i>	LBP 5033	25982	Ribeirão Bananal/Distrito Federal/Brasil	S 15°43'42.7" W 47°54'39.4"
<i>Macropsobrycon uruguayanae</i>	LBP 6039	29061	Rio Piquiri/Cachoeira do Sul/RS/Brasil	30°14'46"S e 52°45'53"W
<i>Nanocheirodon insignis</i>	LBP 6104	27476	Rio Apon Medio/Machiques de Perijá/Zulia/Venezuela	N 10°09'42.0' W 72°25'58.0'
<i>Odontostilbe</i> sp.	LBP 4650	22626	Rio Araquá/Botucatu/SP/Brasil	S 22°47.135' W 48°28.892'
<i>Odontostilbe fugitiva</i>	LBP 4052	22932	Rio Moa/Cruzeiro do Sul/AC/Brasil	S 7°37'20.0" W 72°47'42.2"
<i>Prodonotocharax melanotus</i>	STRI	10	-	-
<i>Pseudocheirodon arnoldi</i>	STRI	5	-	-
<i>Saccoderma melanostigma</i>	LBP 6103	27475	Rio Apon Medio/Machiques de Perijá/Zulia/Venezuela	N 10°09'42.0' W 72°25'58.0"
<i>Serrapinnus calliurus</i>	LBP 3731	22121	Lagoa Marginal Rio Negro/Aquidauana/MS/Brasil	S 19°34'54.6' W 56°15'16.5"
<i>Serrapinnus piaba</i>	LBP 8972	41813	Córrego da Mata/Pedro Leopoldo/MG/Brasil	S 19°37'59.7" W 44°06'25.5"
<i>Spintherobolus ankoseion</i>	LBP 4725	24957	Arroio que desaguá no lago Acaraí/São Francisco do Sul/SC/Brasil	S 26°17'35" W 48°35'21"
<i>Spintherobolus broccae</i>	LBP 3916	22558	Riacho sem nome afluente do rio Vermelho/Bertioga/SP/Brasil	S 23°46'16,2" W 46°00'37,2"
<i>Spintherobolus leptoura</i>	LBP 7544	36098	Afluente rio Mumuna/Iguape/SP/Brasil	S 24°42'57.8" W 47°41'28.3"
Gen. e sp. novos	LBP 5699	27603	Córrego Taquaral/Barra do Garças/MT/Brasil	S 15°40.678' W 52°17.863"
<b>Characidae/Clupeacharacinae</b>				
<i>Clupeacharax anchoveoides</i>	LBP 5046	26012	Lagoa Bairro Caiçara/Cáceres/MT/Brasil	S 16°06'56' W 57°44'33'

Tabela 1. Continuação...

Characidae/Glandulocaudinae				
<i>Glandulocauda melanogenys</i>	LBP 4507	24538	Rio Paranapiacaba/Santo André/SP/Brasil	S 23°46'13.2" W 46°18'39.6"
<i>Lophobrycon weitzmani</i>	LBP 1225	38090	Rio Claro/Delfinópolis/MG/Brasil	S 20°20'32.2" W 46°47'12.2"
<i>Mimagoniates inequalis</i>	LBP 3383	21274	Arroio dos Corrientes/Pelotas/RS/Brasil	S 31°28'46.3" W 52°12'46.9"
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 1225	11077	Bertioga/SP/Brasil	S 23°57,769" W 46°10,625'
Characidae/Iguanodectinae				
<i>Iguanodectes geisleri</i>	LBP 4266	23840	Igarapé Boiboi/Barcelos/AM/Brasil	00°49'43.7" W 62°49'59.8"
<i>Piabucus melanostomus</i>	LBP 5109	26150	Lagoa Bairro Caçara/Cáceres/MT/Brasil	S 16°06'66" W 57°44'33"
Characidae/Rhoadsiinae				
<i>Carlana eigenmanni</i>	LBP 3300	19864	Rio Mandinga/Panama	-
<i>Carlana eigenmanni</i>	LBP 3301	19865	Rio Playon Chico/Panama	-
Characidae/Serrasalminae				
<i>Catoprion mento</i>	LBP 7556	35624	Lagoa Margina/Barão de Melgaço/MT/Brasil	S 16°11'39.5" W 55°48'25.1"
<i>Colossoma macropomum</i>	LBP 5173	26648	Rio Amazonas/Belém/PA/Brasil	S 01°18'20" W 48°36'28"
<i>Metynnis mola</i>	LBP 667	8050	Região de Rombado, afluente rio Pirai/Poconé/MT/Brasil	S 16°25,680" W 56°25,143'
<i>Metynnis lippincottianus</i>	LBP 6282	29688	Córrego Barbacena/Pontal/SP/Brasil	S 20°56'49.5" W 48°08'51.9"
<i>Myloplus rubripinnis</i>	LBP 2184	15570	Laguna de Castilleros/Caicara del Orinoco/Bolívar/Venezuela	N 07°30'50,9" W 66°09'19,8"
<i>Mylossoma duriventre</i>	LBP 1823	12921	Rio Araguaia/Barra do Garças/MT/Brasil	S 15°32' W 52°12'
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	LBP 4255	23803	CAUNESP/Jaboticabal/SP/Brasil	Piscicultura
<i>Pygocentrus cariba</i>	LBP 2229	15662	Afluente do rio Orinoco (Punta Brava)/Caicara del Orinoco/Bolívar/Venezuela	N 07°37'20,7" W 66°06'28,8"
<i>Serrasalmus maculatus</i>	LBP 3698	21836	Rio Paraná/Ilha Solteira/SP/Brasil	S 20°05'07.3" W 50°58'59"
<i>Serrasalmus spilopleura</i>	LBP 3499	20169	Rio Tietê/Birigui/SP/Brasil	S 21°06'25.2" W 50°15'52.7"
<i>Tometes trilobatus</i>	LBP 9072	42585	Rio Guamá/Ourém/PA/Brasil	S 01°34'17.0" W 47°10'10.5"
Characidae/Stethaprioninae				
<i>Brachychalcinus copei</i>	LBP 192	8853	Igarapé São Francisco/Rio Branco/AC/Brasil	S 9°56,271' W 67°52,923'
<i>Orthospinus franciscensis</i>	LBP 8105	37555	Rio Verde Grande/Jaíba/MG/Brasil	S 15°19'24.2" W 43°39'52.5"
<i>Poptella paraguayensis</i>	LBP 3732	21986	Lagoa Marginal Rio Negro/Aquidauana/MS/Brasil	S 19°34'54.6" W 56°15'16.5"
<i>Stethaprion crenatum</i>	LBP 4078	22994	Rio Japiim/Mâncio Lima/AC/Brasil	S 07°34'28.8" W 72°55'24.9"
Characidae/Stevardiinae				
<i>Corynopoma riisei</i> <sup>2</sup>	-	-	-	-
<i>Gephyrocharax atracaudatus</i>	LBP 2753	18519	Río Llano Sucio/Santa Rita Arriba/Colón/Panamá	N 09°19'26.2" W 79°46'08.2"
<i>Planaltina britskii</i>	LBP 2598	17243	Córrego Boa Vista dos Castilhos/Miraluz/SP/Brasil	S 21°00'46.6" W 49°41'25.1"
<i>Pseudocorynopoma heterandria</i>	LBP 2862	18570	Rio Fau/Miracatu/SP/Brasil	S 24°12,441' W 47°28,616'
<i>Tyttocharax madeirae</i>	LBP 5145	33166	Rio Japiim/Mâncio Lima/AC/Brasil	S 07°34'28.8" W 72°55'24.9"
<i>Xenrobrycon pteropus</i>	LBP 9054	42218	Mutumparaná/Mutumparaná/RO/Brasil	S 09°36'39.5" W 64°55'38.9"
Characidae/Tetragonopterinae				
<i>Tetragonopterus argenteus</i>	LBP 3758	22029	Rio Negro/Aquidauana/MS/Brasil	S 19°34'33.7" W 56°14'49.5"
<i>Tetragonopterus chalceus</i>	LBP 8268	37556	Rio Verde Grande/Jaíba/MG/Brasil	S 15°19'24.2" W 43°39'52.5"
Characidae incertae sedis				
<i>Aphyocharacidium bolivianum</i>	LBP 9055	42219	Arara/Arara/RO/Brasil	S 09°36'39.5" W 64°55'38.9"
<i>Aphyodite grammica</i>	LBP 9050	42214	Rio Madeira/Pacaás/Mutumparaná/RO/Brasil	S 09°37'05.3" W 64°56'01.3"
<i>Astyanacinus moorii</i>	LBP 5783	28195	Afluente rio Coxipó-Açu Prata/Rio Cuiabá/Cuiabá/MT/Brasil	S 21°21'03.1" W 46°29'33.2"
<i>Astyanax aeneus</i>	LBP 8938	42019	Chichancanab lagoon/Quintana Roo/México	19,882999420166/- 88,8710021972656
<i>Astyanax jordani</i>	LBP 4527	24599	Sem procedência/Brasil	-
<i>Astyanax mexicanus</i>	LBP 8937	42016	Ojo San Bernabe/Spring/Nuevo Leon/México	-
<i>Bario steindachneri</i>	LBP 4389	24187	Rio Branco/Porto Velho/RO/Brasil	S 09°34'10.7" W 63°58'08.2"
<i>Bramocharax baileyi</i>	LBP 8940	42025	Chisec/Chajmaic/Alta Verapaz/Guatemala	15,72 -89,94
<i>Bramocharax caballeroi</i>	LBP 8939	42022	Catemaco/Veracruz/México	18,877 -95,292

Tabela 1. Continuação...

<i>Bryconadenos tanaothoros</i> <sup>2</sup>	MCP 40399	-	-	-
<i>Bryconamericus emperador</i>	LBP 2754	18528	Río Llano Sucio/Santa Rita Arriba/Colón/Panamá	N 09°19'26.2" W 79°46'08.2"
<i>Bryconamericus exodon</i>	LBP 7123	34200	Córrego Lageadinho/Sapopema/PR/Brasil	S 23°55'29.0" W 50°37'27.3"
<i>Bryconella pallidifrons</i>	LBP 4646	24696	Aquário	-
<i>Bryconops affinis</i>	LBP 262	4168	Represa de Três Marias/Três Marias/MG/Brasil	S 18°13,661' W 45°14,857'
<i>Ceratobranchia cf. delotaenia</i>	LBP 3257	20042	Rio Chontabamba/Oxapampa/Pasco/Peru	S 10°36'06.6" W 075°29'10.8"
<i>Chalceus epakros</i>	LBP 5443	26504	Rio Jari/Almeirim/PA/Brasil	S 00°38'46" W 52°30'33"
<i>Chalceus erythrus</i>	LBP 4211	22727	Rio Juruá/Cruzeiro do Sul/AC/Brasil	S 07°09'49.6" W 73°43'29.7"
<i>Coptobrycon bilineatus</i>	LBP 3809	33169	Afluente rio Itatinga/Bertioga/SP/Brasil	S 23°45'01.2" W 46°09'52.9"
<i>Creagrutus peruanus</i>	LBP 3267	20057	Rio Santa Cruz/Pozuzo/Pasco/Peru	S 10°02'20.4" W 075°34'55.4"
<i>Ctenobrycon hauxwellianus</i>	LBP 4095	23538	Rio Japiim/Mâncio Lima/AC/Brasil	S 07°34'28.8" W 72°55'24.9"
<i>Cyanocharax alburnus</i>	LBP 4746	25516	Rio Guaíba/Barra do Ribeiro/RS/Brasil	S 30°17'07.0" W 51°18'01.1"
<i>Deuterodon iguape</i>	LBP 6827	33065	Rio Fau/Miracatu/SP/Brasil	S 24°12,441' W 47°28,616'
<i>Engraulisoma taeniatum</i>	LBP 4038	22896	Rio Moa/Cruzeiro do Sul/AC/Brasil	S 7°37'20.0" W 72°47'42.2"
<i>Engraulisoma taeniatum</i>	LBP 4038	22897	Rio Moa/Cruzeiro do Sul/AC/Brasil	S 7°37'20.0" W 72°47'42.2"
<i>Exodon paradoxus</i>	LBP 4006	23040	Lago Morto/São Félix do Araguaia/MT/Brasil	S 11°40'9" W 50°51'0.30"
<i>Gymnocorymbus ternetzi</i>	LBP 3737	21989	Lagoa Marginal Rio Negro/Aquidauana/MS/Brasil	S 19°34'54.6" W 56°15'16.5"
<i>Hasemania sp.</i>	LBP5967	28455	Rio Paraibuna/Comendador Levy Gasparian/RJ/Brasil	S 22°01'24.3" W 43°10'08.5"
Gen. e sp. novos	LBP 7243	33196	Rio Uberaba/Ponte Alta/MG/Brasil	S 19°40'59.8" W 48°40'08.6"
<i>Hemibrycon taeniurus</i>	LBP 6847	33168	Upper Arouca River/Trinidad Tobago	N 10°41.320' W 61°19.499'
<i>Hemigrammus marginatus</i>	LBP 6292	29419	Córrego Barbacena/Pontal/SP/Brasil	S 20°56'49.5" W 48°08'51.9"
<i>Hemigrammus ulreyi</i>	LBP 7604	36267	Lagoa Marginal rio Cuiabá/Barão de Melgaço/MT/Brasil	S 16°11'39.5" W 55°48'25.1"
<i>Hollandichthys multifasciatus</i>	LBP 698	8791	Afluente do rio Grande/Paranapiacaba, SP/Brasil	S 23°46.123' W 46°19.467'
<i>Hypessobrycon eques</i>	LBP 7615	36278	Lagoa Marginal rio Cuiabá/Barão de Melgaço/MT/Brasil	S 16°11'39.5" W 55°48'25.1"
<i>Hypessobrycon megalopterus</i>	LBP 7613	36932	Lagoa Marginal rio Cuiabá/Barão de Melgaço/MT/Brasil	S 16°11'39.5" W 55°48'25.1"
<i>Hypessobrycon reticulatus</i>	LBP 1049	8939	Afluente rio São João/Papandu/SC/Brasil	S 26°22.049' W 50°07.149'
<i>Hypobrycon maromba</i>	LBP 6750	33174	Rio Marombas/Curitibanos/SC/Brasil	S 27°19'49.6" W 50°45'05.4"
<i>Inpaichthys kerri</i>	LBP 4526	24597	Sem procedência/Brasil	-
<i>Jupiaba anteroides</i>	LBP 7067	34380	Igarapé Miúá/São Gabriel da Cachoeira/AM/Brasil	S 00°06.308' W 66°52.585'
<i>Jupiaba acanthogaster</i>	LBP 7935	37269	Rio dos Patos/Nova Mutum/MT/Brasil	S 13°48'03.1" W 56°01'38.4"
<i>Knodus meridae</i>	LBP 7569	15818	Rio Orinoco/Caicara del Orinoco /Bolívar/Venezuela	N 07°39'06.3" W 66°10'34.2"
<i>Leptagoniates steindachneri</i>	LBP 4137	23661	Rio Moa/Mâncio Lima/AC/Brasil	S 07°26'35.5" W 73°03'33.5"
<i>Lignobrycon myersi</i>	LBP 8094	37519	Rio do Braço/Ilhéus/BA/Brasil	S 14°41'11.7" W 39°16'28.0"
<i>Markiana nigripinnis</i>	LBP 663	8038	Região de Rombado, afluente rio Pirai/Poconé/MT/Brasil	S 16°25,680' W 56°25,143'
<i>Microschemobrycon casiquire</i>	LBP 8161	38058	Rio Tapajós/Pimental/PA/Brasil	S 04°32'25" W 56°15'15"
<i>Moenkhausia xinguensis</i>	LBP 6101	28443	Rio Culuene/Paranatinga/MT/Brasil	S 13°49'00.0" W 53°15'00.0"
<i>Myxioops aphos</i>	LBP 7184	33173	Rio Lençóis/Lençóis/BA/Brasil	S 12°33'41.8" W 41°24'09.3"
<i>Nematobrycon palmeri</i>	LBP 6124	33165	Aquário/Brasil	-
<i>Nematocharax venustus</i>	LBP 8106	37557	Rio Almada/Ilhéus/BA/Brasil	S 14°39'52.1' W 39°13'26.7"
<i>Odontostoechus lethostigmus</i>	LBP 6752	33171	Arroio Água Parada/Maquiné/RS/Brasil	29°39'42.8"S / 50°12'37.7"
<i>Oligosarcus paranensis</i>	LBP 3926	22582	Rio Paraitinguinha/Salesópolis/SP/Brasil	S 23°31'25.6" W 43°53'22.7"
<i>Oligosarcus hepsetus</i>	LBP 2377	16055	Lagoa Feia/Campos dos Goytacazes/RJ/Brasil	S 22°00' W 41°20'
<i>Paracheirodon axelrodi</i>	LBP 4472	24425	Igarapé Zalala/Barcelos/AM/Brasil	S 00°40'03.1" W 62°58'23.5"
<i>Paragoniates alburnus</i>	LBP 9208	43156	Rio Manapire/Cabruta/Guárico/Venezuela	N 7°52'04.1" W 66°12'40.1"
<i>Parecbasis cyclolepis</i>	LBP 9053	42217	Belmont – Foz/Belmont/RO/Brasil	S 08°37'17.2" W 63°49'25.7"
<i>Phenagoniates macrolepis</i>	LBP 6105	35623	Rio Apon Medio/Machiques de Perijá/Zulia/Venezuela	N 10°09'42.0" W 72°25'58.0"
<i>Piabarchus analis</i>	LBP 8514	38382	Rio Salobra/Cáceres/MT/Brasil	S 15°19'53.5" W 57°11'31.1"
<i>Piabina argentea</i>	LBP 3509	21306	Córrego da Hortelã/Botucatu/SP/Brasil	S 22°56'28.9" W 48°35'03.2"
<i>Prionobrama paraguayensis</i>	LBP 3230	19465	Lagoa marginal/Nobres/MT/Brasil	S 14°40'32.8" W 56°13'14.0"
<i>Prionobrama paraguayensis</i>	LBP 3230	19468	Lagoa marginal/Nobres/MT/Brasil	S 14°40'32.8" W 56°13'14.0"
<i>Pristella maxillaris</i>	LBP 2221	15637	Laguna de Castilleros/Caicara del Orinoco/Bolívar/Venezuela	N 07°30'50.9" W 66°09'19.8"
<i>Probolodus heterostomus</i>	LBP 6454	29141	Rio Paraíba do Sul/Guararema/SP/Brasil	S 23°21'38.2" W 45°59'69.0"

Tabela 1. Continuação...

<i>Psellogrammus kennedyi</i>	LBP 6578	31813	Lagoa marginal Rio Paraná/Marilena/PR/Brasil	S 22°38'49.4" W 53°04'36.9"
<i>Rachoviscus crassiceps</i>	LBP 7146	33170	Riacho sem nome/Guaratuba/PR/Brasil	S 25°55'27.6" W 48°36'39.5"
<i>Roeboexodon guyanensis</i>	LBP 5315	26921	Igarapé Uiratapura/Laranjal do Jari/AP/Brasil	S 00°34'03" W 52°34'41"
<i>Salminus brasiliensis</i>	LBP 850	9025	Rio Mogi-Guaçu/Pirassununga/SP/Brasil	S 21°55'37.6" W 47°22'04.4"
<i>Salminus franciscanus</i>	LBP 8090	37503	Rio São Francisco/Três Marias/MG/Brasil	S 18°11'21.0" W 45°15'10.3"
<i>Stygichthys typhlops</i>	LBP 8107	37558	Cacimba fazenda Lajeado/Jaíba/MG/Brasil	S 15°24'41.7" W 43°45'19.7"
<i>Thayeria obliqua</i>	LBP 5743	26891	Lagoa Marginal rio Corrente/Barra do Garças/MT/Brasil	S 15°19'57.6" W 52°12'10.4"
<i>Triportheus nematurus</i>	LBP 39	3503	Rio Miranda/Corumbá/MS/Brasil	S 19°34,630' W 57°01,123'
<i>Triportheus orinocensis</i>	LBP 2663	15580	Laguna de Castilleros/Caicara del Orinoco /Bolívar/Venezuela	N 07°30'50.9" W 66°09'19.8"
<i>Xenagoniates bondi</i>	LBP 3074	19694	Rio Orinoco/Caicara del Orinoco/Bolívar/Venezuela	N 07°38'11.6" W 66°19'04.2"
<b>Acestrorhynchidae</b>				
<i>Acestrorhynchus falcatus</i>	LBP 4191	23707	Igarapé Boiibo/Barcelos/AM/Brasil	S 00°49'43.7" W 62°49'59.8"
<i>Acestrorhynchus lacustris</i>	LBP 2158	15173	Rio Tietê/Botucatu/SP/Brasil	S 27°37' W 48°10'
<i>Acestrorhynchus cf. nasutus</i>	LBP 7035	34110	Igarapé Ya-Mirim/São Gabriel da Cachoeira/AM/Brasil	N 00°16.259' W 66°38.365'
<i>Acestrorhynchus pantaneiro</i>	LBP 3755	22014	Rio Negro/Aquidauana/MS/Brasil	S 19°34'33.7" W 56°14'49.5"
<b>Alestidae</b>				
<i>Alestes</i> sp.	LBP 7530	35376	-	-
<i>Alestopetersius caudalis</i> <sup>1</sup>	-	-	-	-
<i>Bathyaethiops breuseghemi</i> <sup>1</sup>	AMNH2334 22	-	-	-
<i>Brycinus carolinae</i> <sup>1</sup>	AMNH2336 28	-	-	-
<i>Brycinus longipinnis</i>	LBP 7529	35375	-	-
<i>Bryconaeiops</i> sp. <sup>1</sup>	-	-	-	-
<i>Hydrocynus brevis</i> <sup>1</sup>	AMNH2264 4	-	-	-
<i>Ladigesia roloffi</i> <sup>1</sup>	AMNH2333 94	-	-	-
<i>Micralestes</i> sp.	LBP 2342	15946	Aquário/Brasil	-
<i>Phenacogrammus interruptus</i>	LBP 2637	17293	Aquário/Brasil	-
<b>Anostomidae</b>				
<i>Anostomus ternetzi</i>	LBP 4375	24146	Igarapé Água Azul/Mucajá/RR/Brasil	N 02°18'02.0" W 60°55'20.7"
<i>Leporinus fasciatus</i>	LBP 4459	24381	Igarapé Zalala/Barcelos/AM/Brasil	S 00°40'03.1" W 62°58'23.5"
<i>Schizodon fasciatus</i>	LBP 3046	19130	Rio Orinoco/Caicara del Orinoco/Bolívar/Venezuela	N 07°38'11.6" W 66°19'04.2"
<i>Schizodon fasciatus</i>	LBP 3994	23098	Lago Morto/São Félix do Araguaia/MT/Brasil	S 11°40'9" W 50°51'0.30"
<b>Chilodontidae</b>				
<i>Chilodus punctatus</i>	LBP 4090	23527	Rio Japiim/Mâncio Lima/AC/Brasil	S 07°34'28.8" W 72°55'24.9"
<i>Caenotropus labyrinthicus</i>	LBP 1828	12912	Rio Araguaia/Aragarças/GO/Brasil	S 15°53'35.6" W 52°15'01.0"
<i>Caenotropus labyrinthicus</i>	LBP 9216	43161	Rio Apure/Orinoco/Cabruta/Guárico/Venezuela	N 7°37'24.4" W 66°24'48.0"
<b>Citharinidae</b>				
<i>Citharinus</i> sp.	LBP 7528	35374	Aquário	-
<b>Crenuchidae</b>				
<i>Characidium laterale</i>	LBP 7614	36938	Lagoa Margina rio Cuiabá/Barão de Melgaço/MT/Brasil	S 16°11'39.5" W 55°48'25.1"
<i>Characidium pterostictum</i>	LBP 2132	21388	Rio do Peixe/Pedro de Toledo/SP/Brasil	S 24°16'35.5" W 47°13'33.2"
<i>Crenuchus spilurus</i>	LBP 6907	33264	Igarapé Km 50 BR307/São Gabriel da Cachoeira/AM/Brasil	N 00°06.803' W 66°48.744'
<i>Melanocharacidium</i> sp. <sup>1</sup>	AMNH2333 21	-	-	-
<i>Poecilocharax weitzmani</i>	LBP 7078	40500	Afluente rio Miua/São Gabriel da Cachoeira/AM/Brasil	S 00°06.119' W 66°53.756'

Tabela 1. Continuação...

Ctenoluciidae				
<i>Boulengerella lateristriga</i>	LBP 7094	34623	Igarapé margem direita rio Negro/São Gabriel da Cachoeira/AM/Brasil	S 00°08.625' W 67°05.605'
<i>Boulengerella maculata</i>	LBP 3996	23092	Lago Morto/São Félix do Araguaia/MT/Brasil	S 11°40'9" W 50°51'0.30"
<i>Boulengerella maculata</i>	LBP 4241	22733	Rio Juruá/Cruzeiro do Sul/AC/Brasil	S 07°09'49.6" W 73°43'29.7"
<i>Ctenolucius hujeta</i>	LBP 6131	29532	Rio Apon/Machiques de Perijá/Zulia/Venezuela	N 10°09'42.0" W 72°25'58.0"
<i>Ctenolucius hujeta</i>	LBP 6131	29533	Rio Apon/Machiques de Perijá/Zulia/Venezuela	N 10°09'42.0" W 72°25'58.0"
Curimatidae				
<i>Curimatella dorsalis</i>	LBP3759	22034	Rio Negro/Aquidauana/MS/Brasil	S 19°34'33.7" W 56°14'49.5"
<i>Cyphocharax gouldingi</i>	LBP 1537	11889	Córrego Rola/Aragarças/GO/Brasil	S 15°53'53.4" W 52°13'00.6"
<i>Cyphocharax magdalenae</i>	LBP6109	29560	Rio Santa Rosa/Machiques de Perijá/Zulia/Venezuela	N 09°38'53.8" W 72°34'56.4"
<i>Potamorhina altamazonica</i>	LBP2571	17020	Lago do Silêncio/Boca do Acre/AM/Brasil	S 08°51'21.5" W 68°42'22.6"
<i>Steindachnerina insculpta</i>	LBP5185	26336	Rio Paraná/Porto Rico/PR/Brasil	S 22°47'29" W 53°20'58"
Cynodontidae				
<i>Cynodon gibbus</i>	LBP 1619	11672	Rio Allipén/Chile	S 39°00'08" W 72°26'56"
<i>Gilbertolus maracaiboensis</i>	LBP 6107	29552	Rio Santa Rosa/Machiques de Perijá/Zulia/Venezuela	N 09°38'53.8" W 72°34'56.4"
<i>Hydrolycus scomberoides</i>	LBP 3031	19115	Rio Orinoco/Caicara del Orinoco/Bolívar/Venezuela	N 07°38'11.6" W 66°19'04.2"
<i>Rhaphiodon vulpinus</i>	LBP 4064	22942	Rio Paraná/Ilha Solteira/SP/Brasil	S 20°05'07.3" W 50°58'59"
<i>Roestes ogilviei</i>	LBP 8157	38066	Lago do Reis/Caracará/RR/Brasil	S 02°00'22.2" W 61°02'02.9"
Distichodontidae				
<i>Distichodus</i> sp.	LBP 7526	35371	Aquário	-
<i>Distichodus</i> sp.	LBP 7526	35372	Aquário	-
<i>Hemigrammocharax multifasciatus</i> <sup>1</sup>	RUSI63497	-	-	-
<i>Ichthyoborus</i> sp. <sup>1</sup>	AMNH233626	-	-	-
<i>Neolebias trilineatus</i> <sup>1</sup>	AMNH233439	-	-	-
<i>Xenocharax spilurus</i> <sup>1</sup>	AMNH231548	-	-	-
Erythrinidae				
<i>Erythrinus erythrinus</i>	LBP 5212	26378	Rio Paraná/Porto Rico/PR/Brasil	S 22°47'29" W 53°20'58"
<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	LBP 8025	37723	Riacho sem nome/Nova Mutum/MT/Brasil	S 13°52'14.7" W 56°11'30.8"
<i>Hoplias malabaricus</i>	LBP 5539	27219	Brejo das Ovelhas/Santa Filomena/PI/Brasil	S 09°08'04" W 45°53'48"
<i>Hoplias aimara</i>	LBP 7837	36847	Lagoa da Boca Franca/Cocalinho/MT/Brasil	S 13°19' W 50°37'
<i>Hoplias microlepis</i>	LBP 2763	18503	Río Llano Sucio/Santa Rita Arriba/Colón/Panamá	N 09°19'26.2" W 79°46'08.2"
Gasteropelecidae				
<i>Carnegiella strigata</i>	LBP 4200	23798	Igarapé Puxirituba/Barcelos/AM/Brasil	S 00°53'18.6" W 62°40'36/1"
<i>Carnegiella marthae</i>	LBP 4199	23793	Igarapé Puxirituba/Barcelos/AM/Brasil	S 00°53'18.6" W 62°40'36/1"
<i>Gasteropelecus sternicla</i>	LBP 4070	22975	Rio Japiim/Mâncio Lima/AC/Brasil	S 07°34'28.8" W 72°55'24.9"
<i>Thoracocharax stellatus</i>	LBP 7534	35343	Rio Cuiabá/Cuiabá/MT/Brasil	S 15°39'09.9" W 56°04'08.6"
Hemiodontidae				
<i>Anodus orinocensis</i>	LBP 2210	15614	Laguna de Castilleros/Caicara del Orinoco/Bolívar/Venezuela	N 07°30'50.9" W 66°09'19.8"
<i>Argonectes robertsi</i>	LBP 1804	13167	Rio Araguaia/Barra do Garças/MT/Brasil	S 15°32' W 52°12'
<i>Bivibranchia velox</i>	LBP 5757	28123	Rio Araguaia/Aragarças/GO/Brasil	S 15°53'31.5" W 52°15'02.0"
<i>Hemiodus immaculatus</i>	LBP1725	12849	Rio Tarumã/Manaus/AM/Brasil	S 02°03'10.0" W 60°06'31.7"
Hepsetidae				
<i>Hepsetus odoe</i>	LBP 7527	35373	Aquário	-
Lebiasinidae				

Tabela 1. Continuação...

<i>Copella nattereri</i>	LBP 4377	24148	Riacho entorno da Reserva Viruá/Boa Vista/RR/Brasil	N 01°25'25.5" W 60°59'06.4"
<i>Copella nattereri</i>	LBP 536	7140	Igarapé do Leão/Manaus/AM/Brasil	S 02°53.108' W 60°02.034'
<i>Pyrrhulina australis</i>	LBP 3784	22333	Lagoa Marginal Rio Negro/Aquidauana/MS/Brasil	S 19°34'17.3' W 56°14'44.8"
<i>Pyrrhulina cf. zigzag</i>	LBP 8005	37473	Lagoa permanente/Nova Mutum/MT/Brasil	S 14°08'07.2" W 56°04'51.5"
Parodontidae				
<i>Apareiodon affinis</i>	LBP 4591	24665	Rio Paranapanema/Salto Grande/SP/Brasil	S 22°54'15.4" W 50°00'03.8"
<i>Parodon nasus</i>	LBP 1135	5635	Rio Capivara/Botucatu/SP/Brasil	S 22°52' W 48°23'
Prochilodontidae				
<i>Prochilodus reticulatus</i>	LBP 6127	29514	Rio Catatumbo/Catatumbo/Zulia/Venezuela	N 09°05'08.3' W 72°13'50.5"
<i>Semaprochilodus laticeps</i>	LBP 1383	12728	Caicara del Orinoco/Estado Bolivar/Venezuela	N 7°38'30" W 66°09'00"
Cypriniformes/Cyprinidae				
<i>Carassius auratus</i>	LBP 9215	43160	Aquário/Brasil	-
<i>Gyrinocheilus sp.</i> <sup>1</sup>	AMNH23343	-	-	-
	3			

1- Calcagnotto et al. (2005); 2- Javonillo et al. (2010).

## 3.2 Métodos

A sequência dos trabalhos práticos foi de extração, amplificação, sequenciamento e análise do DNA.

### 3.2.1 Extração de DNA

O DNA total foi obtido a partir de amostras de fígado, brânquias ou músculo, preservados em etanol 95%, utilizando-se de dois Kits: DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Cat. No. 69506), utilizado para a extração de DNA de alguns exemplares e o Kit AquaPure Genomic (Bio-Rad cat. 732-6340), utilizado para extrair os demais tecidos

#### 3.2.1.1 DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Cat. No. 69506)

- 1 - Cortar um pedaço do tecido de cerca de 10 a 25mg. Retirar completamente o álcool em um papel de filtro. Colocar o tecido em um tubo de 1,5ml com 180µl de *Buffer* ATL;
- 2 - Cortar o tecido em pequenos pedaços;
- 3 - Colocar 20µl de Proteinase K (10mg/ml). Transferir os tubos para um banho-maria a 56°C até digerir todo o material (1 a 3 horas);
- 4 - Adicionar 200µl de *Buffer* AL e 200µl de etanol 100%, passar no vórtex para misturar;
- 5 - Retirar todo o conteúdo do *ependorf* e colocar na coluna (tubo com filtro);
- 6 - Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm, descartar o tubo coletor;
- 7 - Adicionar 500µl *Buffer* AW1 e colocar em outro tubo coletor e centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm, descartar o tubo coletor;
- 8 - Adicionar 500µl *Buffer* AW2 e colocar em outro tubo coletor e centrifugar por 3 minutos a 14.000 rpm, descartar o tubo coletor;
- 9 - Colocar a coluna em um *ependorf* de 1,5ml e adicionar 200µl de *Buffer* AE para eluir;
- 10 - Incubar por 1 minuto e centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm;

Não é necessário esperar antes de usar o DNA.



### 3.2.1.2 AquaPure Genomic (Bio-Rad cat. 732-6340)

- 1 - Colocar 300µl de *DNA Lysis Solution* em tubos de *ependorf* de 1,5ml;
- 2 - Cortar um pedaço do tecido de cerca de 5 a 10mg. Retirar completamente o álcool em um papel de filtro. Colocar o tecido no tubo com *DNA Lysis Solution*;
- 3 - Incubar por 1 hora a 65°C. Agitar a cada 15 minutos;
- 4 - Colocar 3,0µl de Proteinase K (10mg/ml). Transferir os tubos para um banho-maria a 55°C. Agitar a cada 20 minutos. Deixar por 2 horas;
- 5 - Adicionar 100µl de *Protein Preciptation Solution*. Inverter bastante o tubo para misturar;
- 6 - Centrifugar por 3 minutos a 16.000 rpm;
- 7 - Retirar com uma pipeta 300µl do sobrenadante. Transferir para um *ependorf* novo;
- 8 - Adicionar 300µl de isopropanol (100%). Agitar invertendo delicadamente os tubos;
- 9 - Centrifugar por 1 minuto a 16.000 rpm;
- 10 - Retirar o líquido invertendo o tubo em um Becker. Secar com papel de filtro a abertura dos tubos;
- 11 - Adicionar 300µl de etanol 70%. Centrifugar por 1 minuto a 16.000 rpm;
- 12 - Retirar o líquido invertendo o tubo em um Becker. Secar com papel de filtro a abertura dos tubos. Secar bem o tubo;
- 13 - Adicionar de 50 a 100µl de *DNA Hydratation Solution*. Esperar pelo menos 1 hora antes de usar o DNA.

### 3.2.2 Amplificação dos fragmentos (genes mitocondriais e nucleares)

A amplificação dos fragmentos de DNA das espécies utilizadas neste trabalho foi realizada através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Foram obtidas sequências parciais dos genes mitocondriais 16S = gene ribossômico 16S, Cytb = citocromo B e ATPase 8/6 = ATPase subunit 8 (ATPase8) e ATPase subunit 6 (ATPase6) e dos genes nucleares Rag1 = recombination activating protein gene 1, Rag2 = recombination activating protein gene 2, Myh6 = cardiac muscle myosin heavy chain 6 alpha, Sreb2 = super conserved receptor expressed in brain 2 e Glyt = glycosyltransferase. As

amplificações dos genes mitocondriais e nucleares foram efetuadas em um ciclador térmico de PCR. Para a amplificação dos genes mitocondriais 16S e Cytb utilizou-se 12,5µl de uma solução contendo 4,25µl de água ultra pura e 6,25 µl de Go Taq Mix, 0,5µl (10µM) de cada primer (10µM) e 1,0µl de amostra de DNA. Para a amplificação dos genes nucleares Rag1, Rag2 e Myh6 utilizou-se 25µl de uma solução contendo 17,15µl de água ultra pura, 2,5µl de tampão, 0,75µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,4µl de dNTP, 0,2µl de Platinum Taq DNA polymerase, 1,0µl de cada primer (10µM) e 2,0µl de amostra de DNA, para os genes nucleares Sreb2 e Glyt utilizou-se o mesmo procedimento dos demais genes nucleares, exceto na quantidade de água, 18,15 µl e na quantidade de DNA, 1,0µl. Para cada um desses genes nucleares foram utilizados dois conjuntos de primers e, portanto, realizados dois PCRs. Para os genes mitocondriais ATPase 8/6, utilizou-se o mesmo procedimento dos genes nucleares Sreb2 e Glyt, exceto a realização de dois PCRs, pois, foi utilizado apenas um conjunto de primers.

Os primers utilizados e as condições de PCR para os genes 16S e Cytb estão listados na Tabela 2 e 3 respectivamente e os primers utilizados e as condições de PCR para os genes Rag1, Rag2, Myh6, Sreb2 e Glyt estão listados nas Tabelas 2 e 4 respectivamente. As condições de PCR para os genes mitocondriais ATPase 8/6 foram: 94° C – 4', 92° C – 30", 53° C – 30", 72° C – 90", 5x2, 92° C – 30", 56° C – 30", 72° C – 90", 30x6 e 72° C – 2'.

Tabela 2. Relação dos primers utilizados para amplificação de parte dos genes mitocondriais: 16S, Cytb e ATPase 8/6 e dos genes nucleares: Rag1, Rag2, Myh6, Sreb2 e Glyt.

Gene	Identificação dos primers	Sequência dos primers	Referência
16S	F	5'- ACG CCT GTT TAT CAA AAA CAT - 3'	Kocher et al. (1989)
16S	R	5'- CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T - 3'	Kocher et al. (1989)
Cytb	L14841	5'- AAA AAG CTT CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA - 3'	Kocher et al. (1989)
Cytb	H15915	5'- AAC TGC CAG TCA TCT CCG GTT TAC AAG AC - 3'	Kocher et al. (1989)
Cytb	NovoF	5'- GAC TTG AAA AAC CAY CGT TGT - 3'	Presente trabalho
Cytb	08R2	5'- GCT TTG GGA GTT AGD GGT GGG AGT TA - 3'	Presente trabalho
ATP8.2	L8331	5'- AAA GCR TYR GCC TTT TAA GC - 3'	Perdices et al. (2002)
CO3.2	H9236	5'- GTT AGT GGT CAK GGC TTG GRT C - 3'	Perdices et al.(2002)
Rag1 1stPCR	2510F	5'- TGG CCA TCC GGG TMA ACA C - 3'	Li e Orti (2007)
Rag1 1stPCR	4090R	5'- CTG AGT CCT TGT GAG CTT CCA TRA AYT T - 3'	Li e Orti (2007)
Rag1 2ndPCR	2535F	5'- AGC CAG TAC CAT AAG ATG TA - 3'	Li e Orti (2007)
Rag1 2ndPCR	4078R	5'- TGA GCC TCC ATG AAC TTC TGA AGR TAY TT - 3'	Li e Orti (2007)
Rag1 1stPCR	CF1	5'- ACC CTC CGT ACT GCT GAG AA - 3'	Presente trabalho
Rag1 1stPCR	CR1	5'- CGT CGG AAG AGC TTG TTG CC - 3'	Presente trabalho
Rag1 2ndPCR	CF2	5'- TAC CGC TGA GAA GGA GCT TC - 3'	Presente trabalho
Rag1 2ndPCR	CR2	5'- TGT TGC CAG ACT CAT TGC CCT - 3'	Presente trabalho
Rag2 1stPCR	164F	5'- AGC TCA AGC TGC GYG CCA T - 3'	Presente trabalho
Rag2 1stPCR	Rag2-R6	5'- TGRTCCARGCAGAAGTACTTG - 3'	Lovejoy e Collette (2001)

Rag2 2ndPCR	176F	5'- GYG CCA TCT CAT TCT CCA ACA - 3'	Presente trabalho
Rag2 2ndPCR	1387R2	5'- CCA TGC AYT GRG CRT GGA CC - 3'	Presente trabalho
Myh6 1stPCR	F329	5'- CCG CMT GGA TGA TCT ACA C - 3'	Li et al. (2007)
Myh6 1stPCR	A3R1	5'- ATT CTC ACC ACC ATC CAG TTG AA - 3'	Li et al. (2007)
Myh6 2ndPCR	A3F2	5'- GGA GAA TCA RTC KGT GCT CAT CA - 3'	Li et al. (2007)
Myh6 2ndPCR	A3R2	5'- CTC ACC ACC ATC CAG TTG AAC AT - 3'	Li et al. (2007)
Sreb2 1stPCR	Sreb2-F10	5'- ATG GCG AAC TAY AGC CAT GC - 3'	Li et al. (2007)
Sreb2 1stPCR	Sreb2-R1094	5'- CTG GAT TTT CTG CAG TAS AGG AG - 3'	Li et al. (2007)
Sreb2 2ndPCR	Serb2-F27	5'- TGC AGG GGA CCA CAM CAT - 3'	Li et al. (2007)
Sreb2 2ndPCR	Serb-R1082	5'- CAG TAS AGG AGC GTG GTG CT - 3'	Li et al. (2007)
Glyt 1stPCR	Glyt-F559	5'- GGA CTG TCM AAG ATG ACC ACM T - 3'	Li et al. (2007)
Glyt 1stPCR	Glyt-R1562	5'- CCC AAG AGG TTC TTG TTR AAG AT - 3'	Li et al. (2007)
Glyt 2ndPCR	Glyt-F577	5'- ACA TGG TAC CAG TAT GGC TTT GT - 3'	Li et al. (2007)
Glyt 2ndPCR	Glyt-R1464	5'- GTA AGG CAT ATA SGT GTT CTC TCC - 3'	Li et al. (2007)

Tabela 3. Condições da reação de PCR para os genes 16S e Cytb.

<b>Programa de rampa</b>
1 - 95° C – 2'
2 - 95° C – 30"
3 - 55° C – 45"
4 - 72° C – 45"
5 - Go to 2 (3 times)
6 - 95° C – 30"
7 - 50° C – 45"
8 - 72° C – 45"
9 - Go to 6 (3 times)
10 - 95° C – 30"
11 - 48° C – 45"
12 - 72° C – 45"
13 - Go to 10 (3 times)
14 - 95° C – 30"
15 - 50° C – 45"
16 - 72° C – 45"
17 - Go to 14 (30 times)
18 - 72° C – 5'
19 - 12° C - ∞

Tabela 4. Condições da reação de PCR para os genes Rag1, Rag2, Myh6, Sreb2 e Glyt.

<b>Rag1</b> (1 <sup>o</sup> e 2 <sup>o</sup> PCR)	<b>Rag2</b> (1 <sup>o</sup> e 2 <sup>o</sup> PCR)	<b>Myh6</b> (1 <sup>o</sup> e 2 <sup>o</sup> PCR)	<b>Sreb2</b> (1 <sup>o</sup> e 2 <sup>o</sup> PCR)	<b>Glyt</b> (1 <sup>o</sup> e 2 <sup>o</sup> PCR)
1 - 95° C – 1'	1 - 95° C – 1'	1 - 95° C – 1'	1 - 95° C – 1'	1 - 95° C – 1'
2 - 95° C – 45"	2 - 95° C – 45"	2 - 95° C – 45"	2 - 95° C – 45"	2 - 95° C – 45"
3 - 52° C – 1'/56° C – 1'	3 - 58° C – 1'	3 - 56° C – 1'	3 - 50° C – 1'/55° C – 1'	3 - 50° C – 1'/55° C – 1'/58° C – 1'
4 - 72° C – 1'	4 - 72° C – 1'	4 - 72° C – 1'	4 - 72° C – 1'	4 - 72° C – 1'
5 - Go to 2 (15 vezes)	5 - Go to 2 (15 vezes)	5 - Go to 2 (15 vezes)	5 - Go to 2 (15 vezes)	5 - Go to 2 (15 vezes)
6 - 95° C – 45"	6 - 95° C – 45"	6 - 95° C – 45"	6 - 95° C – 45"	6 - 95° C – 45"
7 - 51° C – 1'/54° C – 1'	7 - 56° C – 1'	7 - 54° C – 1'	7 - 48° C – 1'/53° C – 1'	7 - 48° C – 1'/53° C – 1'/56° C – 1'
8 - 72° C – 1'	8 - 72° C – 1'	8 - 72° C – 1'	8 - 72° C – 1'	8 - 72° C – 1'
9 - Go to 6 (15 vezes)	9 - Go to 6 (15 vezes)	9 - Go to 6 (15 vezes)	9 - Go to 6 (15 vezes)	9 - Go to 6 (15 vezes)
10 - 72° C – 5'	10 - 72° C – 5'	10 - 72° C – 5'	10 - 72° C – 5'	10 - 72° C – 5'
11 - 12° C - ∞	11 - 12° C - ∞	11 - 12° C - ∞	11 - 12° C - ∞	11 - 12° C - ∞

Os produtos foram aplicados em um gel de agarose 1%, utilizando-se o reagente Blue Green Loading Dye para coloração. Posteriormente esse produto foi visualizado diretamente em um transiluminador de luz azul, para verificação da qualidade e tamanho dos fragmentos amplificados.

### 3.2.3 Purificação do DNA

#### Limpeza com o kit ExoSAP-IT

Para cada 5µl do produto a ser purificado utilizou-se:

- 0,13 µl da enzima
- 1,87µl de água ultra pura

Programa utilizado no termociclador:

- 1 - 37°C por 1 hora;
- 2 - 80°C por 15 minutos.

### 3.2.4 Reação de amplificação para o sequenciamento

Para a reação de PCR foi utilizado o Kit “Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems). Segue protocolo:

- 1 - Aliquotar 1µl de água para cada amostra (futuro pré-mix) e manter no gelo;
- 2 - Colocar água nos tubos de sequenciamento:  
2,9µl para as reações em 1,4µl de DNA (quando a banda do PCR curto estiver bem forte) ou 1,5µl para as reações em 2,8µl de DNA (quando a banda do PCR curto estiver fraca);
- 3 - Colocar o DNA:  
1,4µl de DNA (quando a banda do PCR curto estiver bem forte)  
2,8µl de DNA (quando a banda do PCR curto estiver fraca);
- 4 - Colocar 0,7µl de primer (um para cada reação);
- 5 - Aliquotar 0,7µl de Big Dye para cada reação. Misturar o volume total com o volume total de água preparado no item 1. Aplicar 1,7µl para cada reação;
- 6 - Executar o programa de PCR de sequenciamento: 96 °C 2', 96 °C 30'', 55°C 15'', 60 °C 4', repetir 35 vezes, 12 °C temperatura final.

### **Limpeza dos fragmentos marcados**

- 1** - Adicionar 0,7 µl de EDTA (125 mM);
- 2** - Adicionar 0,7 µl de acetato de Sódio (3 M);
- 3** - Adicionar 17,5 µl de etanol 100%;
- 4** - Homogeneizar e passar na centrífuga brevemente;
- 5** - Incubar na gaveta por 15 minutos a temperatura ambiente;
- 6** - Centrifugar por 15 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente;
- 7** - Descartar o etanol em papel toalha;
- 8** - Adicionar 24,5 µl de etanol 70%;
- 9** - Centrifugar por 10 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente;
- 10** - Descartar o etanol em papel toalha;
- 11** - Repetir passos 8 a 10 (lavagem com etanol 70%);
- 12** - Secar em termociclador por 2 minutos a 96 °C sem tampa e com o termo aberto;
- 13** - Guardar em geladeira coberto com papel alumínio;
- 14** - Para aplicar adicionar 15µl de formamida. Colocar no vórtex rapidamente e centrifugar;
- 15** - Denaturar por 2 minutos a 96 °C (no termociclador). Retirar os tubos a 96°C e colocar imediatamente no gelo. O choque térmico é importante nesse passo.



### 3.2.5 Alinhamento das sequências e análise filogenética

Sequências individuais de cada espécie foram inicialmente analisadas com o software BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999), quando ocorreu incerteza da identidade de nucleotídeos foi aplicado o código IUPAC. Uma sequência consenso foi obtida para cada segmento de DNA de cada espécie, após esse procedimento, as sequências de cada gene foram alinhadas independentemente usando o programa Muscle (Edgar, 2004). A escolha do melhor modelo de distância genética foi realizada com o programa Modeltest 3.06 (Posada e Crandall, 1998), de acordo com o parâmetro padrão Akaike information criterion (AIC), implementado no programa PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2003), para cada gene separadamente.

A variação e o padrão de substituição de nucleotídeos e a distância genética foram examinadas utilizando-se o programa MEGA 4.1 Tamura et al. (2007).

Para verificar se o número de transições e de transversões atingiu o nível de saturação, foi construído um gráfico onde o eixo X representa os valores das distâncias de cada par de táxons usados e o eixo Y o número de transição (TS) ou de transversão (TV) presentes em cada par. Tal análise foi estimada pelo modelo Tamura-Nei93 com o auxílio do programa DAMBE versão 4.0.65 (Xia e Xie, 2001), para cada gene separadamente e em conjunto.

Os alinhamentos de cada gene foram analisados, inicialmente, pelo método de máxima verossimilhança (ML) (Stamatakis, 2006), utilizando-se de um servidor da web (RaxML BlackBox - Stamatakis et al., 2008), com o intuito de verificar se haveria espécies cujas sequências obtidas as colocassem fora de seus grupos esperados. Nos casos em que a sequência de DNA de uma determinada espécie as colocava fora de seu grupo esperado, com confiança de mais de 50% nos testes de *bootstrap*, esta posição alternativa foi checada com a análise de outros genes. Havendo congruência entre os dados observados em todos os genes a sequência foi mantida. Nos casos de falta de congruência procedeu-se novos sequenciamentos e os passos iniciais foram todos repetidos. Ao final, não sendo possível encontrar sequências congruentes as sequências não compatíveis foram removidas. Após essa verificação, foi realizada uma análise conjunta de todos os genes com o

método de máxima verossimilhança (ML) (Stamatakis, 2006), utilizando-se também do servidor da web (RaxML BlackBox - Stamatakis et al., 2008).

As análises filogenéticas baseadas em máxima parcimônia (MP) foram realizadas com o programa PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2003). Buscas heurísticas foram realizadas com no mínimo de 100 réplicas com 100 táxons adicionados aleatoriamente, com o algoritmo TBR. Todos os caracteres foram igualmente pesados e os ramos com comprimento zero foram colapsados. Os gaps foram tratados como dados perdidos ao invés de um quinto caráter, de modo a evitar presunções relativas à natureza e localização dos eventos de inserções e deleções. As filogenias obtidas foram testadas utilizando o método de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) usando-se 1000 pseudoréplicas.

As análises bayesianas foram realizadas com o programa MrBayes 3 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003), implantado no site [http://www.phylo.org/Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research \(CIPRES\)](http://www.phylo.org/Cyberinfrastructure%20for%20Phylogenetic%20Research). As análises foram realizadas em dois ciclos independentes, cada um com 18.000.000 gerações de quatro cadeias simultâneas e com amostragens a cada 1000 gerações. O ponto de corte foi determinado pelo tempo de convergência (em número de gerações) dos valores de probabilidade. O suporte dos clados foi estimado pelo cálculo das probabilidades posteriores de cada nó entre as árvores amostradas após a estabilização dos valores de probabilidade.

Ao final das análises, as filogenias finais foram elaboradas com o método de consenso por maioria (com corte em nível de 50%). A discussão foi feita comparando todas as filogenias obtidas.

# RESULTADOS

#### 4. RESULTADOS

Foram sequenciados segmentos dos genes mitocondriais 16S = gene ribossômico 16S, Cyt b = citocromo B e ATPase 8/6 = ATPase sub-unidade 8 (ATPase8) e ATPase sub-unidade 6 (ATPase6) e dos genes nucleares Rag1 = recombination activating protein gene 1, Rag2 = recombination activating protein gene 2, MYH6 = cardiac muscle myosin heavy chain 6 alpha, SREB2 = super conserved receptor expressed in brain 2 e GLYT = glycosyltransferase. Foram obtidas sequências de 213 espécimes, sendo 211 Characiformes e dois Cypriniformes, dentre esses, dados de 12 espécies foram retirados do trabalho de Calcagnotto et al. (2005) e dados de duas espécies foram retirados do trabalho de Javonillo et al. (2010) (tabela 5).

A descrição dos resultados é baseada na árvore de Máxima Verossimilhança (ML) (Figura 19), que foi subdivida para melhor explicação e os nós que foram comentados e discutidos também apresentam os valores das análises de Máxima parcimônia (MP) e Bayesiana (B), respectivamente. São apresentadas as árvores de Máxima parcimônia (MP) (Figura 20) e Bayesiana (B) (Figura 21). As árvores completas das análises de ML, MP e B estão apresentadas nos anexos 9, 10 e 11, respectivamente.

Tabela 5. Amostras analisadas no presente estudo.

Grupo/espécies	Lote	Animal	16S	Cytb	ATPase8/6	Rag1	Rag2	Myh6	Sreb2	Glyt
Characidae/Agoniatinae										
<i>Agoniates anchovia</i>	LBP 6740	33471	ok	ok	ok	x	ok	x	ok	x
<i>Agoniates halecinus</i>	LBP 5503	26594	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
Characidae/Aphyocharacinae										
<i>Aphyocharax alburnus</i>	LBP 1587	11774	ok	ok	x	ok	x	ok	ok	x
<i>Aphyocharax anisitsi</i>	LBP 3764	22190	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Aphyocharax pusillus</i>	LBP 4046	22920	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	x
Characidae/Bryconinae										
<i>Brycon amazonicus</i>	LBP 2187	15565	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Brycon insignis</i>	LBP 2369	16075	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Henochilus wheatlandii</i>	LBP 1221	25846	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
Characidae/Characinae										
<i>Acestrocephalus sardina</i>	LBP 6876	33172	ok	ok	ok	ok	ok	x	ok	ok
<i>Charax leticiae</i>	LBP 1480	12700	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Cynopotamus kincaidi</i>	LBP 3225	19449	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Cynopotamus venezuelae</i>	LBP 6132	29515	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Galeocharax knerii</i>	LBP 3496	20164	ok	ok	x	x	ok	ok	x	x
<i>Gnathocharax steindachneri</i>	LBP 4496	24494	ok	x	ok	x	ok	ok	ok	x
<i>Heterocharax macrolepis</i>	LBP 4494	24485	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Hoplocharax goethei</i>	LBP 4495	24489	ok	ok	x	ok	x	x	ok	ok
<i>Phenacogaster calverti</i>	LBP 5582	27299	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Roeboides guatemalensis</i>	LBP 2755	18529	ok	x	x	x	ok	x	x	x

## Resultados

Characidae/Cheirodontinae										
<i>Acinocheirodon melanogramma</i>	LBP 8104	37551	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Aphyocheirodon hemigrammus</i>	LBP 8306	40025	ok	ok	ok	ok	x	ok	ok	ok
<i>Cheirodon australe</i>	LBP 3115	19803	ok	ok	ok	x	ok	x	ok	x
<i>Cheirodon ibicuihensis</i>	LBP 4777	25598	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	x
<i>Compsura heterura</i>	LBP 4733	24984	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Heterocheirodon yatai</i>	LBP 4872	24954	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Kolpotocheirodon theloura</i>	LBP 5033	25982	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Macropsobrycon uruguayanae</i>	LBP 6039	29061	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	x
<i>Nanocheirodon insignis</i>	LBP 6104	27476	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Odontostilbe</i> sp.	LBP 4650	22626	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	x
<i>Odontostilbe fugitiva</i>	LBP 4052	22932	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x	x
<i>Prodontocharax melanotus</i>	STRI	10	ok	x	x	ok	ok	ok	x	x
<i>Pseudocheirodon arnoldi</i>	STRI	5	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	x
<i>Saccoderma melanostigma</i>	LBP 6103	27475	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Serrapinnus calliurus</i>	LBP 3731	22121	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	x
<i>Serrapinnus piaba</i>	LBP 8972	41813	ok	ok	x	ok	ok	ok	x	x
<i>Spintherobolus ankoseion</i>	LBP 4725	24957	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Spintherobolus broccae</i>	LBP 3916	22558	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Spintherobolus leptoura</i>	LBP 7544	36098	ok	ok	x	ok	ok	ok	x	x
Gen. e sp. novos	LBP 5699	27603	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
Characidae/Clupeacharacinae										
<i>Clupeacharax anchoveoides</i>	LBP 5046	26012	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
Characidae/Glandulocaudinae										
<i>Glandulocauda melanogenys</i>	LBP 4507	24538	ok	ok	x	x	ok	ok	x	x
<i>Lophiobrycon weitzmani</i>	LBP 1225	38090	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Mimagoniates inequalis</i>	LBP 3383	21274	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 1225	11077	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
Characidae/Iguanodectinae										
<i>Iguanodectes geisleri</i>	LBP 4266	23840	ok	ok	x	x	ok	x	ok	x
<i>Piabucus melanostomus</i>	LBP 5109	26150	ok	ok	ok	x	x	ok	ok	x
Characidae/Rhoadsiinae										
<i>Carlana eigenmanni</i>	LBP 3300	19864	ok	ok	x	ok	x	ok	x	x
<i>Carlana eigenmanni</i>	LBP 3301	19865	ok	ok	x	ok	x	ok	ok	x
Characidae/Serrasalminae										
<i>Catoprin mento</i>	LBP 7556	35624	ok	ok	x	ok	x	ok	ok	ok
<i>Colossoma macropomum</i>	LBP 5173	26648	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Metynniss mola</i>	LBP 667	8050	ok	ok	ok	x	ok	x	ok	ok
<i>Metynniss lippincottianus</i>	LBP 6282	29688	ok	ok	x	x	ok	ok	ok	ok
<i>Myloplus rubripinnis</i>	LBP 2184	15570	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Mylossoma duriventre</i>	LBP 1823	12921	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	LBP 4255	23803	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Pygocentrus cariba</i>	LBP 2229	15662	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Serrasalmus maculatus</i>	LBP 3698	21836	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Serrasalmus spilopleura</i>	LBP 3499	20169	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Tometes trilobatus</i>	LBP 9072	42585	ok	x	ok	x	ok	ok	ok	ok
Characidae/Stethaprioninae										
<i>Brachychalcinus copei</i>	LBP 192	8853	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Orthospinus franciscensis</i>	LBP 8105	37555	ok	x	x	ok	ok	ok	ok	x
<i>Poptella paraguayensis</i>	LBP 3732	21986	ok	ok	ok	ok	x	ok	ok	ok
<i>Stethaprion crenatum</i>	LBP 4078	22994	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x	x
Characidae/Stevardiinae										
<i>Corynopoma riisei</i> <sup>?</sup>			ok	x	x	x	ok	x	x	x
<i>Gephyrocharax atracaudatus</i>	LBP 2753	18519	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Planaltina britskii</i>	LBP 2598	17243	ok	ok	ok	ok	x	ok	ok	ok
<i>Pseudocorynopoma heterandria</i>	LBP 2862	18570	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Tytocharax madeirae</i>	LBP 5145	33166	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Xenrobrycon pteropus</i>	LBP 9054	42218	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
Characidae/Tetragonopterinae										
<i>Tetragonopterus argenteus</i>	LBP 3758	22029	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Tetragonopterus chalceus</i>	LBP 8268	37556	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
Characidae incertae sedis										

## Resultados

<i>Aphyocharacidium bolivianum</i>	LBP 9055	42219	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Aphyodite grammica</i>	LBP 9050	42214	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Astyanacinus moorii</i>	LBP 5783	28195	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Astyanax aeneus</i>	LBP 8938	42019	ok	x	x	ok	ok	ok	ok	x
<i>Astyanax jordani</i>	LBP 4527	24599	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Astyanax mexicanus</i>	LBP 8937	42016	ok	x	x	ok	ok	ok	ok	x
<i>Bario steindachneri</i>	LBP 4389	24187	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Bramocharax baileyi</i>	LBP 8940	42025	ok	x	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Bramocharax caballeri</i>	LBP 8939	42022	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Bryconadenos tanaothoros<sup>c</sup></i>	MCP 40399		ok	x	x	x	ok	x	x	x
<i>Bryconamericus emperador</i>	LBP 2754	18528	ok	ok	x	ok	ok	ok	x	ok
<i>Bryconamericus exodon</i>	LBP 7123	34200	ok	ok	x	ok	ok	ok	x	x
<i>Bryconella pallidifrons</i>	LBP 4646	24696	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Bryconops affinis</i>	LBP 262	4168	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x	ok
<i>Ceratobranchia cf. delotaenia</i>	LBP 3257	20042	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Chalceus epakros</i>	LBP 5443	26504	ok	ok	x	x	ok	x	ok	x
<i>Chalceus erythrurus</i>	LBP 4211	22727	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Coptobrycon bilineatus</i>	LBP 3809	33169	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	x
<i>Creagrutus peruanus</i>	LBP 3267	20057	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Ctenobrycon hauxwellianus</i>	LBP 4095	23538	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Cyanocharax alburnus</i>	LBP 4746	25516	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Deuterodon iguape</i>	LBP 6827	33065	ok	x	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Engraulisoma taeniatum</i>	LBP 4038	22896	ok	x	x	x	x	ok	x	x
<i>Engraulisoma taeniatum</i>	LBP 4038	22897	ok	x	x	x	x	ok	x	x
<i>Exodon paradoxus</i>	LBP 4006	23040	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Gymnocorymbus ternetzi</i>	LBP 3737	21989	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Hasemania sp.</i>	LBP5967	28455	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
Gen. e sp. novos	LBP 7243	33196	ok	ok	ok	x	ok	x	ok	x
<i>Hemibrycon taeniurus</i>	LBP 6847	33168	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Hemigrammus marginatus</i>	LBP 6292	29419	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Hemigrammus ulreyi</i>	LBP 7604	36267	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Hollandichthys multifasciatus</i>	LBP 698	8791	ok	x	ok	ok	ok	ok	x	ok
<i>Hyphessobrycon eques</i>	LBP 7615	36278	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	x
<i>Hyphessobrycon megalopterus</i>	LBP 7613	36932	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Hyphessobrycon reticulatus</i>	LBP 1049	8939	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Hypobrycon maromba</i>	LBP 6750	33174	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Inpaichthys kerri</i>	LBP 4526	24597	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Jupiaba anteroides</i>	LBP 7067	34380	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	x
<i>Jupiaba acanthogaster</i>	LBP 7935	37269	ok	ok	x	ok	x	ok	x	x
<i>Knodus meridae</i>	LBP 7569	15818	ok	ok	x	ok	ok	ok	x	x
<i>Leptagoniates steindachneri</i>	LBP 4137	23661	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Lignobrycon myersi</i>	LBP 8094	37519	ok	ok	ok	ok	x	ok	ok	x
<i>Markiana nigripinnis</i>	LBP 663	8038	ok	x	x	ok	ok	ok	ok	x
<i>Microschemobrycon casiquiare</i>	LBP 8161	38058	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Moenkhausia xinguensis</i>	LBP 6101	28443	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Myxiops aphos</i>	LBP 7184	33173	ok	ok	ok	ok	x	ok	ok	x
<i>Nematobrycon palmeri</i>	LBP 6124	33165	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Nematocharax venustus</i>	LBP 8106	37557	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Odontostoechus lethostigmus</i>	LBP 6752	33171	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Oligosarcus paranensis</i>	LBP 3926	22582	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Oligosarcus hepsetus</i>	LBP 2377	16055	ok	ok	x	x	ok	x	x	x
<i>Paracheirodon axelrodi</i>	LBP 4472	24425	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Paragoniates alburnus</i>	LBP 9208	43156	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Parecbasis cyclolepis</i>	LBP 9053	42217	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Phenagoniates macrolepis</i>	LBP 6105	35623	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Piabarchus analis</i>	LBP 8514	38382	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Piabina argentea</i>	LBP 3509	21306	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x	x
<i>Prionobrama paraguayensis</i>	LBP 3230	19465	ok	x	x	x	ok	ok	ok	x
<i>Prionobrama paraguayensis</i>	LBP 3230	19468	ok	x	x	ok	ok	ok	ok	x
<i>Pristella maxillaris</i>	LBP 2221	15637	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Probolodus heterostomus</i>	LBP 6454	29141	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Psellogrammus kennedyi</i>	LBP 6578	31813	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	x
<i>Rachoviscus crassiceps</i>	LBP 7146	33170	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Roeboexodon guyanensis</i>	LBP 5315	26921	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Salminus brasiliensis</i>	LBP 850	9025	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Salminus franciscanus</i>	LBP 8090	37503	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Stygichthys typhlops</i>	LBP 8107	37558	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	x
<i>Thayeria obliqua</i>	LBP 5743	26891	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Triportheus nematurus</i>	LBP 39	3503	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Triportheus orinocensis</i>	LBP 2663	15580	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Xenagoniates bondi</i>	LBP 3074	19694	ok	ok	x	x	ok	ok	ok	x

## Resultados

Acestrorhynchidae										
<i>Acestrorhynchus falcatus</i>	LBP 4191	23707	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Acestrorhynchus lacustris</i>	LBP 2158	15173	ok	ok	ok	ok	x	ok	ok	x
<i>Acestrorhynchus cf. nasutus</i>	LBP 7035	34110	ok	ok	ok	ok	x	ok	ok	x
<i>Acestrorhynchus pantaneiro</i>	LBP 3755	22014	ok	ok	x	ok	x	ok	ok	x
Alestidae										
<i>Alestes</i> sp.	LBP 7530	35376	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Alestopetersius caudalis</i> <sup>1</sup>			ok	ok	x	x	ok	x	x	x
<i>Bathyaethiops breuseghemi</i> <sup>1</sup>	AMNH233422		ok	ok	x	x	ok	x	x	x
<i>Brycinus carolinae</i> <sup>1</sup>	AMNH233628		ok	ok	x	x	ok	x	x	x
<i>Brycinus longipinnis</i>	LBP 7529	35375	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Bryconaethiops</i> sp. <sup>1</sup>			ok	ok	x	x	ok	x	x	x
<i>Hydrocynus brevis</i> <sup>1</sup>	AMNH22644		ok	ok	x	x	ok	x	x	x
<i>Ladigesia roloffi</i> <sup>1</sup>	AMNH233394		ok	ok	x	x	ok	x	x	x
<i>Micralestes</i> sp.	LBP 2342	15946	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Phenacogrammus interruptus</i>	LBP 2637	17293	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
Anostomidae										
<i>Anostomus ternetzi</i>	LBP 4375	24146	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Leporinus fasciatus</i>	LBP 4459	24381	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x	ok
<i>Schizodon fasciatus</i>	LBP 3046	19130	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Schizodon fasciatus</i>	LBP 3994	23098	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
Chilodontidae										
<i>Chilodus punctatus</i>	LBP 4090	23527	ok	ok	x	x	x	x	ok	ok
<i>Caenotropus labyrinthicus</i>	LBP 1828	12912	ok	ok	ok	x	ok	x	ok	ok
<i>Caenotropus labyrinthicus</i>	LBP 9216	43161	ok	x	ok	ok	x	ok	ok	ok
Citharinidae										
<i>Citharinus</i> sp.	LBP 7528	35374	ok	ok	ok	x	ok	x	ok	ok
Crenuchidae										
<i>Characidium laterale</i>	LBP 7614	36938	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Characidium pterostictum</i>	LBP 2132	21388	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Crenuchus spilurus</i>	LBP 6907	33264	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Melanocharacidium</i> sp. <sup>1</sup>	AMNH233321		ok	ok	x	x	ok	x	x	x
<i>Poecilocharax weitzmani</i>	LBP 7078	40500	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
Ctenoluciidae										
<i>Boulengerella lateristriga</i>	LBP 7094	34623	ok	ok	ok	x	x	x	ok	ok
<i>Boulengerella maculata</i>	LBP 3996	23092	ok	ok	x	x	x	x	x	x
<i>Boulengerella maculata</i>	LBP 4241	22733	ok	ok	ok	x	x	x	ok	x
<i>Ctenolucius hujeta</i>	LBP 6131	29532	ok	x	ok	x	x	x	ok	ok
<i>Ctenolucius hujeta</i>	LBP 6131	29533	ok	x	ok	x	x	x	ok	ok
Curimatidae										
<i>Curimatella dorsalis</i>	LBP3759	22034	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Cyphocharax gouldingi</i>	LBP 1537	11889	ok	x	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Cyphocharax magdalenae</i>	LBP6109	29560	ok	ok	ok	ok	x	ok	ok	ok
<i>Potamorhina altamazonica</i>	LBP2571	17020	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Steindachnerina insculpta</i>	LBP5185	26336	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
Cynodontidae										
<i>Cynodon gibbus</i>	LBP 1619	11672	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	x
<i>Gilbertulus maracaiboensis</i>	LBP 6107	29552	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Hydrolycus scomberoides</i>	LBP 3031	19115	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Rhaphiodon vulpinus</i>	LBP 4064	22942	ok	ok	ok	ok	x	ok	ok	x
<i>Roestes ogilviei</i>	LBP 8157	38066	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
Distichodontidae										
<i>Distichodus</i> sp.	LBP 7526	35371	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Distichodus</i> sp.	LBP 7526	35372	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Hemigrammocharax multifasciatus</i> <sup>1</sup>	RUSI63497		ok	ok	x	x	ok	x	x	x
<i>Ichthyborus</i> sp. <sup>1</sup>	AMNH233626		ok	ok	x	x	ok	x	x	x
<i>Neolebias trilineatus</i> <sup>1</sup>	AMNH233439		ok	ok	x	x	ok	x	x	x
<i>Xenocharax spilurus</i> <sup>1</sup>	AMNH231548		ok	ok	x	x	x	x	x	x
Erythrinidae										
<i>Erythrinus erythrinus</i>	LBP 5212	26378	ok	ok	ok	ok	x	ok	ok	ok
<i>Hoplerethrinus unitaeniatus</i>	LBP 8025	37723	ok	x	x	ok	x	ok	ok	ok

## Resultados

<i>Hoplias malabaricus</i>	LBP 5539	27219	ok	ok	ok	ok	x	ok	ok	ok
<i>Hoplias aimara</i>	LBP 7837	36847	ok	ok	x	ok	x	ok	x	x
<i>Hoplias microlepis</i>	LBP 2763	18503	ok	ok	ok	x	x	ok	ok	ok
Gasteropelecidae										
<i>Carnegiella strigata</i>	LBP 4200	23798	ok	ok	x	ok	x	x	x	x
<i>Carnegiella marthae</i>	LBP 4199	23793	ok	ok	ok	ok	x	ok	ok	x
<i>Gasteropelecus sternicla</i>	LBP 4070	22975	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok	x
<i>Thoracocharax stellatus</i>	LBP 7534	35343	ok	ok	ok	ok	x	ok	ok	x
Hemiodontidae										
<i>Anodus orinocensis</i>	LBP 2210	15614	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Argonectes robertsi</i>	LBP 1804	13167	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Bivibranchia velox</i>	LBP 5757	28123	ok	ok	ok	x	ok	x	ok	ok
<i>Hemiodus immaculatus</i>	LBP1725	12849	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
Hepsetidae										
<i>Hepsetus odoe</i>	LBP 7527	35373	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x
Lebiasinidae										
<i>Copella nattereri</i>	LBP 4377	24148	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x	x
<i>Copella nattereri</i>	LBP 536	7140	ok	ok	ok	ok	x	ok	x	ok
<i>Pyrrhulina australis</i>	LBP 3784	22333	ok	x	x	ok	ok	x	x	x
<i>Pyrrhulina cf. zigzag</i>	LBP 8005	37473	ok	ok	ok	ok	x	ok	x	ok
Parodontidae										
<i>Apareiodon affinis</i>	LBP 4591	24665	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Parodon nasus</i>	LBP 1135	5635	ok	ok	ok	ok	ok	ok	x	ok
Prochilodontidae										
<i>Prochilodus reticulatus</i>	LBP 6127	29514	ok	ok	x	ok	ok	ok	ok	ok
<i>Semaprochilodus laticeps</i>	LBP 1383	12728	ok	ok	x	ok	ok	ok	x	ok
Cypriniformes/Cyprinidae										
<i>Carassius auratus</i>	LBP 9215	43160	ok	ok	ok	x	x	ok	ok	ok
<i>Gyrinocheilus sp.</i> <sup>1</sup>	AMNH233433		ok	ok	x	x	ok	x	x	x

1- Calcagnotto et al. (2005); 2- Javonillo et al. (2010).



## 4.1 Gene 16S

Foram obtidas sequências do gene mitocondrial 16S de 213 exemplares, sendo 70 pertencentes às subfamílias de Characidae, 71 *incertae sedis* em Characidae e 72 pertencentes ao grupo externo.

Após o procedimento de alinhamento e correção manual desse alinhamento, obteve-se uma matriz com 633 caracteres dos quais 268 foram conservados, 357 foram variáveis e 298 foram filogeneticamente informativos para as análises. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 1,7.

A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 31,4% de adenina (A), 23,6% de citosina (C), 22,3% de guanina (G) e 22,7% de timina (T).

Análises com o programa Modeltest mostraram que o modelo de distância genética que melhor explica a variação observada nas sequências de 16S foi o de GTR+I+G (general time-reversible model) (Lanave et al., 1984; Rodriguez et al., 1990) que trabalha com frequências de bases diferentes e 6 tipos de substituição, segundo o teste Akaike information criterion (AIC) (Akaike, 1973). Esse modelo, ou o mais similar possível, foi utilizado nas análises probabilísticas com esse gene.

A distância média entre as sequências foi de  $d = 0,138 \pm 0,009$ , segundo o modelo de distância Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993).

Uma análise gráfica da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo de distância Tamura-Nei indica que não há saturação nas transições e transversões (Figura 10). A árvore final de máxima verossimilhança (ML) para o gene 16S está apresentada no Anexo 1.

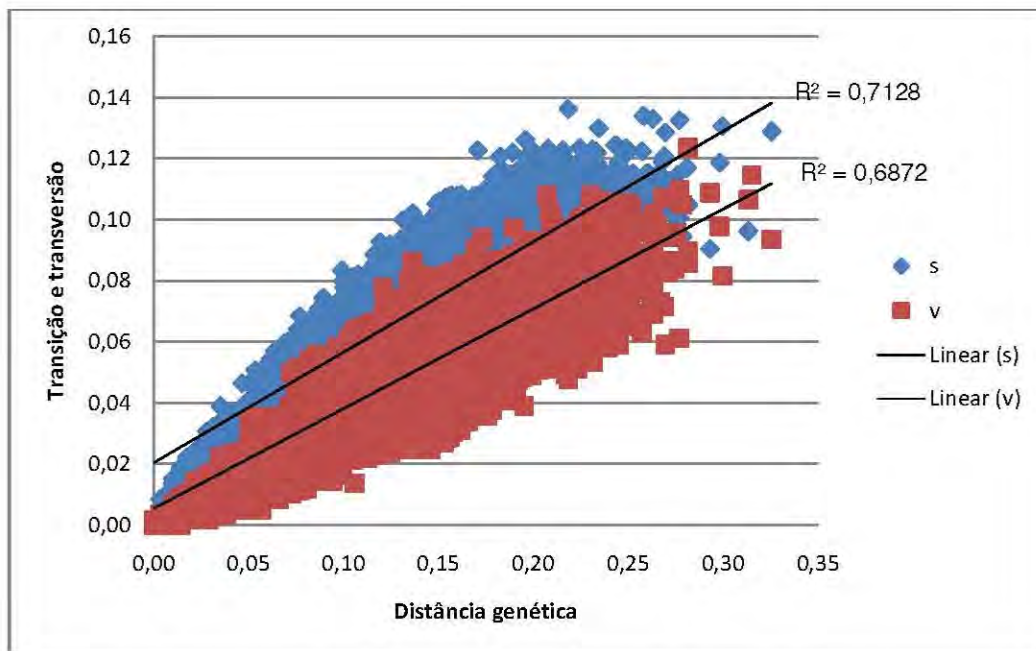


Figura 10. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de distância Tamura-Nei, e a frequência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para o gene 16S.

## 4.2 Gene Cytb

Foram obtidas sequências do gene mitocondrial Cytb de 187 exemplares, sendo 63 pertencentes às subfamílias de Characidae, 59 *incertae sedis* em Characidae e 65 pertencentes ao grupo externo.

Após o procedimento de alinhamento e correção manual desse alinhamento, obteve-se uma matriz com 992 caracteres dos quais 356 foram conservados, 636 foram variáveis e 556 foram filogeneticamente informativos para as análises. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 0,6.

A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 26,4% de adenina (A), 29,2% de citosina (C), 14,5% de guanina (G) e 29,8% de timina (T).

Análises com o programa Modeltest mostraram que o modelo de distância genética que melhor explica a variação observada nas sequências de Cytb foi o de GTR+I+G (general time-reversible model) (Lanave et al., 1984; Rodriguez et al., 1990) que trabalha com frequências de bases diferentes e 6 tipos de substituição, segundo o teste Akaike information criterion (AIC) (Akaike, 1973). Esse modelo, ou o mais similar possível, foi utilizado nas análises probabilísticas com esse gene.

A distância média entre as sequências foi de  $d = 0,251 \pm 0,011$ , segundo o modelo de distância Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993).

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

A árvore final de máxima verossimilhança (ML) para o gene CytB está apresentada no Anexo 2.

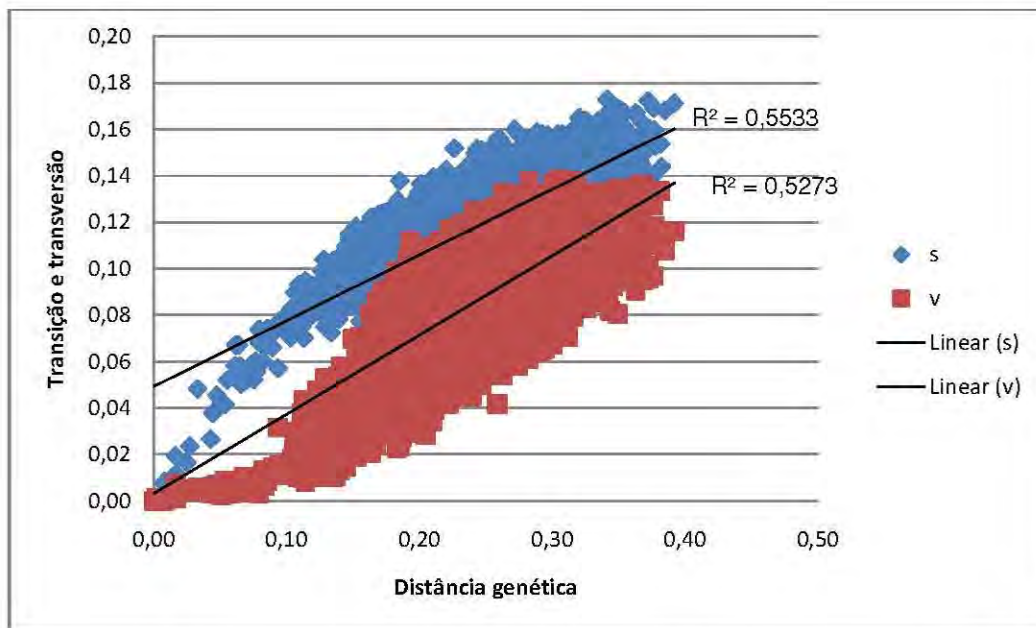


Figura 11. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de distância Tamura-Nei, e a frequência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para o gene Cytb.

### 4.3 ATPase 8/6

Foram obtidas sequências do gene mitocondrial ATPase 8/6 de 125 exemplares, sendo 42 pertencentes às subfamílias de Characidae, 44 *incertae sedis* em Characidae e 39 pertencentes ao grupo externo.

Após o procedimento de alinhamento e correção manual desse alinhamento, obteve-se uma matriz com 775 caracteres dos quais 219 foram conservados, 556 foram variáveis e 501 foram filogeneticamente informativos para as análises. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 0,7.

A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 28,3% de adenina (A), 28,7% de citosina (C), 12,6% de guanina (G) e 30,5% de timina (T).

Análises com o programa Modeltest mostraram que o modelo de distância genética que melhor explica a variação observada nas sequências de ATPase 8/6 foi o de GTR+I+G (general time-reversible model) (Lanave et al., 1984; Rodriquez et al., 1990) que trabalha com frequências de bases diferentes e 6 tipos de substituição, segundo o teste Akaike information criterion (AIC) (Akaike, 1973). Esse modelo, ou o mais similar possível, foi utilizado nas análises probabilísticas com esse gene.

A distância média entre as sequências foi de  $d = 0,332 \pm 0,014$ , segundo o modelo de distância Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993).

Uma análise gráfica da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo de distância Tamura-Nei indica que não há saturação nas transições e transversões (Figura 12).

A árvore final de máxima verossimilhança (ML) para o gene ATPase 8/6 está apresentada no Anexo 3.

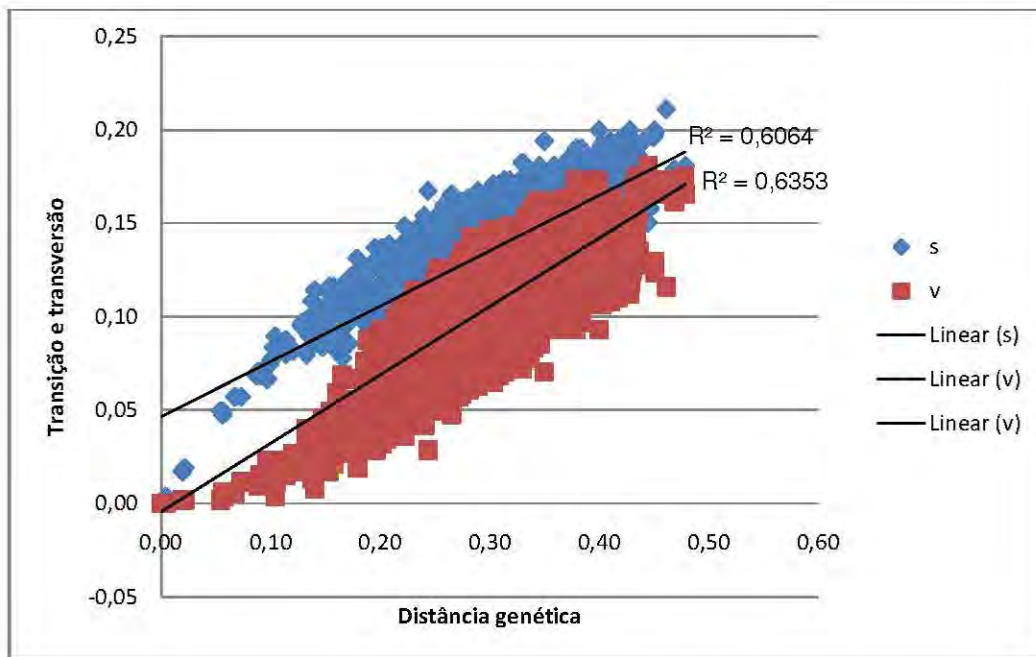


Figura 12. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de distância Tamura-Nei, e a frequência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para o gene ATPase 8/6.

#### 4.4 Gene Rag1

Foram obtidas sequências do gene nuclear Rag1 de 170 exemplares, sendo 58 pertencentes às subfamílias de Characidae, 63 *incertae sedis* em Characidae e 49 pertencentes ao grupo externo.

Após o procedimento de alinhamento e correção manual desse alinhamento, obteve-se uma matriz com 1266 caracteres dos quais 430 foram conservados, 835 foram variáveis e 645 foram filogeneticamente informativos para as análises. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 1,5.

A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 25,2% de adenina (A), 23,9% de citosina (C), 28,2% de guanina (G) e 22,7% de timina (T).

Análises com o programa Modeltest mostraram que o modelo de distância genética que melhor explica a variação observada nas sequências de Rag1 foi o de TVM+I+G (Transversion model, que trabalha com frequências de bases diferentes e 6 tipos de substituição, segundo o teste Akaike information criterion (AIC) (Akaike, 1973). Esse modelo, ou o mais similar possível, foi utilizado nas análises probabilísticas com esse gene.

A distância média entre as sequências foi de  $d = 0,123 \pm 0,006$ , segundo o modelo de distância Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993).

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

A árvore final de máxima verossimilhança (ML) para o gene Rag 1 está apresentada no Anexo 4.

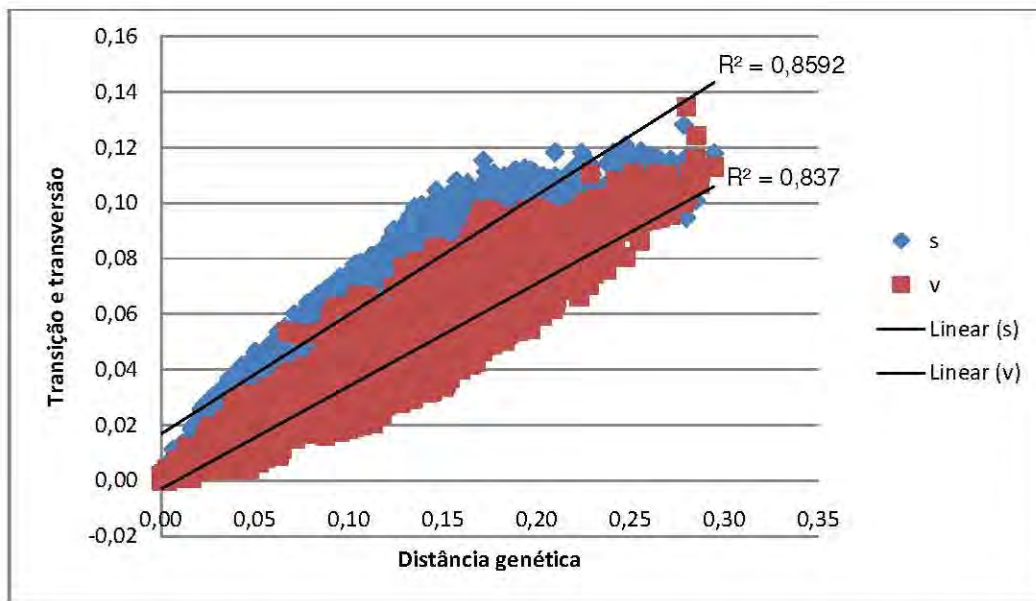


Figura 13. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de distância Tamura-Nei, e a frequência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para o gene Rag1.



## 4.5 Gene Rag2

Foram obtidas sequências do gene nuclear Rag2 de 175 exemplares, sendo 61 pertencentes às subfamílias de Characidae, 66 *incertae sedis* em Characidae e 48 pertencentes ao grupo externo.

Após o procedimento de alinhamento e correção manual desse alinhamento, obteve-se uma matriz com 1037 caracteres dos quais 354 foram conservados, 680 foram variáveis e 574 foram filogeneticamente informativos para as análises. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 1,4.

A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 24,5% de adenina (A), 25,1% de citosina (C), 27,3% de guanina (G) e 23,2% de timina (T).

Análises com o programa Modeltest mostraram que o modelo de distância genética que melhor explica a variação observada nas sequências de Rag2 foi o de TVM+I+G (transversion model, que trabalha com frequências de bases diferentes e 6 tipos de substituição, segundo o teste Akaike information criterion (AIC) (Akaike, 1973). Esse modelo, ou o mais similar possível, foi utilizado nas análises probabilísticas com esse gene.

A distância média entre as sequências foi de  $d = 0,128 \pm 0,006$ , segundo o modelo de distância Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993).

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

A árvore final de máxima verossimilhança (ML) para o gene Rag 2 está apresentada no Anexo 5.

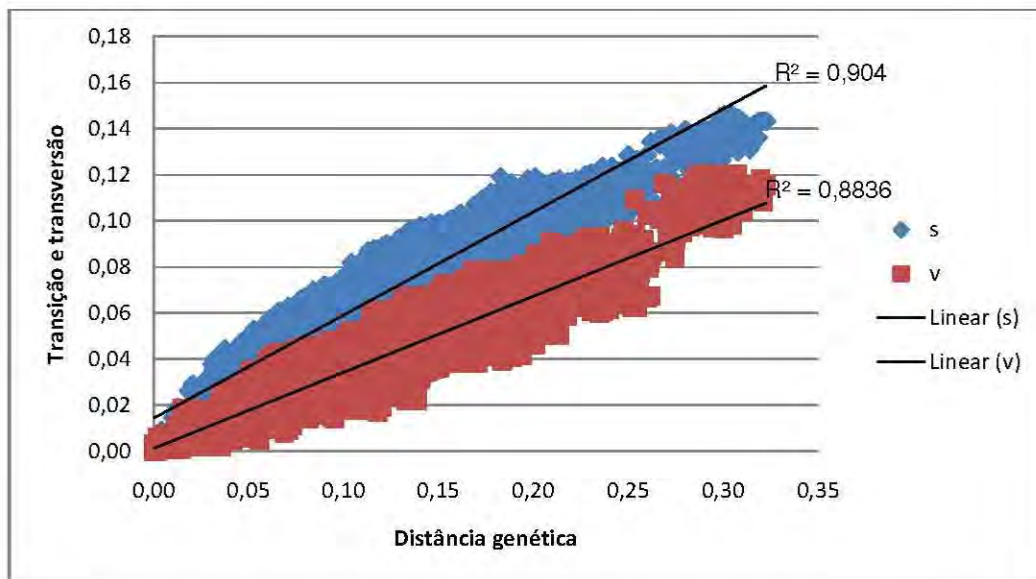


Figura 14. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de distância Tamura-Nei, e a frequência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para o gene Rag2.

## 4.6 Gene Myh6

Foram obtidas sequências do gene nuclear Myh6 de 178 exemplares, sendo 62 pertencentes às subfamílias de Characidae, 67 *incertae sedis* em Characidae e 49 pertencentes ao grupo externo.

Após o procedimento de alinhamento e correção manual desse alinhamento, obteve-se uma matriz com 755 caracteres dos quais 378 foram conservados, 377 foram variáveis e 314 foram filogeneticamente informativos para as análises. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 1,6.

A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 30,7% de adenina (A), 21,2% de citosina (C), 23,3% de guanina (G) e 24,7% de timina (T).

Análises com o programa Modeltest mostraram que o modelo de distância genética que melhor explica a variação observada nas sequências de Myh6 foi o de TrN+I+G (Tamura-Nei – Tamura e Nei, 1993), que trabalha com frequências de bases diferentes e 6 tipos de substituição, segundo o teste Akaike information criterion (AIC) (Akaike, 1973). Esse modelo, ou o mais similar possível, foi utilizado nas análises probabilísticas com esse gene.

A distância média entre as sequências foi de  $d = 0,095 \pm 0,006$ , segundo o modelo de distância Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993).

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

A árvore final de máxima verossimilhança (ML) para o gene Myh6 está apresentada no Anexo 6.

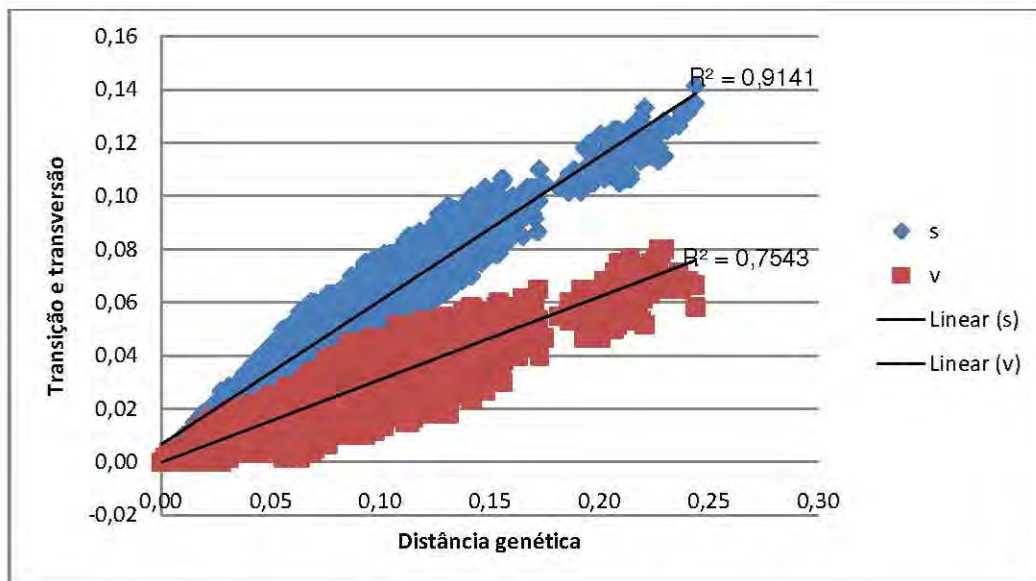


Figura 15. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de distância Tamura-Nei, e a frequência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para o gene Myh6.

## 4.7 Gene Sreb2

Foram obtidas sequências do gene nuclear Sreb2 de 170 exemplares, sendo 60 pertencentes às subfamílias de Characidae, 60 *incertae sedis* em Characidae e 50 pertencentes ao grupo externo.

Após o procedimento de alinhamento e correção manual desse alinhamento, obteve-se uma matriz com 928 caracteres dos quais 609 foram conservados, 319 foram variáveis e 275 foram filogeneticamente informativos para as análises. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 1,8.

A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 16,1% de adenina (A), 32,4% de citosina (C), 27,6% de guanina (G) e 23,8% de timina (T).

Análises com o programa Modeltest mostraram que o modelo de distância genética que melhor explica a variação observada nas sequências de Sreb2 foi o de GTR+I+G (general time-reversible model) (Lanave et al., 1984; Rodriguez et al., 1990) que trabalha com frequências de bases diferentes e 6 tipos de substituição, segundo o teste Akaike information criterion (AIC) (Akaike, 1973). Esse modelo, ou o mais similar possível, foi utilizado nas análises probabilísticas com esse gene.

A distância média entre as sequências foi de  $d = 0,050 \pm 0,004$ , segundo o modelo de distância Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993).

Uma análise gráfica da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo de distância Tamura-Nei indica que não há saturação nas transições e transversões (Figura 16).

A árvore final de máxima verossimilhança (ML) para o gene Sreb2 está apresentada no Anexo 7.

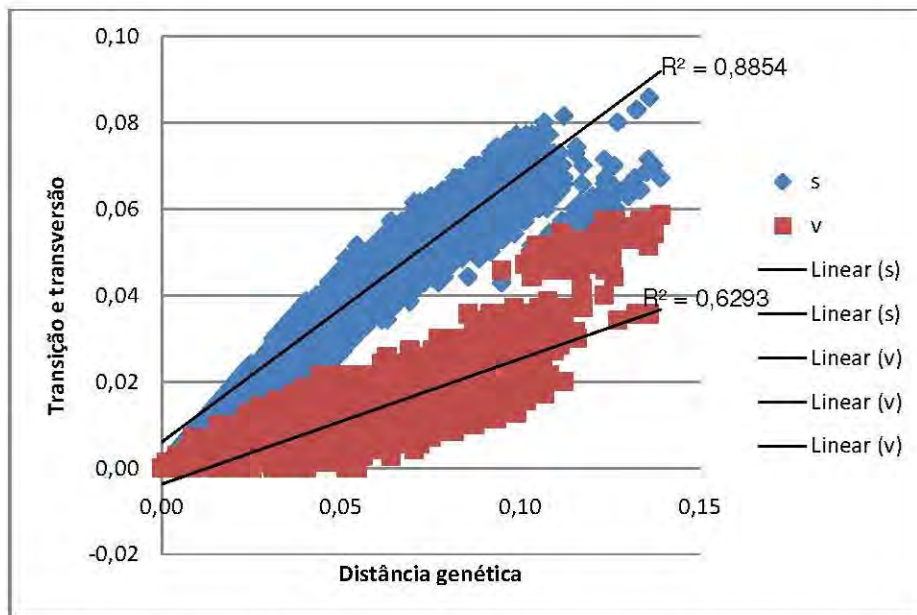


Figura 16. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de distância Tamura-Nei, e a frequência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para o gene Sreb2.

## 4.8 Gene Glyt

Foram obtidas sequências do gene nuclear Glyt de 113 exemplares, sendo 35 pertencentes às subfamílias de Characidae, 36 *incertae sedis* em Characidae e 42 pertencentes ao grupo externo.

Após o procedimento de alinhamento e correção manual desse alinhamento, obteve-se uma matriz com 770 caracteres dos quais 342 foram conservados, 428 foram variáveis e 356 foram filogeneticamente informativos para as análises. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 2,0.

A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 26,9% de adenina (A), 24,0% de citosina (C), 25,6% de guanina (G) e 23,5% de timina (T).

Análises com o programa Modeltest mostraram que o modelo de distância genética que melhor explica a variação observada nas sequências de Glyt foi o de SYM Symmetrical model (Zharkikh, 1994) +Invariants +Gamma. Esse modelo, ou o mais similar possível, foi utilizado nas análises probabilísticas com esse gene.

A distância média entre as sequências foi de  $d = 0,134 \pm 0,008$ , segundo o modelo de distância Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993).

Uma análise gráfica da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo de distância Tamura-Nei indica que não há saturação nas transições e transversões (Figura 17).

A árvore final de máxima verossimilhança (ML) para o gene Glyt está apresentada no Anexo 8.

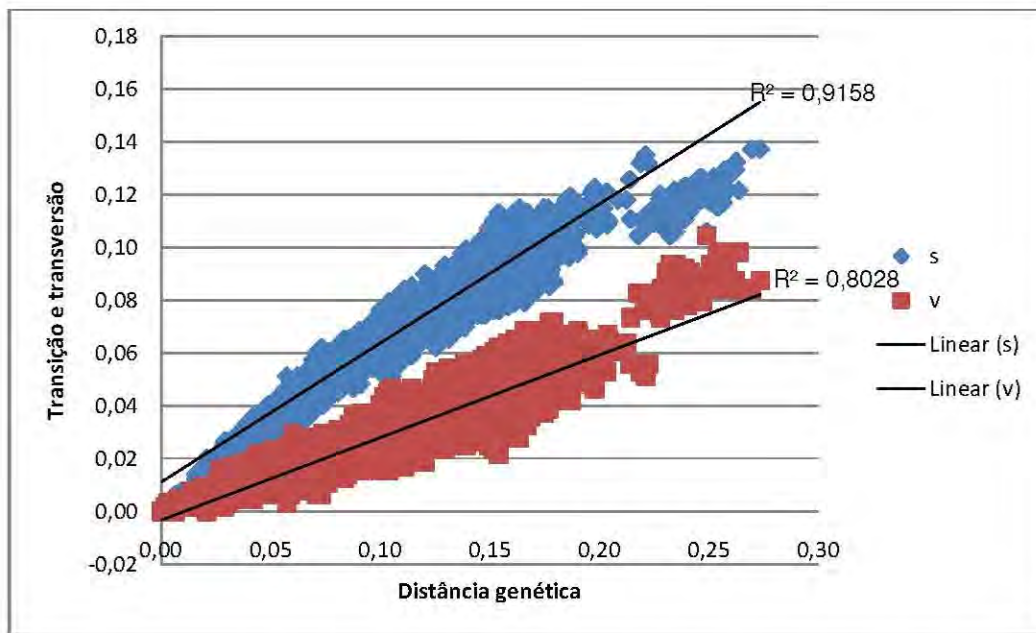


Figura 17. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de distância Tamura-Nei, e a frequência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para o gene Glyt.



#### **4.9 Análise conjunta dos genes 16S, Cytb, ATPase 8/6, Myh6, Rag1, Rag2, Sreb2 e Glyt**

Após o procedimento de alinhamento dos genes 16S, Cytb, ATPase 8/6, Rag1, Rag2, Myh6, Sreb2 e Glyt e a correção manual desse alinhamento, obteve-se uma matriz com 7140 caracteres dos quais 2952 foram conservados, 4187 foram variáveis e 3518 foram filogeneticamente informativos para as análises.

A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 1,1. A composição média, em porcentagem, de bases foi de 25,7% de adenina (A), 26,1% de citosina (C), 23,3% de guanina (G) e 24,9% de timina (T). A distância média entre as sequências foi de  $d = 0,149 \pm 0,003$ , segundo o modelo de distância Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993).

Uma análise gráfica da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo de distância Tamura-Nei indica que não há saturação nas transições e transversões (Figura 18).

A árvore final de máxima verossimilhança (ML) para todos os genes está apresentada na Figura 19.

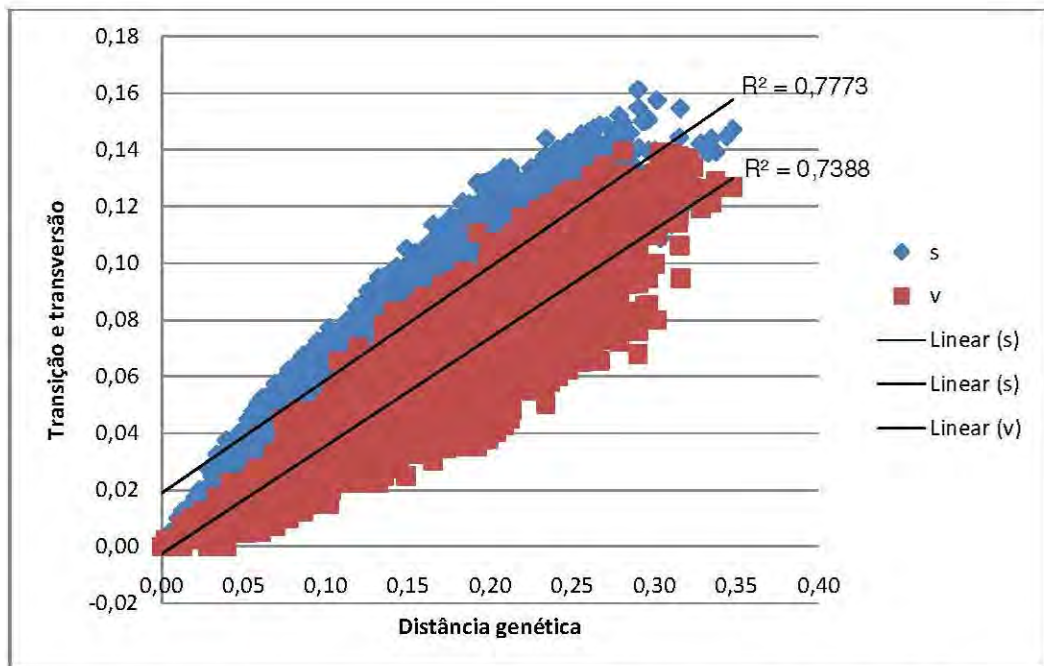


Figura 18. Gráfico mostrando a relação entre a distância genética, calculada com o modelo de distância Tamura-Nei, e a frequência de transições (losângulos) e transversões (quadrados) para os genes 16S, Cytb, ATPase 8/6, Myh6, Rag1, Rag2, Sreb2 e Glyt.

A topologia da árvore geral observada em todas as análises foi muito semelhante, embora a sustentação estatística não tenha sido elevada em alguns nós.

Ocorre uma diferença importante entre as análises de ML, MP e B, na análise de MP, duas linhagens principais foram observadas entre os Characiformes, uma constituída pelas famílias Africanas Citharinidae, Distichodontidae, Alestidae e Hepsetidae juntamente com as famílias neotropicais Crenuchidae, Lebiasinidae e Ctenoluciidae e outra linhagem que consiste nos demais grupos de Characiformes (Figura 20), com baixo suporte estatístico. Na análise de ML e B não foram observados esses dois grupos (Figuras 19 e 21).

Outras diferenças observadas nas análises de ML (Figura 19), MP (Figura 20) e B (Figura 21) foram nas posições de algumas amostras, como a posição de *Citharinus* sp. que nas análises de ML e B aparece como grupo irmão de *Distichodus* sp. (ML=90, B=100) e na análise de MP *Citharinus* sp. aparece como grupo irmão de *Xenocharax spilurus*, aqui com baixo suporte. *Hoplias microleps* aparece como grupo irmão de *Hoplias aimara* nas análises de ML e B (ML=70, B=97) e na análise de MP *Hoplias microleps* aparece como grupo irmão de *Hoplias malabaricus* (MP=95). *Curimata* sp. aparece como grupo irmão de *Cyphocharax magdalenae* nas análises de ML e B (ML=98, B=100) e na análise de MP *Curimata* sp. aparece como grupo irmão de *Steindachnerina insculpta* (MP=50). *Bryconaethiops* sp. não fica resolvido na análise de ML, formando uma politomia e nas análises de MP e B, *Bryconaethiops* sp. aparece como grupo irmão de *Alestes* sp. e *Brycinus carolinae* (MP=54, B=92). *Bathyaethiops breuseghemi* aparece como grupo irmão de *Alestopetersius caudalis* nas análises de ML e B (ML=50, B=73) e na análise de MP *Bathyaethiops breuseghemi* aparece como grupo irmão das espécies *Micralestes* sp. e *Phenacogrammus interruptus* (MP=58). *Poptella paraguayensis* aparece como grupo irmão de *Stethaprion crenatum*, na análise de MP, com baixo suporte, na análise de ML essas duas espécies formam uma politomia com as espécies *Orthospinus franciscensis* e *Brachyhalcinus copei* (ML=100) e na análise B, *Poptella paraguayensis* aparece como grupo irmão das espécies *Stethaprion crenatum* e *Brachyhalcinus copei* (B=99). *Planaltina britskii* aparece como grupo irmão de *Hemibrycon taeniurus* na análise de MP,

com baixo suporte e nas análises de ML e B *Planaltina britskii* aparece como grupo irmão de várias outras espécies de *incertae sedis* (ML=67, B=100). *Aphyocharax anisitsi* aparece como grupo irmão de *Aphyocharax pusillus* nas análises de ML e B (ML=57, B=99) e na análise de MP *Aphyocharax anisitsi* aparece como grupo irmão de *Aphyocharax alburnus* com baixo suporte. *Galeocharax knerii* aparece como grupo irmão de *Cynopotamus venezuelae* nas análises de ML e B (ML=74, B=97) e na análise de MP *Galeocharax knerii* aparece como grupo irmão de *Acestrocephalus sardina* com baixo suporte. *Gnathocharax steindachneri* aparece como grupo irmão de *Heterocharax macrolepis* nas análises de ML e B (ML=62, B=97) e na análise de MP *Gnathocharax steindachneri* aparece como grupo irmão de *Hoplocharax goethei* com baixo suporte.

*Microchemobrycon casiquiare* aparece como grupo irmão de *Phenacogaster calvertina* na análise de ML (ML=57), e nas análises de MP e B *Microchemobrycon casiquiare* aparece como grupo irmão das espécies da subfamília Characinae que compõem o clado B2 (MP=58, B=100). *Probolodus heterostomus* aparece como grupo irmão de *Deuterodon iguape* nas análises de ML e MP (ML=99, MP=100) e na análise B *Probolodus heterostomus* aparece como grupo irmão de *Myxiops aphos* (B=100). *Astyanacinus moorii* não fica resolvido na análise de ML, formando uma politomia, na análise de MP *Astyanacinus moorii* aparece como grupo irmão de várias outras espécies de *incertae sedis*, com baixo suporte e na análise B *Astyanacinus moorii* aparece como grupo irmão das espécies *Bario steindachneri* e *Thayeria obliqua* (B=73). *Parecbasis cyclolepis* aparece como grupo irmão das espécies *Inpaichthys kerri*, *Hollandichthys multifasciatus* e *Rachoviscus crassiceps* nas análises de ML (ML=53) e MP, com baixo suporte e na análise B *Parecbasis cyclolepis* aparece como grupo irmão das espécies *Deuterodon iguape* e *Stygichthys typhlops* (B=73). *Aphyodite grammica* aparece como grupo irmão de *Hemigrammus ulreyi* na análise de ML (ML=52) e nas análises de MP e B *Aphyodite grammica* aparece como grupo irmão das espécies *Hemigrammus ulreyi*, *Pristella maxillaris* e *Bryconella pallidifrons*, MP com baixo suporte e (B=100). *Lignobrycon myersi* aparece como grupo irmão das subfamílias Agoniatinae, Clupeocharacinae e Triportheinae e da espécie *Engraulisoma taeniatum* nas análises de ML e B (ML=100, B=100) e na análise de MP

*Lignobrycon myersi* aparece como grupo irmão da subfamília Triportheinae (MP=80). Na análise Bayesiana *Gyrinocheilus* sp. não ficou no lugar esperado, junto com a outra espécie de Cypriniformes *Carassius auratus*.

Characiformes (clado 1) aparecem como um grupo monofilético bem suportado (Figura 19, ML=100, MP=97, B=93). Dentro de Characiformes encontramos o clado 2 (Figura 22, ML=72, MP=68, B=96) composto pelas famílias africanas Distichodontidae e Citharinidae, que aparecem como grupo irmão de todos os outros Characiformes. Embora a monofilia do clado formado por essas duas famílias tenha sido proposto anteriormente, a presente análise difere das hipóteses anteriores, não corroborando com o monofiletismo de Distichodontidae. *Citharinus* apareceu como o grupo irmão de *Distichodus* mas não dos demais membros da família Distichodontidae.

O clado 3 (Figura 19, ML=96, MP=51, B=96) é composto pela família Crenuchidae (clado 4, Figura 23), sendo grupo irmão de todos os demais componentes de Characiformes (clado 5, Figura 19, ML=81, B=69). O monofiletismo de Crenuchidae foi fortemente apoiado (Figura 23, ML= 100, MP=100, B=100) e os dados mostram uma clara separação de *Crenuchus* e *Poecilocharax*, subfamília Crenuchinae (ML= 100, MP=100, B=100) de *Characidium* e *Melanocharacidium*, subfamília Characidiinae (ML=100, MP=100, B=100). *Characidium*, entretanto, não aparece como monofilético (Figura 23).

Dentro do clado 5, está incluído o clado 6 (Figura 19) composto pelos cladros 8 e 9 (Figura 19). O clado 8 é constituído pelas famílias Alestidae (Figura 19, clado 10, ML= 100, MP=100, B=100) e Hepsetidae (Figura 19, clado 11, um único espécime analisado). O clado 9 (Figura 24, ML=65, B=100) é constituído por várias famílias de Characiformes, entre elas, Parodontidae, Hemiodontidae, Anostomidae, Chilodontidae, Curimatidae e Prochilodontidae e por duas subfamílias, Cynodontinae (família Cynodontidae) e Serrasalminae (família Characidae). Dentro deste clado, Erythrinidae (Figura 24, clado 12, ML= 100, MP=100, B=100) é o grupo irmão de todos os demais membros deste clado e tem *Hoplias* (ML= 100, MP=100, B=100) como grupo irmão de *Erythrinus* mais *Hoplerythrinus* (Figura 24, ML= 100, MP=99, B=100).

Parodontidae (Figura 24, clado 14, ML=100, MP=100, B=100), é grupo irmão de todos os demais táxons do clado 15 (Figura 24). O clado 16 (Figura

25, ML=100, MP=100, B=100) é composto pela subfamília Cynodontinae, representada por todos os seus três gêneros reconhecidos, este resultado vai contra a monofilia de Cynodontidae, conforme definido na literatura recente, pois, os representantes da subfamília Roestinae (Figura 25, clado 41), considerada um componente de Cynodontidae, não forma um grupo com Cynodontinae.

O clado 18 é composto pela subfamília Serrasalminae (Figura 24, ML=100, MP=100, B=100). Dentro do clado 19 (Figura 24, ML=54, B=82), o clado 20 é formado pela família Hemiodontidae (Figura 24, ML=100, MP=100, B=100) e o clado 21 (Figura 24, ML=100, MP=97, B=100) é formado pelas famílias Anostomidae (Figura 24, clado 22, ML=100, MP=100, B=100) que é grupo irmão das demais famílias do clado: Chilodontidae (Figura 24, clado 24, ML=100, MP=99, B=100), Curimatidae (Figura 24, clado 26, ML=100, MP=100, B=100) e Prochilodontidae (Figura 24, clado 27, ML=100, MP=100, B=100).

O clado 7 (Figura 19, ML=59, B=100), é formado pelo clado 28 (Figuras 19 e 26, ML=100, MP=69, B=100) que é formado pelas famílias Lebiasinidae (Figura 26, clado 30, ML=100, MP=100, B=100) e Ctenoluciidae (Figura 26, clado 31, ML=100, MP=100, B=100). O segundo clado que forma o clado 7 é o clado 29 (Figura 26), este é formado pelo clado 32 composto por *Chalceus* (Figura 26, ML=100, MP=100, B=100) que é grupo irmão dos demais táxons desse clado. Dentro do clado 29 temos ainda o clado 33 (Figura 26, ML=97, MP=96, B=53), que é formado pelo clado 34 (Figura 26, ML=96, MP=100, B=100), composto pela família Acestorhynchidae (Figura 26, clado 38, ML=100, MP=100, B=100), que é grupo irmão de três gêneros da subfamília Characinae (Figura 26, clado 40, ML=99, MP=98, B=100) e pela subfamília Roestinae (Figura 26, clado 41, ML=100, MP=100, B=100) e o clado 37 (Figura 26, ML=100, MP=90, B=100) formado pela subfamília Iguanodectinae (Figura 26, clado 42, ML=99, MP=92, B=100) e pela espécie *Bryconops affinis* (Figura 26, clado 43).

O segundo componente do clado 33 (Figura 19) é o clado 35, formado pelos cladogramas 44 (Figuras 19 e 27, ML=88, B=100) e 45 (Figura 19, ML=100, MP=95, B=100). O clado 44 é formado pelos cladogramas 46 (Figura 19, ML=100, MP=66, B=100) e 47 (Figura 19, ML=78, B=97). O clado 46 é formado pelos cladogramas 48 (ML=63, B=100) e 49, que é formado pela espécie *Lignobrycon*

*myersi* (Figura 19), que é grupo irmão das subfamílias Triportheinae (Figura 27, clado 50, ML=100, MP=100, B=100), Agoniatinae (Figura 27, clado 54, ML=100, MP=100, B=100) e Clupeacharacinae (Figura 27, clado 55) e da espécie *Engraulisoma taeniatum* (Figura 27, clado 53, ML=100, MP=100, B=100).

O clado 47 (Figura 27) é formado pelos cladogramas 56 (Figura 27), composto pela família Gasteropelecidae (Figura 27, ML=100, MP=100, B=100) e pelo clado 57 (Figura 27, ML=100, MP=100, B=100) composto pela subfamília Bryconinae (Figura 27, clado 58, ML=100, MP=100, B=100) e pelo gênero *Salminus* (Figura 27, clado 59, ML=100, MP=100, B=100).

O clado 45 (Figura 19, ML=100, MP=95, B=100) é formado pelo clado 60 (Figura 28, ML=100, MP=100, B=100) composto pelo gênero *Spintherobolus*, que é grupo irmão dos chamados cladogramas A, B e C (Figura 28, clado 61, ML=67, B=100). O clado 61 é formado pelos cladogramas 62 (Figura 28, ML=100, MP=88, B=100) e 63 (Figura 28, ML=100, MP=100, B=100). O clado 62 é formado pelos cladogramas 64 composto por uma das partes do clado B, chamado aqui de clado B2 (Figura 29, ML=100, MP=100, B=100), dentro desse clado estão incluídos espécies de Characinae, que não forma um grupo monofilético, pois, temos três espécies de Characinae no clado 40 (Figura 26), a subfamília Tetragonopterinae, que aparece como grupo irmão de Characinae, dentro desse clado e algumas espécies de *incertae sedis*, como no caso de *Microschemobrycon casiquiare*, que aparece junto com *Phenacogaster calverti* (ML=57), corroborando o não monofilétismo de Characinae. No clado 65, composto pela outra parte do clado B, chamado aqui de clado B1 (Figura 29, clado 66, ML=99, MP=76, B=100), estão incluídos a subfamília Cheirodontinae que aparece como grupo irmão de Aphyocharacinae e de várias outras espécies de *incertae sedis* reconhecidas em Characidae. Cheirodontinae não forma um grupo monofilético, pois, o gênero *Spintherobolus*, considerado Cheirodontinae, pertence ao clado 60 (Figura 28). Outro componente do clado 65 é o clado A (Figura 30, clado 67, ML=100, MP=100, B=100) constituído das subfamílias Glandulocaudinae e Stervadiinae, que não forma um grupo monofilético, e por várias espécies de *incertae sedis* reconhecidas em Characidae.

O clado 63 (Figura 31, ML=100, MP=100, B=100) é composto pelo chamado clado C, que inclui as subfamílias Stethaprioninae e Rhoadsiinae e a maioria das espécies de *incertae sedis* reconhecidas em Characidae, estudadas nesse trabalho.



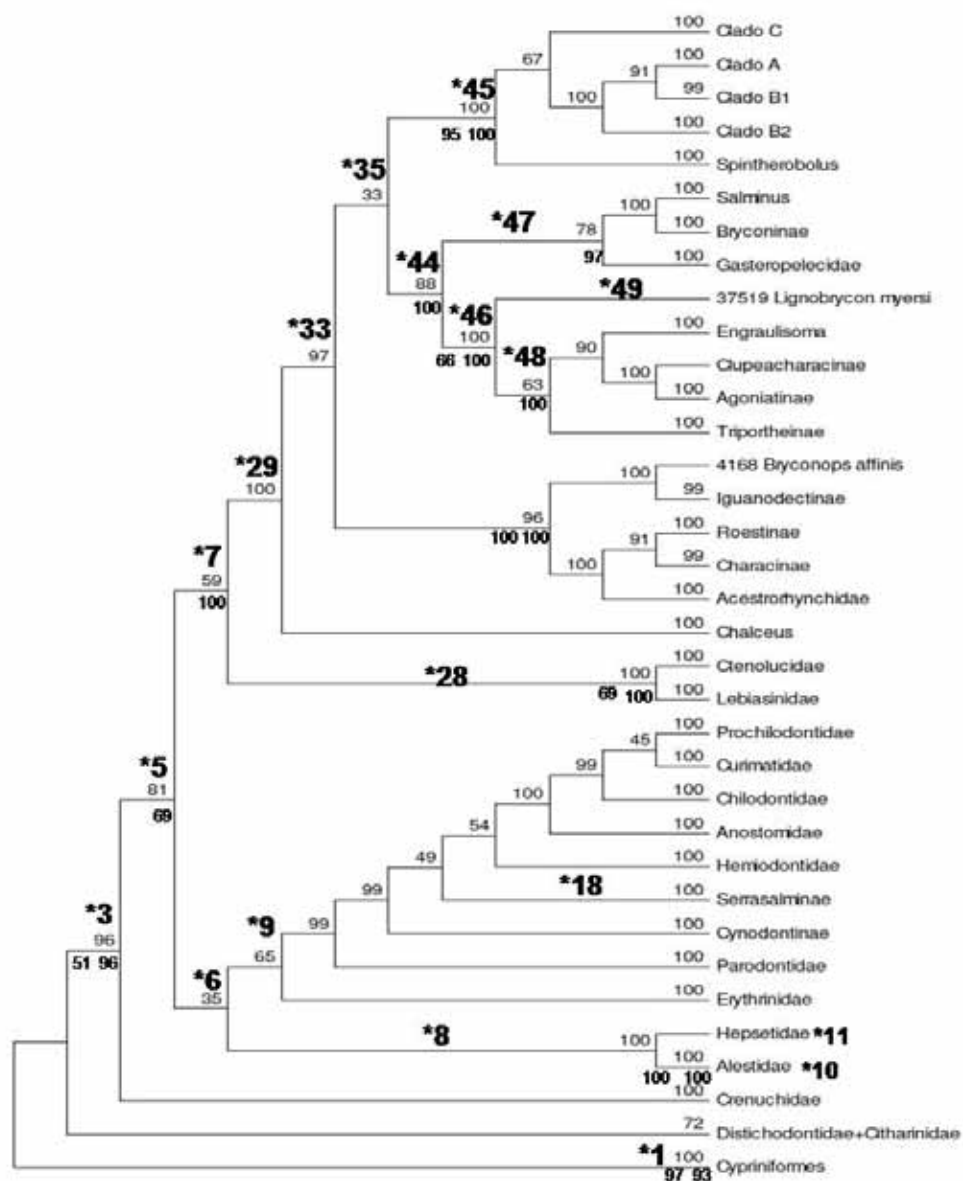


Figura 19. Árvore final construída com o método de Máxima Verossimilhança (ML). Os números acima dos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas. Os valores abaixo dos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas (MP) e o valor das probabilidades posteriores obtidas na análise de 18.000.000 de gerações (B), respectivamente, para os clados que são discutidos no texto. Os números com asteriscos representam os números dos nós.

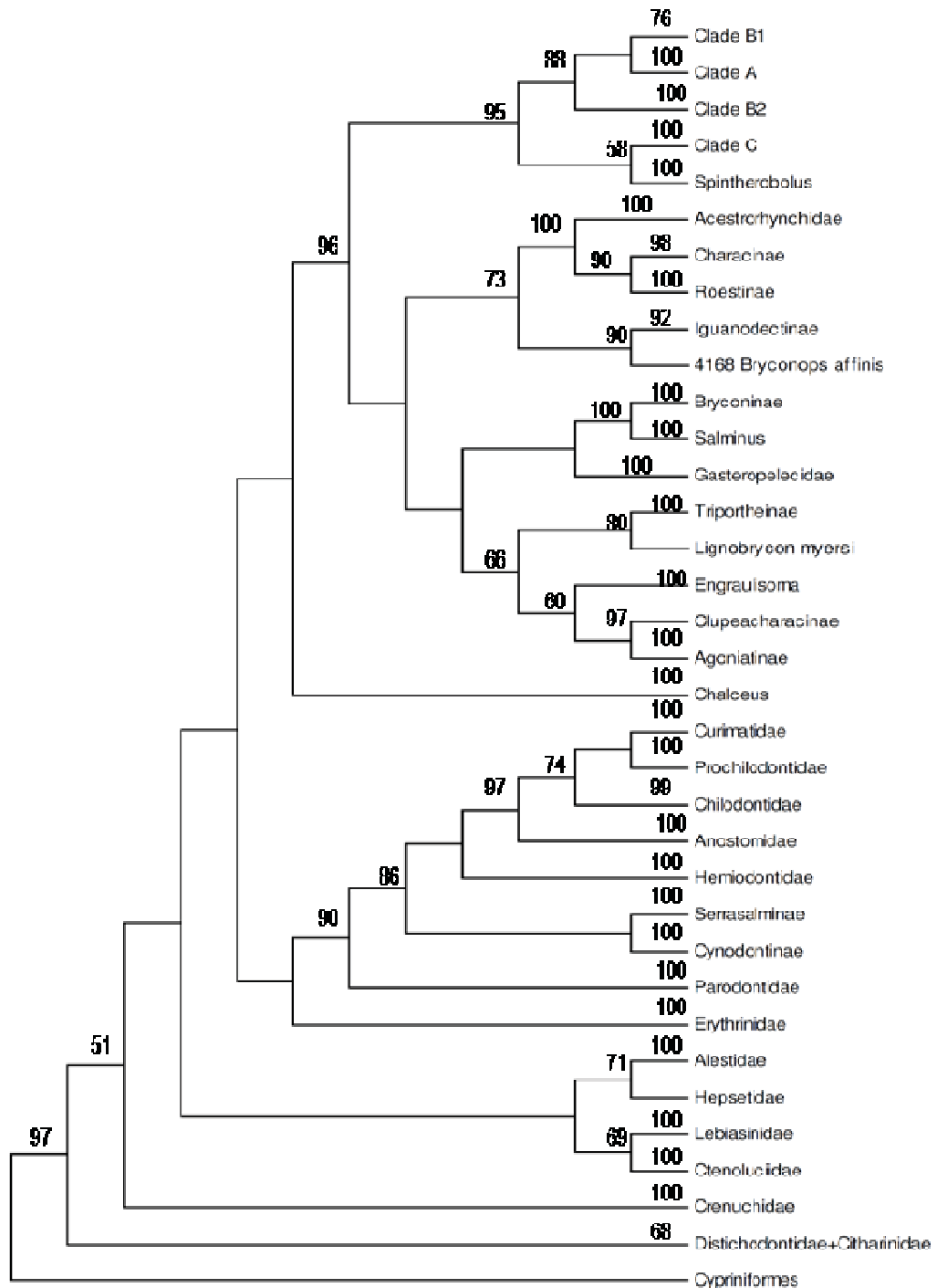


Figura 20. Árvore final construída com o método de Máxima Parcimônia (MP). Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas.

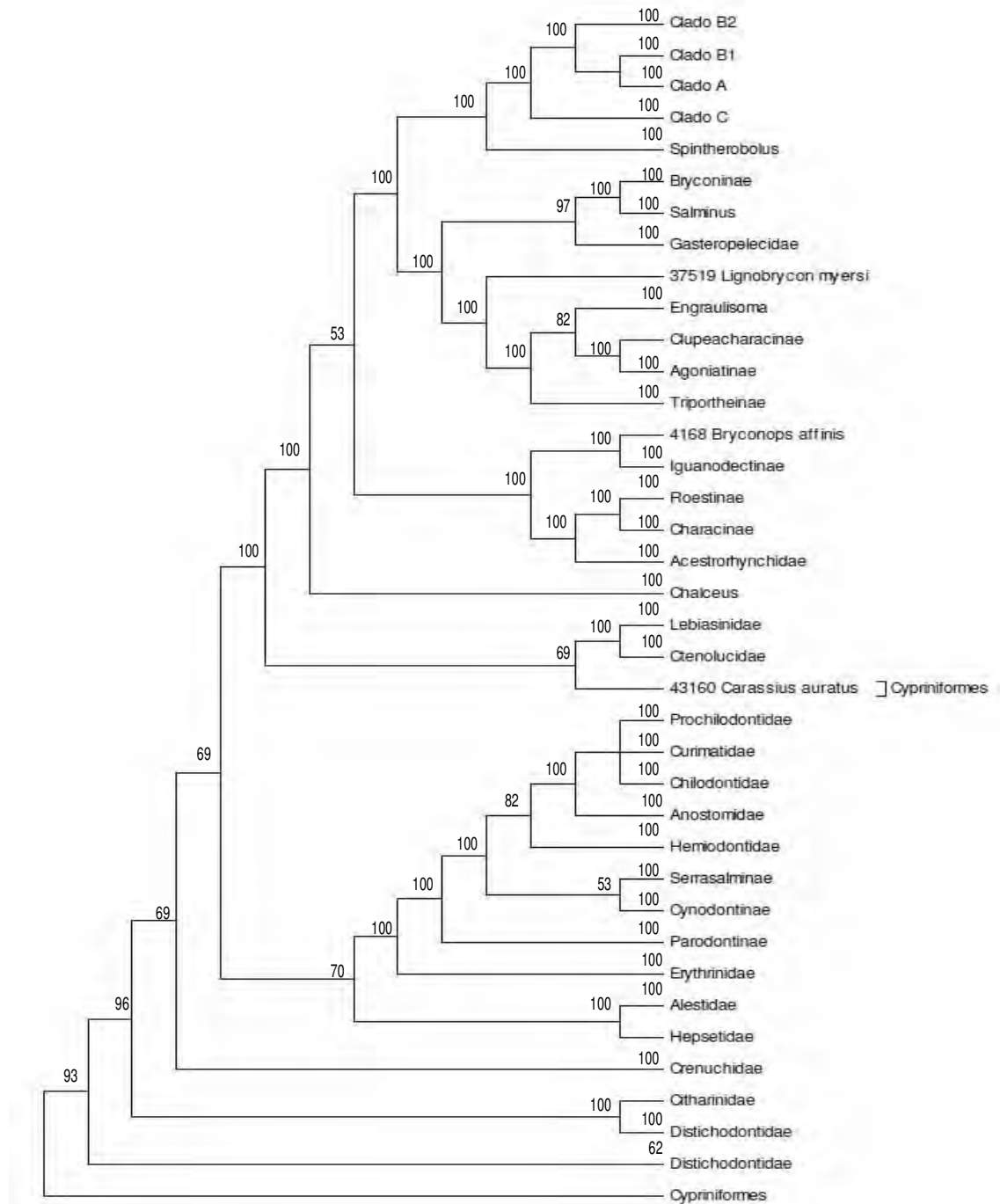


Figura 21. Árvore final construída com o método bayesiano. Os números acima nos nós representam o valor das probabilidades posteriores obtidas na análise de 18.000.000 de gerações.

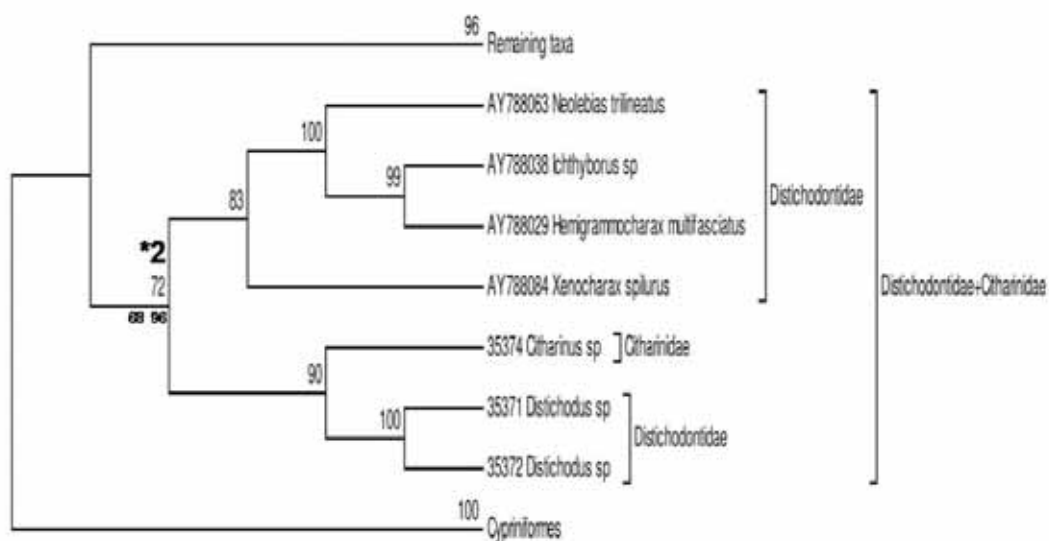


Figura 22. Árvore parcial construída com o método de Máxima Verossimilhança (ML), mostrando o relacionamento entre as famílias Citharinidae e Distichodontidae. Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas. Os valores abaixo dos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas (MP) e o valor das probabilidades posteriores obtidas na análise de 18.000.000 de gerações (B), respectivamente, para os clados que são discutidos no texto. Os números com asteriscos representam os números dos nós.

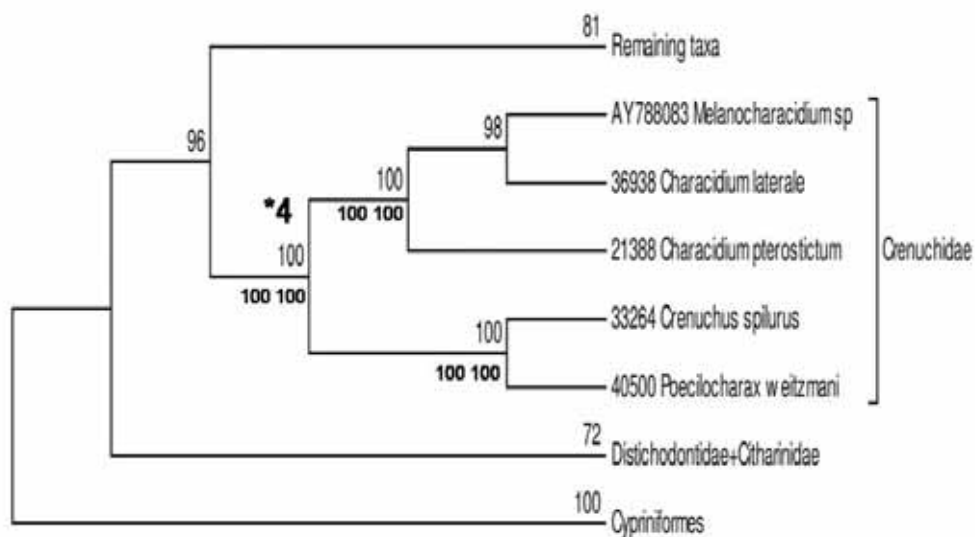


Figura 23. Árvore parcial construída com o método de Máxima Verossimilhança (ML), mostrando o monofiletismo da família Crenuchidae. Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas. Os valores abaixo dos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas (MP) e o valor das probabilidades posteriores obtidas na análise de 18.000.000 de gerações (B), respectivamente, para os clados que são discutidos no texto. Os números com asteriscos representam os números dos nós.

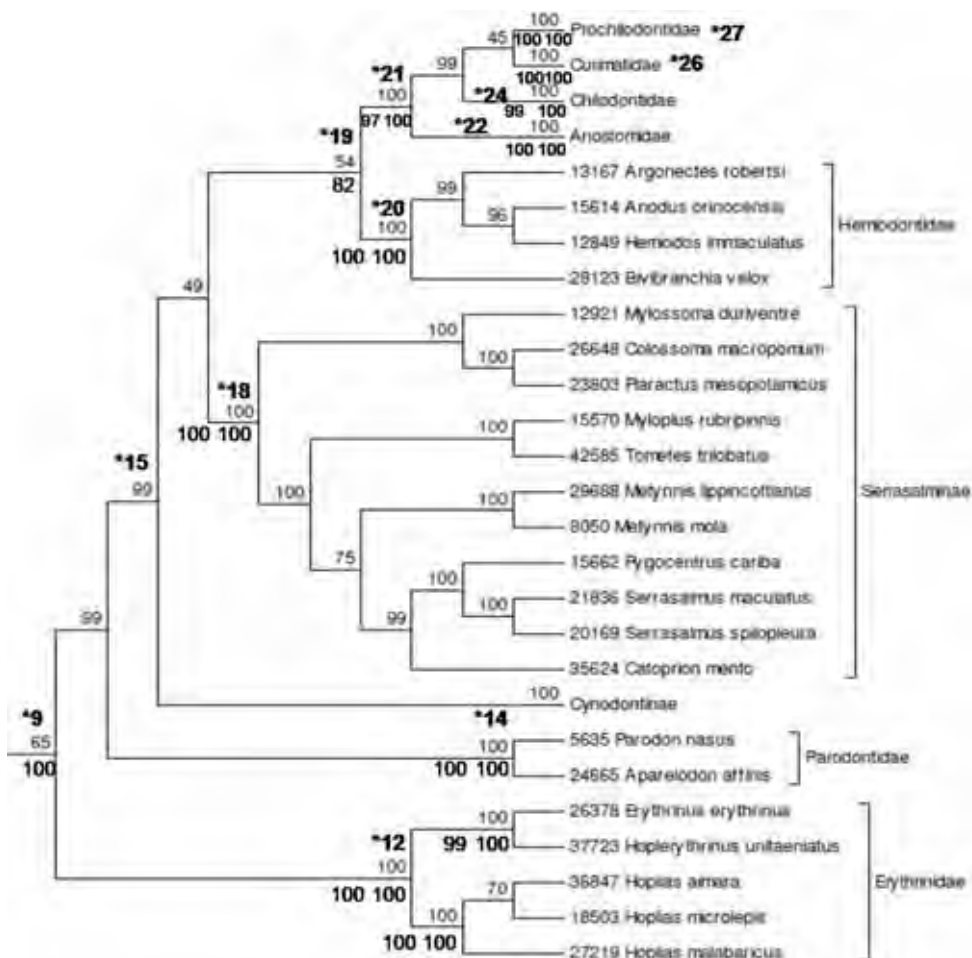


Figura 24. Árvore parcial construída com o método de Máxima Verossimilhança (ML), mostrando o clado 9. Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas. Os valores abaixo dos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas (MP) e o valor das probabilidades posteriores obtidas na análise de 18.000.000 de gerações (B), respectivamente, para os clados que são discutidos no texto. Os números com asteriscos representam os números dos nós.

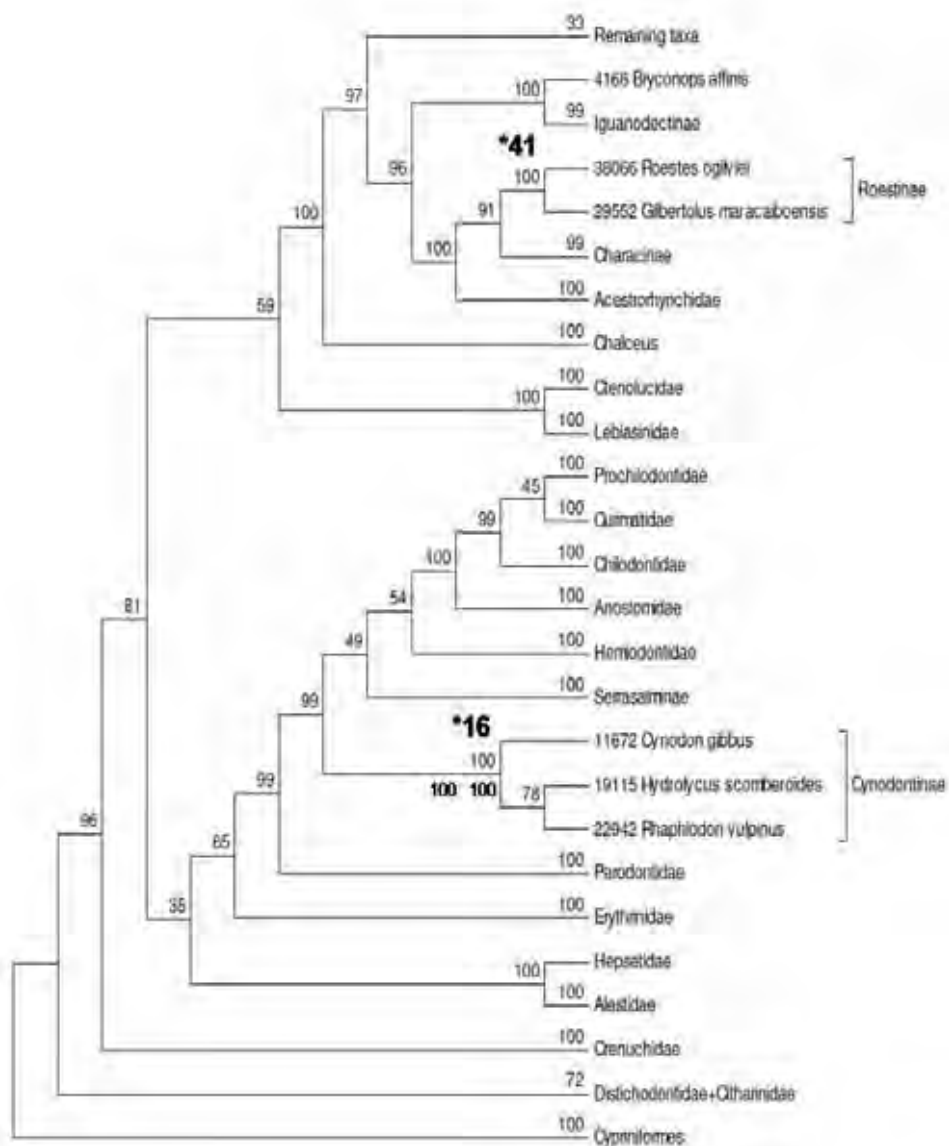


Figura 25. Árvore parcial construída com o método de Máxima Verossimilhança (ML), mostrando o não monofiletismo de Cynodontidae, representado pelas subfamílias Cynodontinae e Roestinae. Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas. Os valores abaixo dos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas (MP) e o valor das probabilidades posteriores obtidas na análise de 18.000.000 de gerações (B), respectivamente, para os clados que são discutidos no texto. Os números com asteriscos representam os números dos nós.

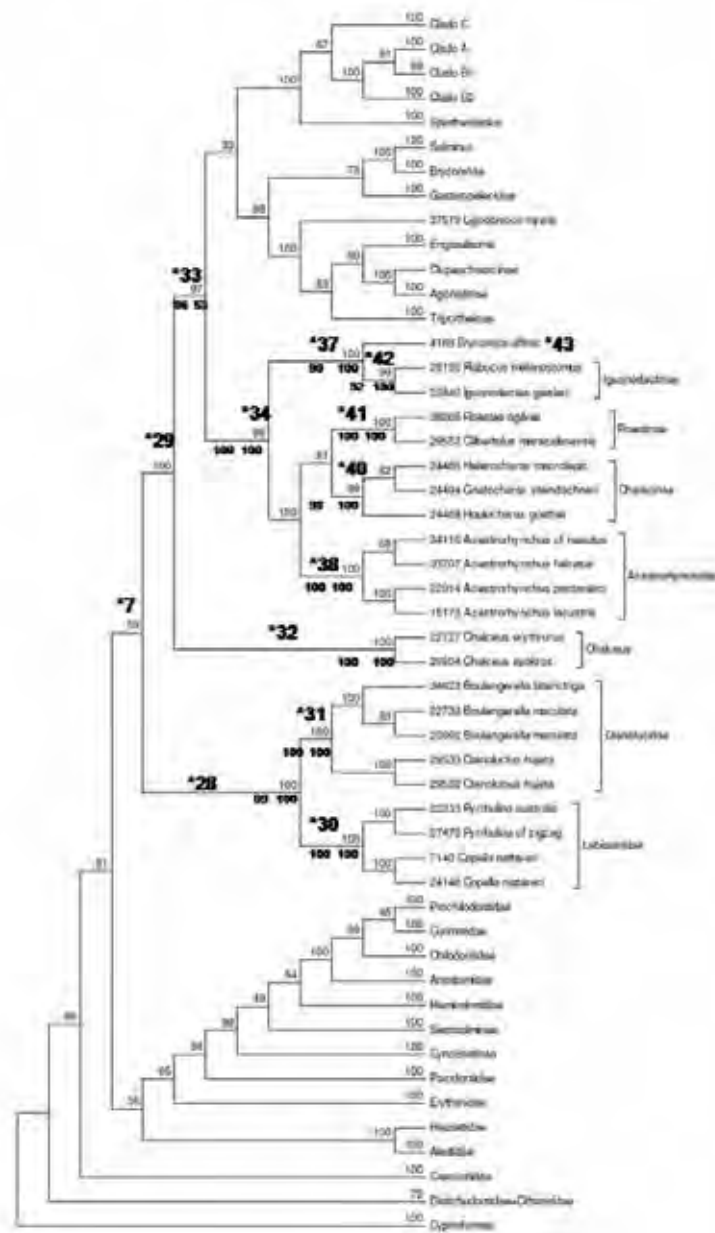


Figura 26. Árvore parcial construída com o método de Máxima Verossimilhança (ML), mostrando os componentes dos clados 28, 32 e 34. Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas. Os valores abaixo dos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas (MP) e o valor das probabilidades posteriores obtidas na análise de 18.000.000 de gerações (B), respectivamente, para os clados que são discutidos no texto. Os números com asteriscos representam os números dos nós.



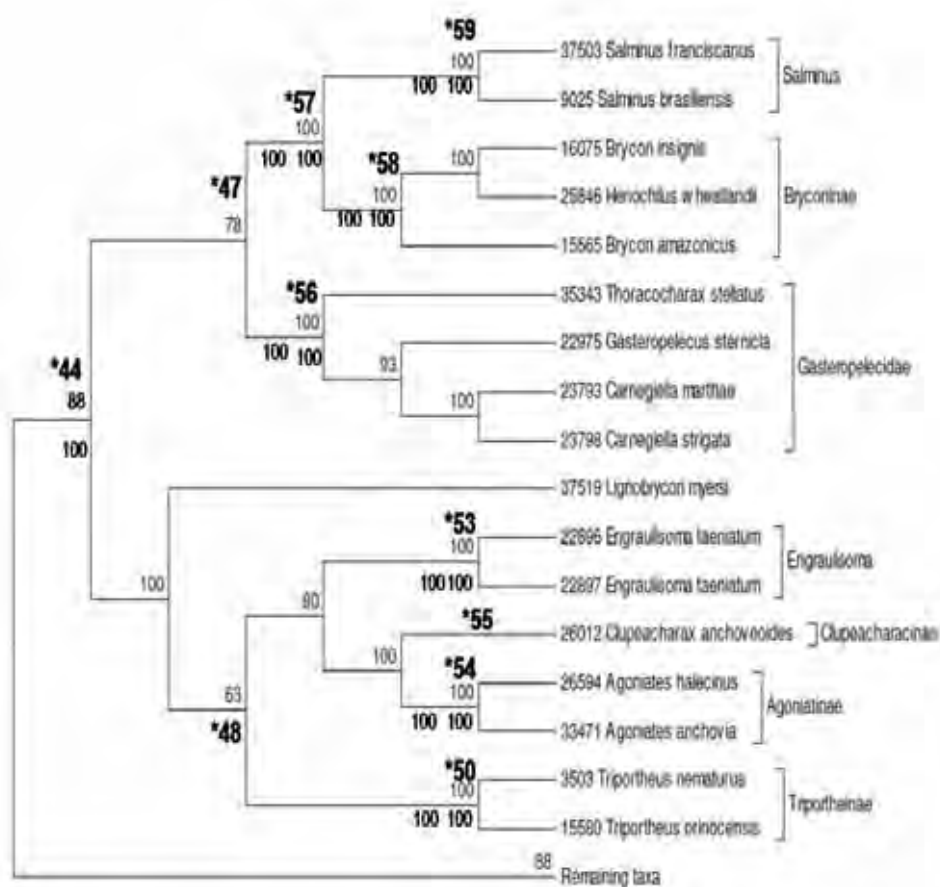


Figura 27. Árvore parcial construída com o método de Máxima Verossimilhança (ML), mostrando os componentes do clado 44. Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas. Os valores abaixo dos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas (MP) e o valor das probabilidades posteriores obtidas na análise de 18.000.000 de gerações (B), respectivamente, para os clados que são discutidos no texto. Os números com asteriscos representam os números dos nós.

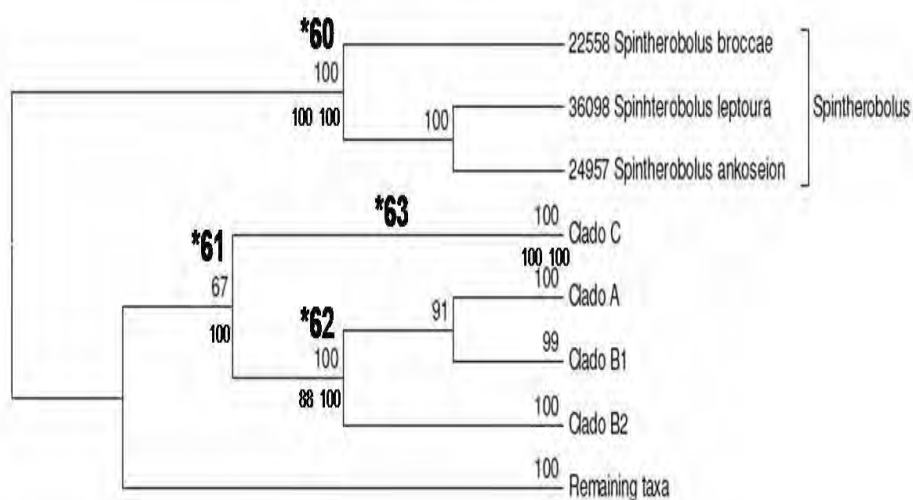


Figura 28. Árvore parcial construída com o método de Máxima Verossimilhança (ML), mostrando o gênero *Spintherobolus* e os clados A, B e C. Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas. Os valores abaixo dos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas (MP) e o valor das probabilidades posteriores obtidas na análise de 18.000.000 de gerações (B), respectivamente, para os clados que são discutidos no texto. Os números com asteriscos representam os números dos nós.

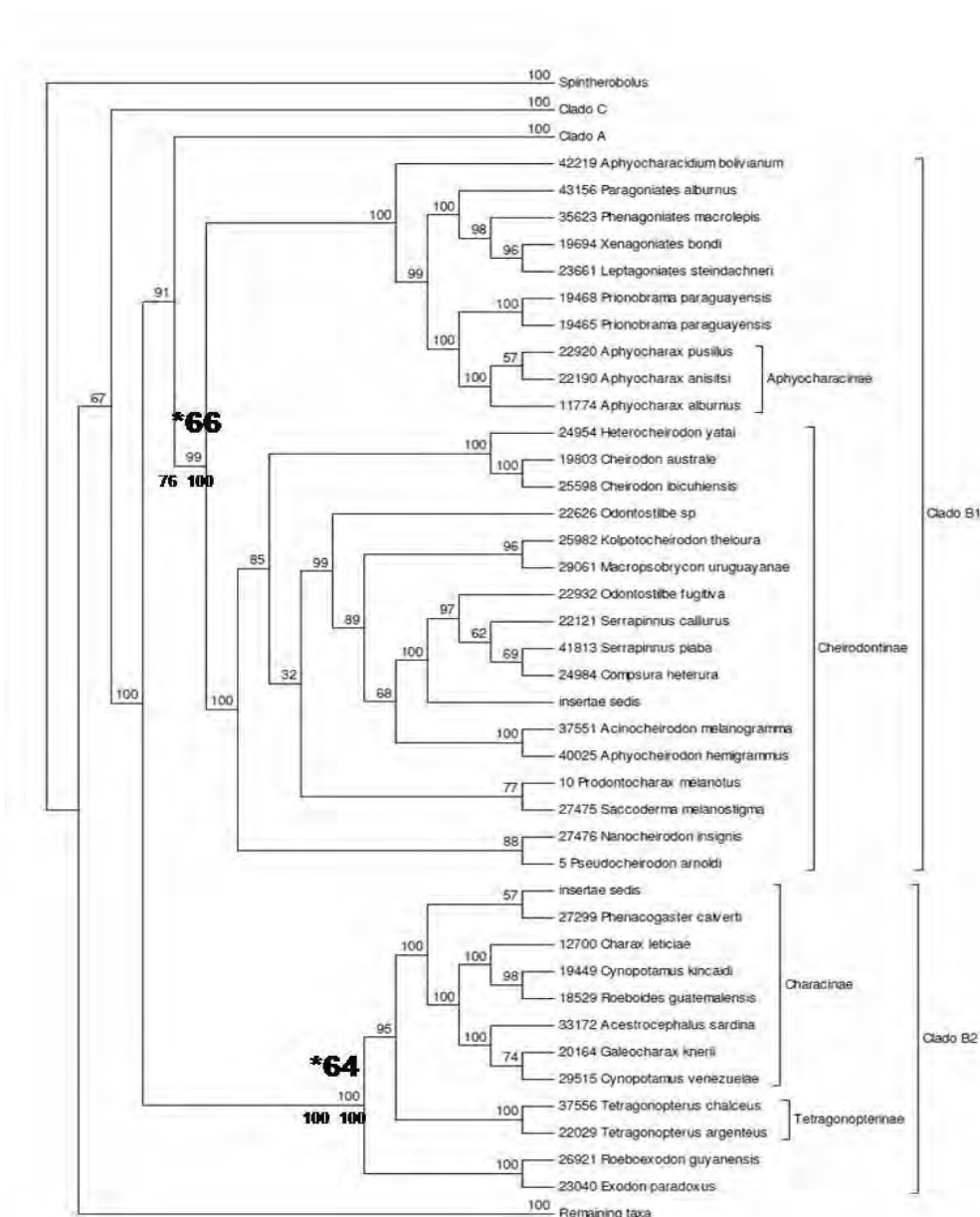


Figura 29. Árvore parcial construída com o método de Máxima Verossimilhança (ML), mostrando os componentes do clado B2 e B1. Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas. Os valores abaixo dos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas (MP) e o valor das probabilidades posteriores obtidas na análise de 18.000.000 de gerações (B), respectivamente, para os clados que são discutidos no texto. Os números com asteriscos representam os números dos nós.

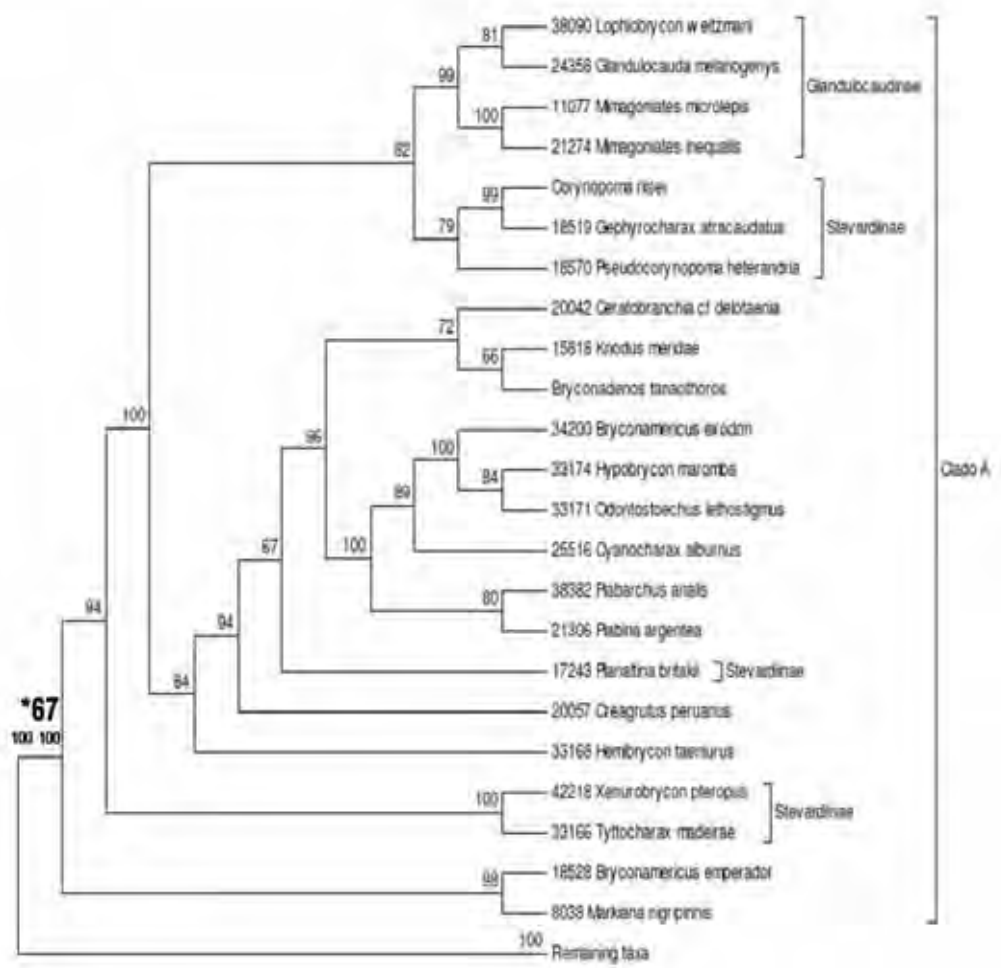


Figura 30. Árvore parcial construída com o método de Máxima Verossimilhança (ML), mostrando os componentes do clado A. Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas. Os valores abaixo dos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas (MP) e o valor das probabilidades posteriores obtidas na análise de 18.000.000 de gerações (B), respectivamente, para os clados que são discutidos no texto. Os números com asteriscos representam os números dos nós.

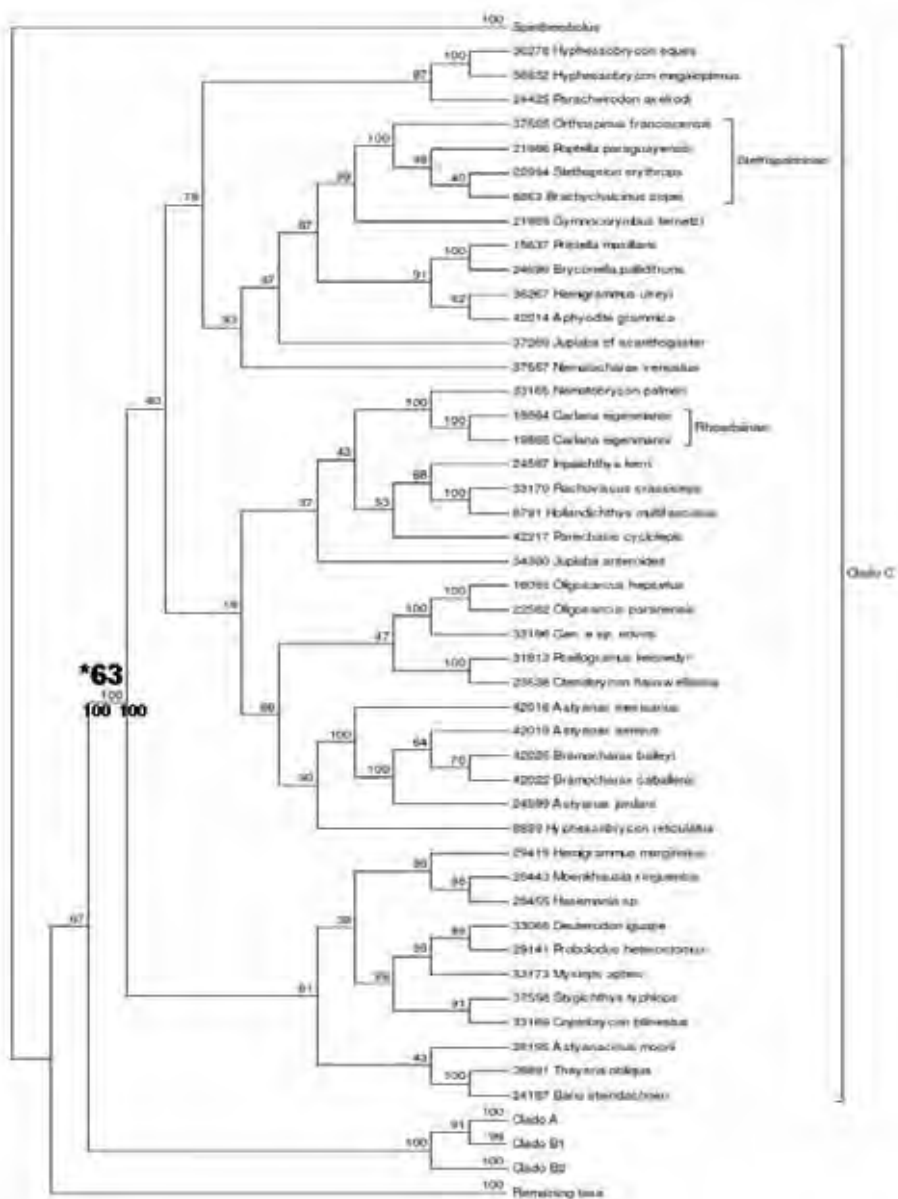


Figura 31. Árvore parcial construída com o método de Máxima Verossimilhança (ML), mostrando os componentes do clado C. Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas. Os valores abaixo dos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas (MP) e o valor das probabilidades posteriores obtidas na análise de 18.000.000 de gerações (B), respectivamente, para os clados que são discutidos no texto. Os números com asteriscos representam os números dos nós.

**DISCUSSÃO**

---

---

## 5. DISCUSSÃO

A família Characidae é o grupo mais especioso entre os Characiformes, abrangendo cerca de 1100 espécies válidas (Eschmeyer e Fong, 2010). Ao longo dos anos essa família vem sofrendo várias modificações na sua classificação, mas muito pouco se conhece sobre as relações filogenéticas de seus membros constituintes, o que torna ainda muito discutível a sua monofilia.

No presente estudo foram analisadas espécies pertencentes a todas as subfamílias de Characidae e também 60% das espécies consideradas *incertae sedis* em Characidae. Como grupo externo de Characidae, foram analisados representantes das 17 outras famílias de Characiformes reconhecidas por Nelson (2006) e duas espécies de Cypriniformes. Para várias dessas famílias foram amostradas vários gêneros, o que possibilitou também avaliar o relacionamento dentro das mesmas.

O monofiletismo de Characiformes foi confirmado no presente estudo (Figura 19), como proposto por Vari em 1998 e corroborado em vários outros estudos mais recentes (Ortí e Meyer, 1997; Buckup, 1998; Calcagnotto et al., 2005). Hipóteses de inter-relacionamento entre as famílias de Characiformes foram propostas anteriormente, mas problemas de amostragem (Buckup, 1998; Calcagnotto et al., 2005; Mirande, 2010) ou pouca resolução dos dados (Ortí e Meyer, 1997) as tornam muito limitadas.

O estudo de Buckup (1998), Calcagnotto et al. (2005) e os resultados presentes nesse trabalho corroboram a hipótese de Vari (1979), segundo a qual as famílias Citharinidae e Distichodontidae formam uma linhagem monofilética e são grupo irmão dos demais Characiformes (Figura 19). No estudo de Ortí e Meyer (1997), Citharinidae e Distichodontidae também aparecem como grupos irmãos, mas sua posição não foi testada, uma vez que foram utilizados como grupo externo para investigar as relações entre os Characiformes restantes. Por outro lado, nossos dados sugerem que alguns componentes de Distichodontidae são mais estreitamente relacionados com Citharinidae do que outros táxons de Distichodontidae (Figura 22), contudo esta hipótese deverá ser testada no futuro com mais dados.

A segunda linhagem observada nos resultados é a família Crenuchidae (Figura 19). Até o momento a posição de Crenuchidae tem sido problemática, com diferentes autores sugerindo hipóteses alternativas de posicionamento (Ortí e Meyer, 1997; Buckup, 1998; Calcagnotto et al., 2005; Mirande, 2010). No presente trabalho Crenuchidae aparece como grupo irmão dos demais Characiformes (Figura 19) exceto Citharinidae e Distichodontidae. Embora somente cinco táxons tenham sido incluídos nas análises (Figura 23), o monofiletismo da família foi corroborado nesse estudo, assim como a divisão da família nas subfamílias Crenuchinae e Characidiinae como proposto por Buckup (1998). Por outro lado, as duas espécies de *Characidium* analisadas não aparecem como espécies irmãs (Figura 23), sugerindo que o gênero pode ser polifilético, uma hipótese que deve ser testada no futuro, com dados adicionais.

Os resultados sugerem uma relação estreita entre as famílias Alestidae e Hepsetidae (Figura 19), o que não corrobora outras hipóteses, como as de Ortí e Meyer (1997), Buckup (1998), Calcagnotto et al. (2005) e Zanata e Vari (2005). Apenas na análise de MP Hepsetidae aparece como o grupo irmão de Ctenoluciidae (Figura 20) como proposto por Buckup (1998). Por outro lado, nosso estudo indica que Alestidae não é grupo irmão de *Chalceus* (Figura 19), como proposto por Zanata e Vari (2005) e Mirande (2010).

Todas as análises deste estudo resultaram em um grande clado Neotropical composto pelas famílias Hemiodontidae, Anostomidae, Chilodontidae, Curimatidae, Cynodontinae, Erythrinidae, Parodontidae, Prochilodontidae e pela subfamília Serrasalminae (Figuras 19). Apesar de alguns autores indicarem uma estreita relação entre algumas dessas famílias (Ortí e Meyer, 1997; Buckup, 1998), o arranjo final do presente estudo representa uma nova hipótese de relacionamento entre estes táxons. Neste grande grupo Erythrinidae aparece como o grupo irmão de todas as famílias remanescentes (Figura 19), hipótese esta em desacordo com outros estudos que associaram essa família às famílias Ctenoluciidae, Hepsetidae ou Lebiasinidae (Buckup, 1998, Calcagnotto et al., 2005).

Os resultados indicam que, dentro de Erythrinidae, *Erythrinus* é grupo irmão de *Hoplerythrinus* e esse grupo, irmão de *Hoplias* (Figura 24). Esta é a



primeira hipótese publicada de relacionamento entre gêneros de Erythrinidae e deve ser testada em estudos futuros nesta família.

Num ramo acima da árvore, temos a família Parodontidae (Figura 19), nesse estudo representada por dois de seus três gêneros reconhecidos (Figura 24). A posição da família tem sido um tanto ambígua, mas nenhuma das hipóteses anteriores propôs que esta família pudesse ser grupo irmão de um grande número de outras famílias neotropicais, como verificado no presente estudo.

Cynodontinae (Figura 19), o próximo grupo ao longo da filogenia, contém representantes dos três gêneros reconhecidos desta subfamília (Figura 25). O monofiletismo de Cynodontidae, como proposto por Lucena e Menezes (1998), está em contradição com nossos resultados, dado que no presente estudo os representantes de Roestinae (*Roestes* e *Gilbertolus*) aparecem mais relacionadas a Acestrorhynchidae (Figura 25), porém, a monofilia de Cynodontinae como proposto por Toledo-Piza (2000) foi corroborada. As relações internas entre os gêneros de Cynodontinae encontrados no presente estudo diferem daqueles propostos por Toledo-Piza (2000) já que *Cynodon* é aqui grupo irmão de *Hydrolycus* mais *Rhaphiodon* (Figura 25) como proposto por Toledo-Piza (2000). Apenas uma espécie de cada gênero foi analisada no presente estudo e taxóons adicionais devem ser incluídos em futuros estudos para investigar melhor essa hipótese

Continuando a filogenia, temos o clado 18 formado pela subfamília Serrasalminae que aparece como grupo irmão das famílias Hemiodontidae, Anostomidae, Chilodontidae, Curimatidae e Prochilodontidae (Figura 19). Ortí e Meyer (1997) encontraram Serrasalminae como grupo irmão de Lebiasinidae e Calcagnotto et al. (2005), consideram a hipótese de Serrasalminae ser grupo irmão de um clado constituído por cinco famílias neotropicais, uma das quais Hemiodontidae.

O monofiletismo de Hemiodontidae foi corroborado por Langeani (1998), mas a filogenia final obtida por esse autor difere do que aqui temos. *Anodus* aparece como o grupo irmão de *Micromischodus* (um gênero não incluído no presente estudo), enquanto *Anodus* aqui é grupo irmão de *Hemiodos* (Figura 24). Uma análise taxonômica mais abrangente de Hemiodontidae é necessária para avaliar os pontos alternativos da presente hipótese.

As piranhas e pacus têm sido frequentemente considerados como uma subunidade de Characidae, no entanto, a anatomia externa distinta dos membros de Serrasalminae (Géry, 1977) e sua separação filogenética de outros táxons tipicamente associadas a Characidae (Ortí et al., 2008) levaram vários autores a considerar esse grupo como uma família (por exemplo, Ortí et al., 2008; Eschmeyer e Fong, 2010). Embora alguns gêneros e muitas espécies de Serrasalminae não foram incluídos neste estudo, os resultados corroboram a monofilia de *Metinnys* e *Serrasalmus* (Figura 24) como proposto por diversos autores (por exemplo, Ortí et al., 2008). No presente estudo *Myloplus* e *Tometes* pertencem a um clado monofilético e *Metynnys* aparece mais relacionado com *Catoprion*, *Pygocentrus* e *Serrasalmus* (Figura 24), como proposto por Ortí et al. (2008).

Continuando a filogenia, encontramos um grande clado composto por Anostomidae, Chilodontidae, Curimatidae e Prochilodontidae (Figura 19). Esse resultado é semelhante ao obtido por Vari (1983) e corroborada por Buckup (1998), baseado em dados de Vari (1983). Resultados moleculares anteriores (Ortí e Meyer, 1997) renderam uma hipótese divergente das relações entre essas famílias, que é refutado aqui. Vari (1983), em função de uma série de modificações incomum dos arcos branquiais e porção anterior da coluna vertebral, encontrou uma relação estreita entre Chilodontidae e Anostomidae que não foi corroborada no presente estudo. A análise de mais representantes destas famílias será necessária para testar as hipóteses apresentadas aqui.

Os resultados de ML e B sugerem que o grupo irmão do clado 29 (Figura 19) é o clado composto por Lebiasinidae e Ctenolucidae (clado 28), enquanto na análise da MP Lebiasinidae e Ctenoluciidae tem uma posição mais basal (Figura 20). A relação de grupos irmãos entre Lebiasinidae e Ctenoluciidae também foi observado por Calcagnotto et al. (2005). Outros autores sugeriram diferentes hipóteses de relacionamento entre essas famílias (Vari, 1995; Ortí e Meyer, 1997; Buckup, 1998). Considerando as hipóteses conflitantes encontradas nas análises do presente trabalho e em geral a baixa resolução de nós mais internos na filogenia de Characiformes, conclui-se que mais dados são ainda necessários para resolver as relações antigas entre essas famílias.

O clado 29, desse trabalho, engloba todas as espécies atualmente agrupadas em Characidae (sensu Reis et al., 2003), com exceção de

Serrasalminae e com a adição de Roestinae, Gasteropelecidae e Acestrorhynchidae (Figura 19). Neste clado *Chalceus* é o grupo irmão de todos os táxons restantes (Figura 19), congruente com a hipótese de Calcagnotto et al. (2005), mas em desacordo com Zanata e Vari (2005) e Mirande (2009, 2010) baseado em várias características morfológicas que indicam uma estreita relação entre *Chalceus* e Alestidae.

O clado 34 (Figura 26) contém a família Acestrorhynchidae, as subfamílias Iguanodectinae e Roestinae, alguns gêneros de Characinae e *Bryconops*. Iguanodectinae (dois gêneros válidos) aparece como o grupo irmão de *Bryconops affinis* (Figura 26). Mirande (2010) também corroborou o monofilismo de Iguanodectinae encontrando-a proximamente relacionada a um clado chamado '*Bryconops*'.

Acestrorhynchidae (clado 38) aparece como grupo irmão de Roestinae (clado 41), uma subfamília que atualmente pertence a Cynodontidae, e algumas espécies de Characinae (clado 40) (Figura 26). A estreita relação entre Acestrorhynchidae e Roestinae foi proposto por Lucena e Menezes (1998). Por outro lado, Malabarba e Weitzman (2003) questionam a relação entre Roestinae e Cynodontinae por causa da presença de ganchos ósseos nos raios das nadadeiras em *Gilbertolus* e *Roestes* e a ausência dessa característica em *Cynodon*, *Rhaphiodon* e *Hydrolycus*. Os resultados do presente trabalho indicam que estas duas subfamílias não são parentes próximos, refutando a monofilia de Cynodontidae de Lucena e Menezes (1998). Mirande (2009) encontrou um grupo monofilético formado por *Acestrorhynchus pantaneiro* e *Rhaphiodon vulpinus*, uma hipótese que é refutada no presente estudo desde que *Rhaphiodon* e os outros dois gêneros de Cynodontinae, apareceram, nesse estudo, como pertencentes ao clado 16 (Figura 25).

Mirande (2009) propõe a subfamília Heterocharacinae incluindo *Gnathocharax* (não estudado por esse autor), *Heterocharax*, *Hoplocharax* e *Lonchogenys*. Embora representantes de *Lonchogenys* não tenham sido analisados no presente estudo, um grupo monofilético formado por *Gnathocharax*, *Heterocharax* e *Hoplocharax* também foi observado em nossos resultados (Figura 26). Os gêneros *Hoplocharax* e *Gnatocharax* foram atribuídos a Characinae por Lucena e Menezes (2003), mas diferem dos demais membros desta subfamília pela ausência de um pseudotímpano e pela

retenção de uma nadadeira peitoral em exemplares de larvas de até 41,0 mm CP (Lucena e Menezes, 2003). O pseudotímpano também está ausente em *Lonchogenys* e uma nadadeira peitoral larval mantida em amostras de até 41,0 mm CP é também ausente nesse gênero e *Heterocharax* (Lucena e Menezes, 2003). Este clado (clado 40) apareceu em todas as análises, relacionado com Roestinae (clado 41) (Figura 26).

O clado 44 (Figura 27) é composto pelos gêneros *Salminus*, *Lignobrycon* e *Engraulisoma*, considerados *incertae sedis* em Characidae, quatro subfamílias de Characidae (Agoniatinae, Bryconinae, Clupeacharacinae e Triportheinae) e a família Gasteropelecidae. Dentro do clado 44 existem duas grandes subunidades, o clado 48 em que Agoniatinae forma um grupo monofilético com Clupeacharacinae (apenas uma espécie reconhecida) e esse grupo é o grupo irmão de *Engraulisoma* (uma única espécie descrita) (Figura 27). Este clado monofilético é grupo irmão de *Triportheus* (duas das dezenove espécies incluídas) (Figura 27). Na análise de ML *Lignobrycon* (uma única espécie recente) é o grupo irmão de todos os táxons restantes do clado 48 (Figura 19). O relacionamento desses grupos nunca foi previamente investigado, pois, estudos filogenéticos anteriores envolvendo Characiformes ou caracídeos incluíram apenas alguns representantes deste clado (Ortí e Meyer, 1997; Calcagnotto et al., 2005; Mirande, 2009, 2010; Javonillo et al., 2010). Por outro lado, Malabarba (1998b) encontrou oito sinapomorfias apoiando uma relação entre *Triportheus* e *Lignobrycon*.

O clado 47 é composto por Gasteropelecidae (clado 56), grupo irmão de Bryconinae mais *Salminus* (clado 57) (Figura 27). Os três gêneros de Gasteropelecidae (clado 56) formaram um grupo monofilético em que *Thoracocharax* é o grupo irmão do clado formado por *Gasteropelecus* e *Carnegiella* (Figura 27). Javonillo et al. (2010) foram os únicos autores a testar previamente a monofilia de Gasteropelecidae e seus três gêneros. Eles encontraram, alternativamente, *Thoracocharax* sendo grupo irmão de *Gasteropelecus* com *Carnegiella* sendo grupo irmão deste clado. Em sua análise pré-cladística de Gasteropelecidae, Weitzman (1954) considerou *Carnegiella* como um "desenvolvimento" evolutivo de *Gasteropelecus*, principalmente através de perdas estruturais. Posteriormente Weitzman (1960) afirmou que "*Thoracocharax* tem uma morfologia um pouco mais primitiva em

relação aos outros membros de Gasteropelecinae (=Gasteropelecidae)", decorrentes de um ancestral comum com *Gasteropelecus* e que *Carnegiella* "parece ser uma forma neotênica de *Gasteropelecus* e diretamente dele derivado". Os resultados desse trabalho são coerentes com as propostas de Weitzman (1954, 1960), mas não com a hipótese de Javonillo et al. (2010).

A estreita relação entre *Brycon* e *Salminus* foi reconhecido por Géry (1977), que sugeriu que a tribo Salminini fazia parte de Bryconinae. Tal hipótese foi confirmada em estudos filogenéticos de Ortí e Meyer (1996), Calcagnotto et al. (2005) e Javonillo et al. (2010). Calcagnotto et al. (2005) encontraram *Salminus* dentro de *Brycon* e Javonillo et al. (2010) encontraram *Salminus* como o grupo irmão de duas espécies analisadas de *Brycon*. O monofiletismo de *Brycon* é rejeitado, pois, *B. insignis* apareceu mais relacionada a *Henochilus wheatlandii* do que a *B. amazonicus* (clado 58, Figura 27). Isso indica que são necessários mais estudos para determinar se *Henochilus* deve ser sinônimo de *Brycon*, já que este último é considerado um gênero monofilético. Mirande (2009) propôs a subfamília Salmininae, para destacar o grupo monofilético formado pelas espécies de *Salminus* o que é corroborado no presente estudo.

O clado 45 (Figura 19) é o que mais se aproxima da definição de Characidae proposta por Malabarba e Weitzman (2003), onde este grupo é caracterizado morfologicamente pela ausência de um osso supraorbital em seus membros, uma sinapomorfia de Characidae. A única diferença entre os Characidae desse estudo com os de Malabarba e Weitzman (2003) é que nesse trabalho, Iguanodectinae é mais relacionada com *Bryconops* (Figura 26) do que os outros taxóons atribuídos à Characidae. No entanto, vale ressaltar que as espécies do Iguanodectinae tem um osso supraorbital, diferentemente do sugerido por Malabarba e Weitzman (2003).

Mirande (2009, 2010) propôs um conceito alternativo de Characidae, que é mais abrangente do que a do presente estudo, e que é caracterizado, segundo o autor, por oito sinapomorfias, das quais apenas uma, a fusão do raio caudal procorrente mais anterior em um osso medial paralelo aos raios restantes, é uma sinapomorfia de Characidae (Mirande, 2010). As outras sete sinapomorfias propostas têm algum grau de homoplasia. Segundo esta proposta várias famílias de Characiformes (como reconhecidas por Nelson,

2006), como Cynodontidae e Acestrorhynchidae seriam subfamílias de Characidae.

Em todas as presentes análises *Spintherobolus* (clado 60, Figura 28) aparece como grupo irmão de todos os caracídeos remanescentes do clado 45 (Figura 19). Três das quatro espécies reconhecidas de *Spintherobolus* foram sequenciadas (Figura 28), com exceção da espécie tipo (*S. papilliferus*). Esse resultado indica que a subfamília Cheirodontinae, como presentemente definida (Malabarba, 1998a), não é monofilética na medida em que os restantes membros da subfamília não ficam como grupo irmão desse gênero, nesta análise.

As espécies restantes de Characidae (clado 61) são incluídos em três clados (Figura 28) com grande número de espécies: clado 63 (Figura 28), clado 67 (Figura 30) e um terceiro clado que se divide em dois clados menores 66/64 (Figura 29). Estes mesmos clados, chamados de C, A e B, respectivamente, foram encontrados na filogenia molecular de Javonillo et al. (2010) utilizando sequências de genes diferentes.

O clado 63 (Figura 31) é equivalente ao clado C de Javonillo et al. (2010). Este clado inclui gêneros especiosos como *Astyanax*, *Hemigrammus*, *Hyphessobrycon*, *Jupiaba* e *Moenkhausia* (Figura 31), que foram previamente demonstrados serem polifiléticos por Mirande (2009) e Javonillo et al. (2010). Neste clado vários grupos com morfologia semelhante foram bem apoiados, como o grupo composto por *Hollandichthys* e *Rachoviscus* e o grupo composto por *Ctenobrycon* e *Psellogrammus* (Figura 31). Um grupo interessante e bem apoiado foi composto por *Stygichthys typhlops* e *Coptobrycon bilineatus*, como grupo irmão de *Probolodus heterostomus*, *Deuterodon iguape* e *Myxiops aphos* (Figura 31).

Todas estas espécies habitam formações de terra muito antiga na região nordeste e sudeste do Brasil, que são também as áreas de residência de linhagens primitivas, de outros grupos de peixes, como Trichomycteridae (de Pinna, 1998) e Loricariidae (Armbruster, 2004).

Dentro do clado C tem-se os quatro gêneros de Stethaprioninae (Figura 31), formando um grupo monofilético, corroborando a hipótese apresentada por Reis (1989) com base em análises morfológicas. Reis (1989) constatou que *Brachychalcinus* e *Stethaprion* são grupos irmãos uns dos outros, *Orthospinus*

é grupo irmão desse clado, e *Poptella* é o gênero mais basal. A relação filogenética desses quatro gêneros de Stethaprioninae não se mostraram as mesmas nos resultados do presente trabalho (Figura 31). Foi encontrado também *Gymnocorymbus ternetzi* como grupo irmão de Stethaprioninae (Figura 31) como proposto por Mirande (2009). Rhoadsiinae, representada nesse estudo apenas por *Carlana eigenmanni*, também se encontra no clado C e é grupo irmão de *Nematobrycon palmeri* (Figura 31), um resultado diferente de Mirande (2009, 2010).

O segundo grande clado dentro do clado 61 é o clado B (Figura 28). Um grupo similar, monofilético, com um menor número de táxons foi observado no estudo de Javonillo et al. (2010). Este clado apareceu dividido em nosso estudos nos cladogramas B1 e B2 (Figura 28).

O clado B1 (Figura 29) é formado pela subfamília Cheirodontinae (menos o gênero *Spintherobolus*) tornando, portanto, Cheirodontinae, *sensu* Malabarba (2003), um grupo parafilético. O monofiletismo de Cheirodontinae foi anteriormente proposto por Calcagnotto et al. (2005), Mirande (2009) e Javonillo et al. (2010), mas sem a análise de um número significativo de gêneros e espécies, principalmente *Spintherobolus*. Verificou-se que as espécies trans-andinas de Cheirodontinae, *Nanocheirodon insignis* e *Pseudocheirodon arnoldi*, são grupo irmão de gêneros e espécies que ocorrem na região cis-Andina. Isso sugere uma origem muito antiga para este clado, anterior à elevação da Cordilheira dos Andes.

Outros integrantes do clado B1 são a subfamília Aphyocharacinae e várias espécies consideradas *incertae sedis* em Characidae (Figura 29). Este grupo tem uma composição semelhante à de Aphyocharacinae mais Paragoniatinae de Géry (1977) que foram agrupados por Mirande (2009) em sua nova subfamília Aphyocharacinae (que inclui também *Inpaichthys* e *Rachoviscus*). No presente estudo, no entanto, *Rachoviscus* e *Inpaichthys* pertencem a uma linhagem diferente (Figura 31), enquanto *Aphyocharacidium bolivianium* aparece como grupo irmão de Aphyocharacinae e das espécies consideradas *incertae sedis* em Characidae (Figura 29), presentes no clado B1, enquanto Mirande (2009) sugere a inclusão de *Aphyocharacidium* em sua nova subfamília Aphyoditeinae .

Além disso, a relação entre estes gêneros no presente estudo diferem daqueles propostos por Mirande (2009, 2010). Nos resultados desse trabalho Aphyocharacinae aparece como o grupo irmão de *Prionobrama* (Figura 29) e este grupo é, por sua vez, o grupo irmão do clado formado por *Paragoniates*, *Phenagoniates*, *Xenagoniates* e *Leptagoniates* (Figura 29). Estes últimos quatro gêneros têm uma morfologia muito característica com corpo muito comprimido e alongado e uma nadadeira anal longa (Géry, 1977).

O clado B2 (Figura 29) é formado pelas subfamílias Characinae (não todas as espécies) e Tetragonopterinae e por dois gêneros, *Exodon* e *Roeboexodon* considerados *incertae sedis* em Characidae que formam o grupo irmão de todos os outros táxons desse clado (Figura 29). *Exodon* e *Roeboexodon* foram agrupados com *Bryconexodon* (não analisado aqui) em um clado monofilético de Mirande (2009) com a hipótese de que o grupo estava intimamente relacionado com representantes de Characinae. Em contraste, no presente trabalho, *Exodon* e *Roeboexodon* estão relacionados a um clado composto por Tetragonopterinae, Characinae e *Microschemobrycon casiquiare* (Figura 29). Uma relação de *Exodon* com Tetragonopterinae e Characinae também foi encontrado por Javonillo et al. (2010).

Um dos resultados interessantes neste estudo foi a relação de grupos irmãos entre *Microschemobrycon casiquiare* e Characinae (Figura 29). Mirande (2009), encontrou *Microschemobrycon* intimamente relacionado a outros gêneros de Aphyoditeinae, um grupo que tem uma composição semelhante ao proposto inicialmente por Géry (1977). Characinae, nos resultados desse trabalho, é semelhante ao grupo de mesmo nome, tal como definido por Mirande (2009), mas como já foi referido, excluindo *Exodon* e *Roeboexodon*.

No presente estudo Characinae, difere do proposto por Lucena e Menezes (2003) pela exclusão de *Gnathocharax*, *Hoplocharax* e *Heterocharax*. Aqui, as duas espécies analisadas de Cynopotamus, *C. kincaidi*. e *C. venezuelae* não formam um grupo monofilético (Figura 29), levantando questões sobre a monofilia do gênero. Tetragonopterinae, limitada ao gênero *Tetragonopterus* por Reis (2003), é um grupo monofilético e grupo irmão de Characinae.

O outro clado pertencente ao clado 61 é o Clado A (Figura 30) correspondendo ao clado A de Malabarba e Weitzman (2003). Como



observado pelos autores citados é notável a semelhança na composição de gêneros do grupo proposto por Géry (1977) e da hipótese de monofiletismo do clado A. O monofiletismo deste clado foi corroborado no amplo estudo de Weitzman et al. (2005) e Menezes e Weitzman (2009), e nos estudos de Calcagnotto et al. (2005), Mirande (2009, 2010) e Javonillo et al. (2010), embora com base em menor número de espécies analisadas. Dentro deste grupo, encontramos Glandulocaudinae monofilético (Figura 30) onde *Glandulocauda* aparece como grupo irmão de *Lophiobrycon* e este clado é grupo irmão de *Mimagoniates*. Este é o primeiro teste real da hipótese de monofiletismo de Glandulocaudinae como está atualmente delimitado em estudos recentes, uma vez que somente um gênero (*Mimagoniates*) foi analisada em estudos anteriores (Calcagnotto et al., 2005; Mirande, 2009, 2010; Javonillo et al., 2010 ). Esta hipótese é diferente da de Castro et al. (2003) e Menezes e Weitzman (2009) que encontraram *Glandulocauda* como grupo irmão de *Mimagoniates* e este clado como grupo irmão de *Lophiobrycon*. Uma análise incorporando novas espécies de *Glandulocauda* e particularmente *Mimagoniates*, é necessária para investigar exaustivamente as relações entre estes gêneros.

A segunda subfamília deste clado é Stevardiinae (Figura 30). Embora apenas seis dos dezessete gêneros reconhecidos de Stevardiinae tenham sido incluídos neste estudo, os resultados indicam que esta subfamília, como proposta por Weitzman et al. (2005) é polifilética (Figura 30). *Gephyrocharax* e *Corynopoma* (tribo Corinopomini) são grupo irmão de *Pseudocorynopoma* (tribo Hysterotini). O grupo mais basal no clado é composto por *Markianna nigripinnis* e *Bryconamericus emperador* (Figura 30). A inclusão de *M. nigripinnis* no clado A é uma nova hipótese. Embora esta espécie possua ii+9 raios na nadadeira dorsal, estado plesiomórfico de acordo com Malabarba e Weitzman (2003), caracteriza-se por possuir inseminação interna (Irani Quagio-Grassiotto, comunicação pessoal). Mirande (2009) não encontrou *Markianna* como membro do clado A, mas propôs uma relação de grupo irmão entre *M. nigripinnis* e *Bryconamericus scleroparius*. Apesar de apenas duas espécies de *Bryconamericus* tenham sido incluídas neste estudo, o gênero aparece como polifilético uma vez que *B. exodon*, espécie tipo do gênero, é hipoteticamente mais relacionado com *Odontostoechus* e *Hypobrycon* que a sua congênera

(Figura 30 ). O polifiletismo de *Bryconamericus* também foi obtido nas análises de Mirande (2009) e Javonillo et al. (2009), os resultados enfatizam a necessidade de uma reavaliação dos limites do gênero. Um clado monofilético formado por *Odontostoechus*, *Hypobrycon*, alguns *Bryconamericus* e *Cyanocharax* foi proposto por Javonillo et al. (2010), como observado nos resultados desse estudo. O grupo irmão destes gêneros na análise desse trabalho é o clado composto por *Piabina argentea* e *Piabarchus analis* (Figura 30). Este estudo é o primeiro a investigar as relações de *Piabarchus* e essa conclusão contraria a hipótese de uma relação de grupo irmão entre *Piabina* e *Creagrutus* proposta por Vari e Harold (2001) e Mirande (2009) baseada em caracteres morfológicos, mas não por Javonillo et al. (2010) em sua análise molecular.

Uma linhagem monofilética final desse clado é composto por *Knodus meridae* (espécie tipo do gênero), *Bryconadenos tanaothoros* e *Ceratobranchia* cf. *delotaenia* (Figura 30). A relação de grupos irmãos entre *Knodus* e *Bryconadenos* foi previamente sugerido por Weitzman et al. (2005) e corroborada por Javonillo et al. (2010).

Conforme já mencionado, Characiformes em geral, e dentro dessa ordem, Characidae, em particular, são assembléias especiosas e englobam um número de táxons muito distinto. Os resultados da presente análise envolve um grande número de espécies, incluindo de primeira mão representantes de todas as principais linhagens de Characiformes e no conjunto de dados, incluindo um grande número de genes com lenta a moderada taxas evolutivas fornecendo uma visão sobre as relações filogenéticas de um número de táxons anteriormente problemática, onde muitos gêneros previamente foram colocados como *incertae sedis* dentro de Characidae. Esses resultados demonstram que esta combinação de um grande número de táxons e grandes conjuntos de dados deve ser um método produtivo para investigações futuras das relações filogenéticas entre grandes grupos, como Characiformes. Apesar do presente estudo basear-se no maior conjunto de espécies incluídas em análise molecular para Characiformes, muitas outras espécies são necessárias para resolver não apenas muitas das questões observadas na discussão, mas também para continuar a elucidar as relações filogenéticas entre os Characiformes.

Futuramente, com o acréscimo de mais espécies a esse conjunto de dados, esse estudo poderá contribuir também com um outra questão muito discutida que envolve os Characiformes, que é sua distribuição biogeográfica.

Como já mencionado na introdução desse trabalho, não é possível uma hipótese biogeográfica confiável de Characiformes, devido sua história filogenética ainda ser mal resolvida, comparando com a enorme diversidade de formas viventes, principalmente na região Neotropical o seu registro fóssil é insuficiente (Malabarba e Malabarba, 2010). No entanto, recentes avanços técnicos em sistemática molecular e novos achados fósseis têm aberto um debate sobre o relacionamento e a história biogeográfica dos Characiformes (Malabarba e Malabarba, 2010).

Os Characiformes modernos tem sua distribuição restrita à África e Américas, com uma espécie atingindo o norte do Texas (Malabarba e Malabarba, 2010).

A distribuição recente de Characiformes tem sido explicada de duas formas: (1) Briggs (1979, 2005), sugeriu a distribuição e diversidade de todos os Otophysi baseado em teorias de centros de origem e dispersão; (2) todos os outros autores, tem baseado suas hipóteses em teorias de vicariância, associando-as a diferentes cenários, para explicar a desigual diversidade entre Characiformes africanos e americanos (Malabarba e Malabarba, 2010).

Segundo Lundberg (1993), citado por Malabarba e Malabarba, 2010, o modelo de vicariância implica em um cenário em que vários subgrupos de Characiformes neotropicais estavam representados antes da divisão continental na África, onde estariam agora extintas.

A presença de três clados irmãos entre a América do Sul e África, entre characiformes, é sugestivo de múltiplos eventos vicariantes associados com o rompimento da Gondwana. Maisey (2000), citado por Malabarba e Malabarba, 2010, fornece evidências de que a separação da Gondwana não pode ser considerada como um único evento, mas sim uma série de eventos.

Alguns autores sugeriram ainda a ocorrência de dispersão marinha. A dispersão marinha de Characiformes tem ocasionalmente sido usada para explicar a distribuição de Characiformes nos dias de hoje (Malabarba e Malabarba, 2010). Baseada em possíveis fósseis marinhos, por exemplo, Gayet (1982), citado por Malabarba e Malabarba, 2010, propôs uma origem

---

marinha de Characiformes e Cypriniformes basais e um indireto modelo de dispersão marinha. As idéias de Gayet foram baseadas na descrição de três possíveis fósseis marinhos de Characiformes († *Lusitanichthys characiformis*, † *Salminops ibericus*, † *Ramallichthys orientalis*) e um suposto fóssil de cypriniformes de água doce da América do Sul (Malabarba e Malabarba, 2010).

Segundo Calcagnotto et al. (2005), a dispersão marinha no início da história de Characiformes não pode ser descartada simplesmente porque membros sobreviventes do clado são no presente, intolerantes a água salgada (Sparks e Smith, 2005), citado por Calcagnotto et. al., 2005. Além disso, é possível que certos fósseis de Otophysi tenham sido marinhos (Patterson, 1984), citado por Calcagnotto et al., 2005 ou ocorreram em águas salobras (Filleul e Maisey, 2004) (Calcagnotto et. al., 2005).

A origem marinha ou a dispersão marinha e a massiva extinção de Characiformes na África não são consideradas hipóteses bem suportadas (Malabarba e Malabarba, 2010). Todos os registros fósseis de Characiformes vêm de sedimentos de água doce e táxons fósseis marinhos anteriormente atribuídos a Characiformes são melhores identificados como linhagens de Otophysi em vez de linhagens de Characiformes (Malabarba e Malabarba, 2010). Characiformes existentes são exclusivamente peixes de água doce, como são os representantes das ordens Cypriniformes e Gymnotiformes (Malabarba e Malabarba, 2010). Algumas famílias de Siluriformes possuem representantes marinhos ou de águas salobras, mas estes representam adaptações secundárias e independente para água salgada (Malabarba e Malabarba, 2010). Não há provas na história filogenética dos Otophysi para se considerar um ancestral marinho ou Characiformes tolerantes a ambientes marinhos (Malabarba e Malabarba, 2010). Malabarba e Malabarba (2010) consideram que a ausência de algumas linhagens e menor diversidade de Characiformes na África pode ser resultado de vicariância juntamente com endemismo de antigas linhagens de Characiformes na Gondwana.

Lundberg (1993), citado por Malabarba e Malabarba, 2010, analisando a hipótese filogenética de Buckup (1991), no contexto biogeográfico, também chegou a conclusão que os principais grupos de Characiformes tinham se originado antes do evento de vicariância África-América do Sul. Assumindo esse evento de vicariância para explicar a presente distribuição biogeográfica

dos Characiformes, e não uma dispersão deles pelo Oceano Atlântico, acredita-se em uma alta taxa de extinção entre os Characiformes africanos (Lundberg, 1993).

Duas hipóteses alternativas também poderiam ser possíveis, uma delas a extinção de linhagens de Characiformes na África, poderia ser resultado de competição com outros grupos de peixes que invadiram o continente depois da ruptura da Gondwana. Por exemplo, *knerids*, *notopterids*, *mormyriformes* e Cypriniformes, são peixes de água doce presentes na África mas não na América do Sul (Orti e Meyer, 1997).

Outro cenário alternativo assume que membros de um clado ou uma única espécie que mais tarde deu origem ao clado, poderia ter sido restrito a uma pequena parte da Gondwana e ter sido separada quando o continente se separou (Orti e Meyer, 1997). Essa hipótese reduziria o número necessário de eventos de extinção de linhagens de Characiformes necessárias para explicar a moderna distribuição geográfica (Orti e Meyer, 1997).

Como colocado acima, uma filogenia com maior resolução é ainda necessária para um melhor entendimento sobre a origem dos Characiformes em geral e de seus grupos constituintes, em particular.

**CONCLUSÃO**

---

---

## 6. CONCLUSÃO

O monofilatismo de Characiformes foi confirmado no presente estudo.

As subfamílias atualmente reconhecidas em Characidae (*sensu* Reis et al., 2003), não formam um grupo monofilético, em nenhuma das filogenias geradas (máxima verossimilhança, máxima parcimônia e análise Bayesiana). Por outro lado, Characidae, como sugerido por Malabarba e Weitzman (2003) é monofilético, após a exclusão de Iguanodectinae.

Characidae *sensu* Malabarba e Weitzman (2003), com a exclusão de Iguanodectinae, tem *Spintherobolus* como grupo irmão de quatro grandes linhagens monofiléticas, reconhecidas em todas as análises efetuadas.

Cynodontidae não é um grupo monofilético uma vez que as subfamílias Cynodontinae e Roestinae aparecem em locais distantes nas árvores finais obtidas no presente estudo.

Serrasalminae é monofilético, mas aparece mais relacionada a Hemiodontidae e outras famílias de Characiformes neotropicais do que a Characidae.

*Chalceus* aparece como um grupo monofilético não relacionado a Alestidae, mas sim como grupo irmão de um grande conjunto de táxons neotropicais.

Acestrorhynchidae aparece mais relacionado a Roestinae e Heterocharacinae (*sensu* Miranda, 2009).

Iguanodectinae é monofilético e relacionado a *Bryconops*.

Foi identificado um grupo monofilético formado pelos gêneros *Agoniates*, *Clupeacharax*, *Triportheus*, *Engraulisoma* e *Lignobrycon*.

A subfamília Characinae não é monofilética uma vez que alguns gêneros são mais relacionados à Acestrorhynchidae e Roestinae.

A subfamília Cheirodontinae não é monofilética uma vez que *Spintherobolus* aparece como grupo irmão de um grande clado reconhecido como Characidae.

A subfamília Stethaprioninae é monofilética, mas as relações entre os gêneros é diferente da proposta por Reis (1989).

Vários gêneros de Characidae aparecem como polifiléticos, sendo necessários estudos adicionais, com maior número de táxons, para se tentar caracterizar a monofilia destes grupos.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akaike, H. 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. Pages 267-281 in Second international symposium on information theory (P. N. Petrov and F. Csaki, eds.). Akad. Kiado, Budapest.
- Armbruster, J.W. 2004. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society* 141:1–80.
- Briggs, J. C. (1979): Ostariophysan zoogeography: an alternative hypothesis. – *Copeia* 1979: 111-118. – (2003): Fishes and birds: Gondwana life rafts reconsidered. – *Syst. Biol.* 52: 548-553. – (2005): The biogeography of otophysan fishes (Ostariophysi: Otophysi): a new appraisal. – *J. Biogeogr.* 32: 287-294.
- 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: Ostariophysi). Pp. 123-144. In: Malabarba, L.R.; R.E. Reis; R.P. Vari; Z.M. Lucena & C.A. Lucena. (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Edipucrs, 603 pp.
- Buckup, P.A. 2007. Triportheinae. pp. 43-44. In: Buckup, P.A.; Menezes, N.A.; Ghazzi, M.S. *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Rio de Janeiro, Museu Nacional. 195p.
- 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.

## Referências bibliográficas

---

- Castro, R. M. C., A. C. Ribeiro, R. C. Benine & A. L. A. Melo. 2003. *Lophiobrycon weitzmani*, a new genus and species of glandulocaudine fish (Characiformes: Characidae) from the rio Grande drainage, upper rio Paraná system, southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 1(1): 11-19.
- Castro, R.M.C., Vari, R.P., Vieira, F, Oliveira, C. (2004). A phylogenetic analysis and redescription of the genus *Henochilus* (Characiformes, Characidae). *Copeia*, 4: 496-506.
- 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.
- de Pinna, M.C. (1998). Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. In: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S., eds). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, pp. 279-330.
- Edgar RC. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput *Nucleic Acids Research*, 32: 1792-1797.
- Eschmeyer, W.N., Fong, J.D. 2010. Species of Fishes by family/subfamily. Online version dated 01/05/2010. <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>.
- Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Fink, S.V., Fink, W.L. (1981). Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). *Zool. J. Linn. Soc., London*, 72: 297-353.

## Referências bibliográficas

---

- Filleul, A., Maisey, J.G. 2004. Redescription of *Santanichthys diasii* (Otophysi, Characiformes) from the Albian of the Santana Formation and comments on its implications for otophysan relationships. *Am. Mus. Novitates* 3455, 1–21.
- Géry, J. 1977. *Characoids of the World*. TFH Publications, Neptune City, NJ.
- Hall, T.A. 1999. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Javonillo, R., Malabarba, L.R., Weitzman, S.H., Burns, J.R. 2010. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 498–511.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 6196–6200.
- Lanave, C., Preparata, C. Saccone and G. Serio. 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *J. Mol. Evol.* 20:86-93.
- Langeani, F. 1998. Phylogenetic study of the Hemiodontidae (Ostariophysi: Characiformes). In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S. (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp. 145–160.
- Li, C., Ortí, G. Zhang, and G. Lu. 2007. A practical approach to phylogenomics: The phylogeny of ray-finned fish (Actinopterygii) as a case study. *BMC Evol. Biol.* 7:44.

## Referências bibliográficas

---

- Li, C., Ortí, G. 2007. Molecular phylogeny of Clupeiformes (Actinopterygii) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 386–398.
- Lima, F.C.T., Malabarba, L.R., Buckup, P.A., da Silva, J.F.P., Vari, R.P., Harold, A., Benine, R., Oyakawa, O.T., Pavanelli, C.S., Menezes, N.A., Lucena, C.A.S., Malabarba, M.C.S.L., Lucena, Z.M.S., Reis, R.E., Langeani, F., Cassati, L., Bertaco, V.A., Moreira, C., Lucinda, P.H.F. 2003b. Genera *incertae sedis* in Characidae. In: Reis, R.E., Kullander, S.E., Ferraris, C.J., Jr. (Eds.), *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil, pp. 106–169.
- Lovejoy, N.R., Collete, B.B. 2001. Phylogenetic relationships of new world needlefishes (Teleostei: Belontiidae) and the biogeography of transitions between marine and freshwater habitats. *Copeia*.2001.2.324-338.
- 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.S.A., Menezes, N.A. 1998. A phylogenetic analysis of *Roestes Günther* and *Gilbertolus Eigenmann*, with a hypothesis on the relationships of the Cynodontidae and Acestrorhynchidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S. (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp. 261–278.
- Lucena, C.S.A., Menezes, N.A. 2003. Subfamily Characinae (Characins, tetras). In: Reis, R.E., Kullander, S.E., Ferraris, C.J., Jr. (Eds.), *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil, pp.200-208.

## Referências bibliográficas

---

- Machado-Allison, A. 1983. Estudios sobre la sistemática de la subfamilia serralsaminae (Teleostei: Characidae). Parte II. Discussion sobre la condición monofilética de la subfamilia. *Acta Biol. Venez.* 11 (4), 145–195.
- Malabarba, L.R. 1998a. Monophyly of the Cheirodontinae, characters and major clades. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S. (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp. 193–234.
- Malabarba, M. C. S. L. 1998b. Phylogeny of fossil Characiformes and paleobiogeography of the Tremembé Formation, São Paulo, Brazil. Pp: 69–84. In: *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds.). Porto Alegre, Edipucrs, 603p.
- Malabarba, L.R., Weitzman, S.H. 2003. Description of a new genus with six species from Southern Brazil, Uruguay and Argentina with discussion of a putative characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Comun. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS Sér. Zool. Porto Alegre.* 16 (1), 67–151.
- Malabarba, C., Malabarba, L. R. 2010. Biogeography of Characiformes: an evaluation of the available information of fossil and extant taxa. Pp. 317–336. In: *Origin and Phylogenetic Interrelationships of Teleosts*. Nelson, J. S., Schultze H. P., Wilson, M. V. H. (Eds.). Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, Germany.
- Menezes, N.A., Weitzman, S.H. 2009. Systematics of the Neotropical subfamily Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Neotrop. Ichthyol.* 7, 295–370.
- Mirande, J.M. 2009. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). *Cladistics* 25: 1–40.

## Referências bibliográficas

---

- Mirande, J.M. 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology*, 8: 385-568.
- Nelson, J.S. 2006. *Fishes of the World*. 4rd ed., John Wiley & Sons Inc., N.Y., 601 pp.
- Orti, G. Petry, P. Porto, J. I. R. Jégu, M. Meyer, A. (1996). Patterns of Nucleotide Change in Mitochondrial Ribosomal RNA Genes and the Phylogeny of Piranhas. *J Mol Evol* 42:169–182.
- 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.
- Ortí, G., Meyer, A. 1997. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Syst. Biol.* 46, 75–100.
- 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.
- Ortí G, Sivasundar A, Dietz K, Jégu M. (2008) Phylogeny of the Serrasalminidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1Suppl): 343-351.
- Peng Z., He S., Wang J., Wang, W. & Diogo, R. (2006): Mitochondrial molecular clocks and the origin of the major otocephalan clades (Pisces: Teleostei): a new insight. – *Gene* 370: 113-124.

## Referências bibliográficas

---

- Perdices, A., Bermingham, E., Montilla, A., Doadrio, I. 2002. Evolutionary history of the genus *Rhamdia*(Teleostei: Pimelodidae) in Central America. *Mol. Phylogenet. Evol.* 25, 172–189.
- Posada D, Crandall KA. (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Pough, F. H., Janis, C. M., Heiser, J. B. 2008. *A Vida dos Vertebrados*. Editora Atheneu, São Paulo, 684 pp.
- Rodriquez, R., J. L. Oliver, A. Marin and J. R. Medina. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Bio.* 142:485-501.
- Reis, R.E. 1989. Systematic revision of the Neotropical characid subfamily Stethaprioninae (Pisces, Characiformes). *Comun. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS, Sér. Zool.* 2: 3–86.
- Reis, R.E. 2003. Subfamily Tetragonopterinae. In: Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C.J. Jr (Eds.), *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil, 212 p.
- Reis, R.E.; Kullander, S.O. & Ferraris, C. (Eds.). 2003. *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA)*, EDIPUCRS, Porto Alegre, 729 pp.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688-2690.
- Stamatakis, A., Hoover, P. & Rougemont, J. (2008). A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic Biology* 57, 758-771.



## Referências bibliográficas

---

- Swofford, D. L. 2003. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K. and M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 10:512-526.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Toledo-Piza, M. 2000. The Neotropical Wsh subfamily Cynodontinae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic study and a revision of Cynodon and Rhabiodon. *Am. Mus. Novitates*, 3286.
- Vari, R.P. 1979. Anatomy, relationships and classification of the families Citharinidae and Distichodontidae (Pisces: Caracoidei). *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. Zool.* 36 (5), 261–344.
- Vari, R.P. 1983. Phylogenetic relationships of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae, and Chilodontidae (Pisces: Characiformes). *Smithsonian. Contrib. Zool.*, 378.
- Vari, R.P. 1995. The Neotropical fish family Ctenoluciidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): supra and intrafamilial phylogenetic relationships, with a revisionary study. *Smithsonian Contrib. Zool.* 564, 1–97.
- 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.

## Referências bibliográficas

---

- Vari, R.P., Harold, A.S. 2001. Phylogenetic study of the Neotropical fish genera *Creagrutus* Günther and *Piabina* Reinhardt (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), with a revision of the cis-Andean species. *Smith. Contr. Zool.* 613, 1–239.
- 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., 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., Menezes, N.A. 1998. Relationships of the tribes and genera of the Glandulocaudinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) with a description of a new genus, *Chrysobrycon*. Pp. 171-192. In: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Edipucrs, 603p.
- 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.

## Referências bibliográficas

---

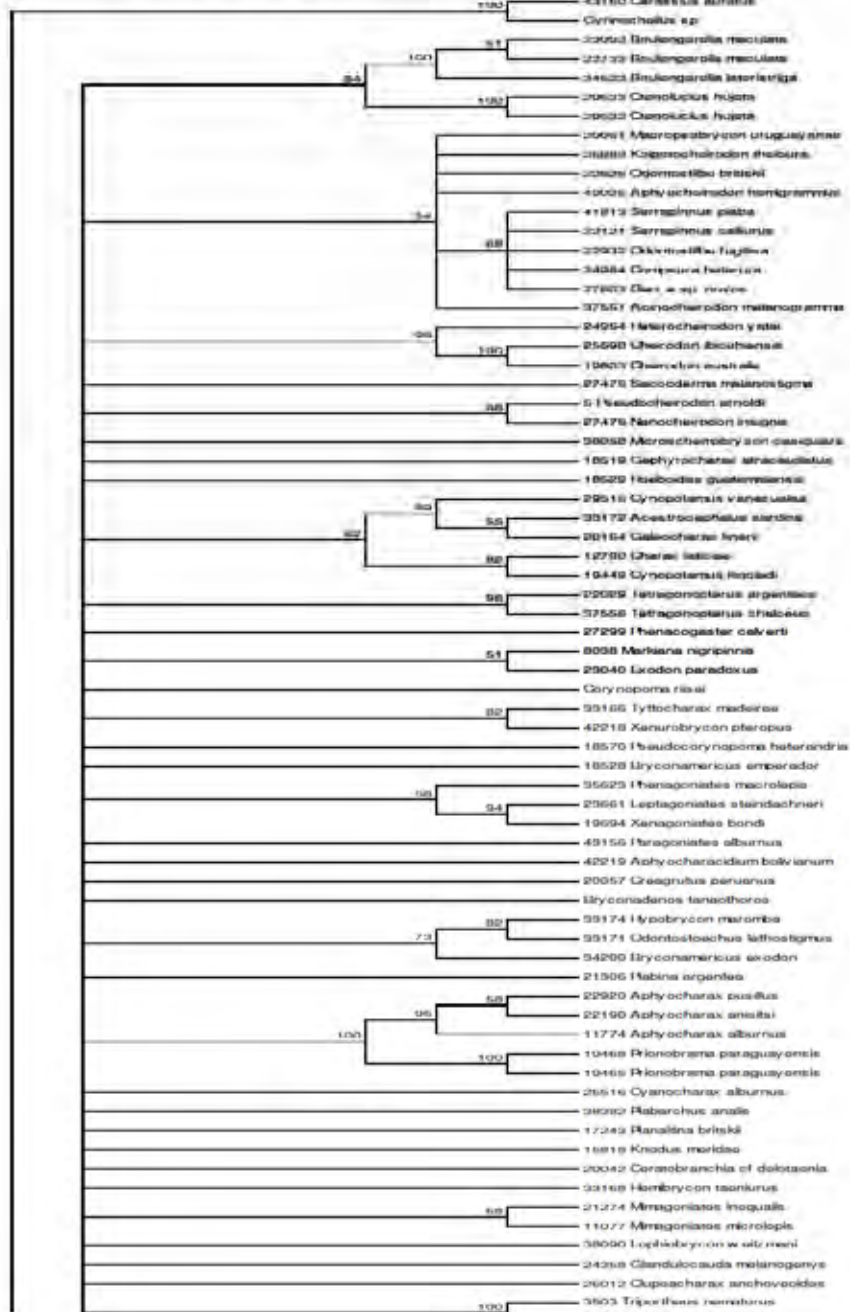
- Weitzman, S.H., Menezes, NA., Evers H.-G., Burns, J.R. (2005). Putative relationships among inseminating and externally fertilizing characids, with a description of a new genus and species of Brazilian inseminating fish bearing an anal-fin gland in males (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 3(3):329-360.
- 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* Müller & Troschel. Tese de Doutorado, Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da USP, 358 pp.
- Zanata, A.M., Vari, R.P. 2005. The family Alestidae (Ostariophysi, Characiformes): a phylogenetic analysis of a trans-Atlantic clade. *Zool. J. Linn. Soc.* 145, 1–144.
- Zharkikh A. (1994) Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. *J Mol Evol* 39, 315-329.

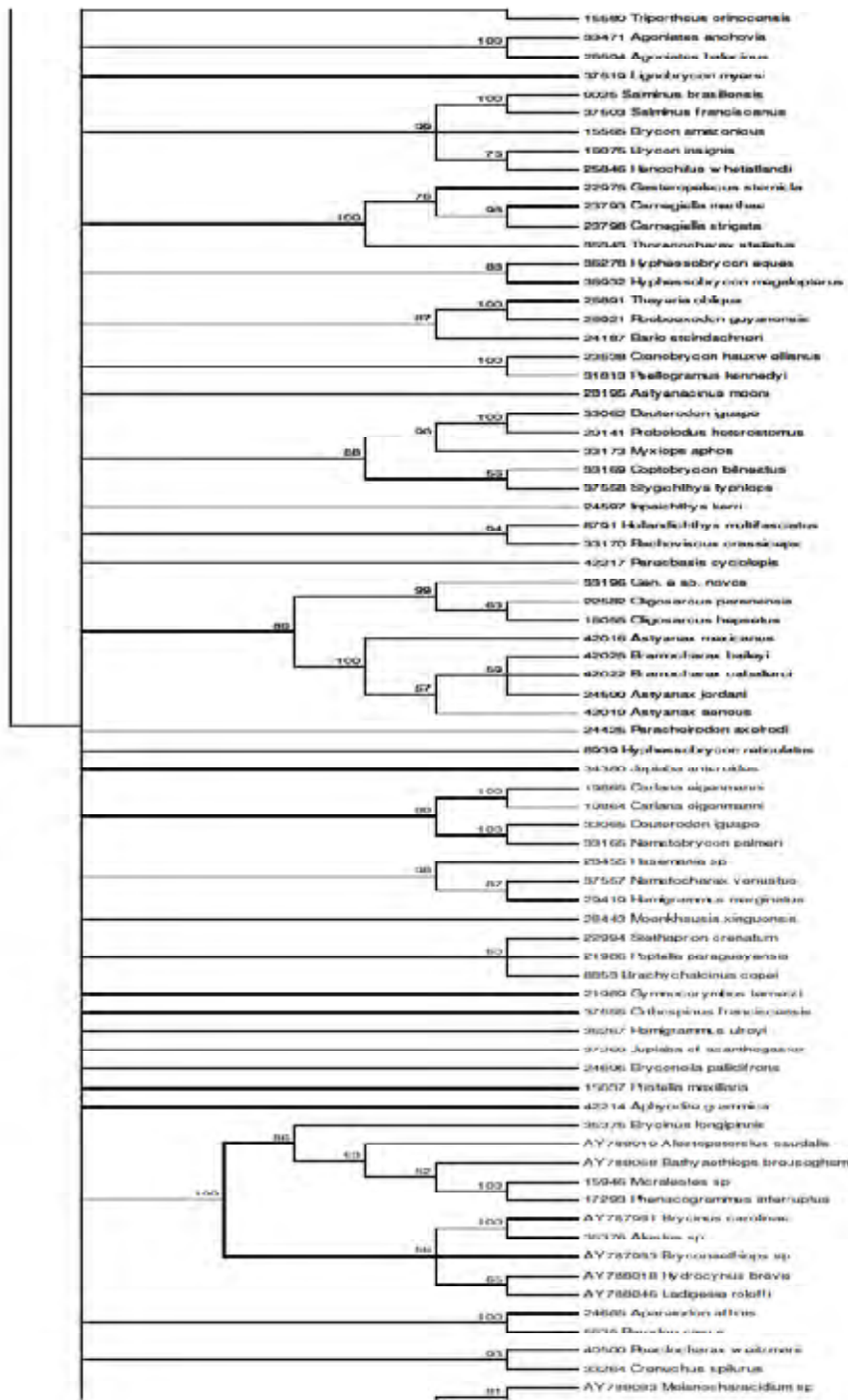
**ANEXO**

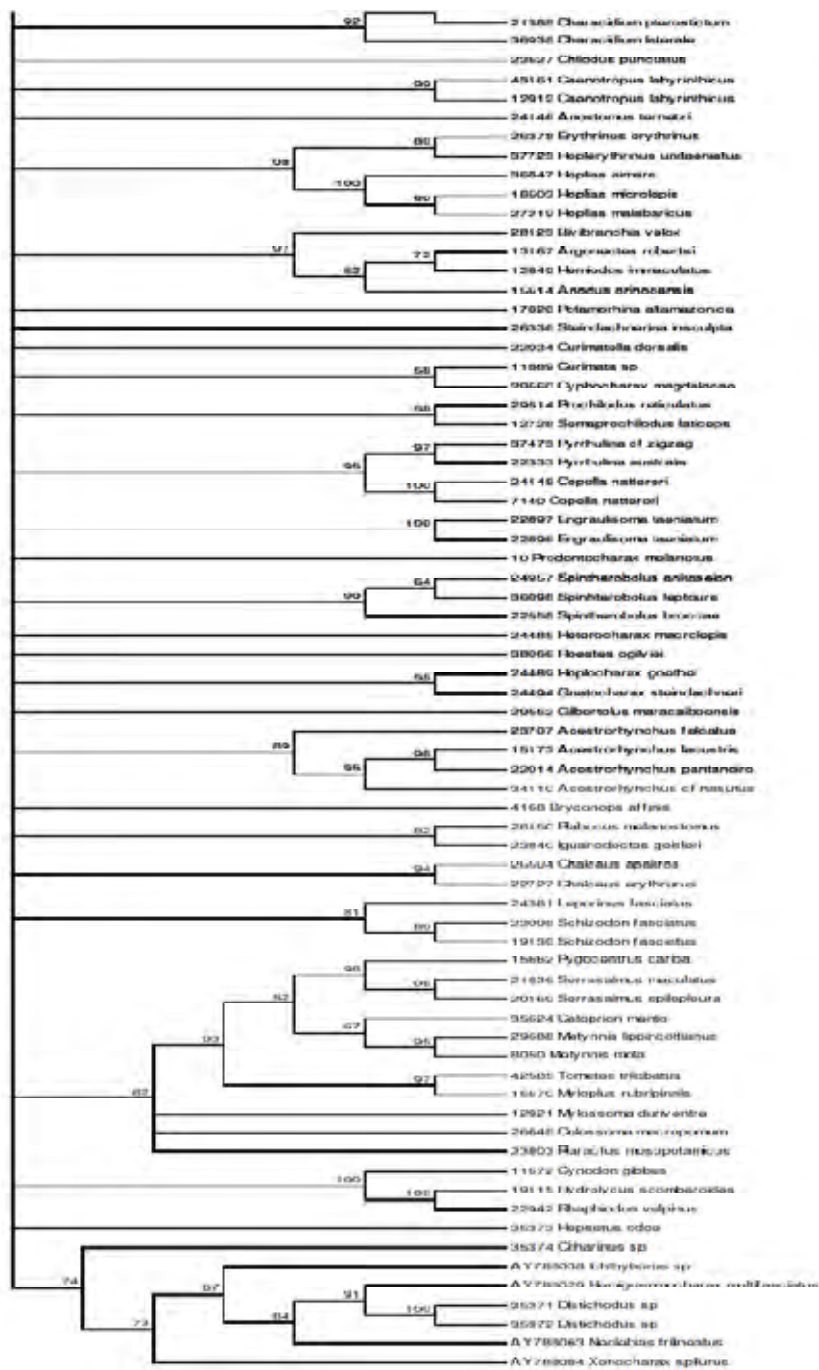
---

---

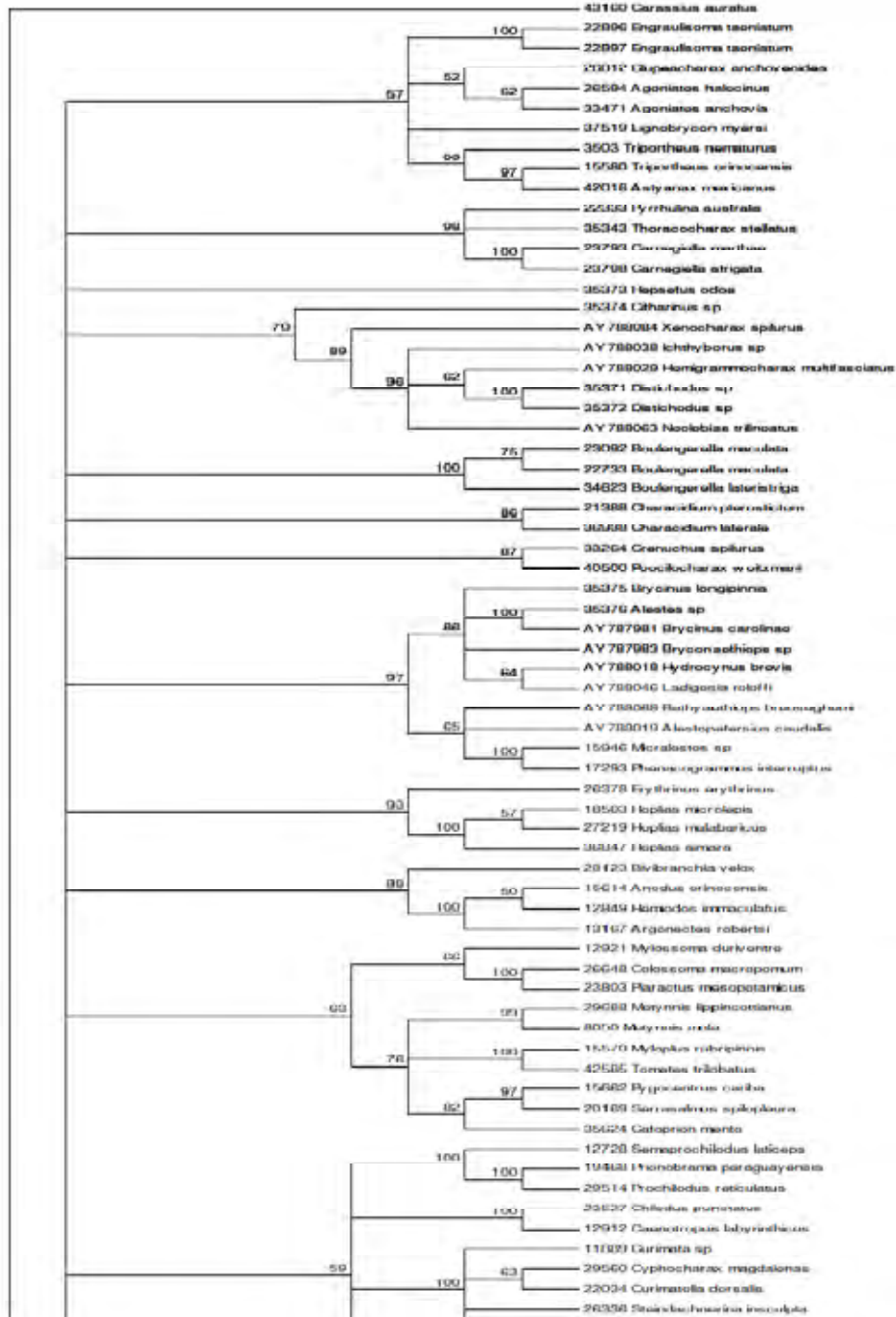
Anexo 1. Árvore de consenso por maioria para o gene 16S construída com o método de ML.  
Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 100 pseudoréplicas.



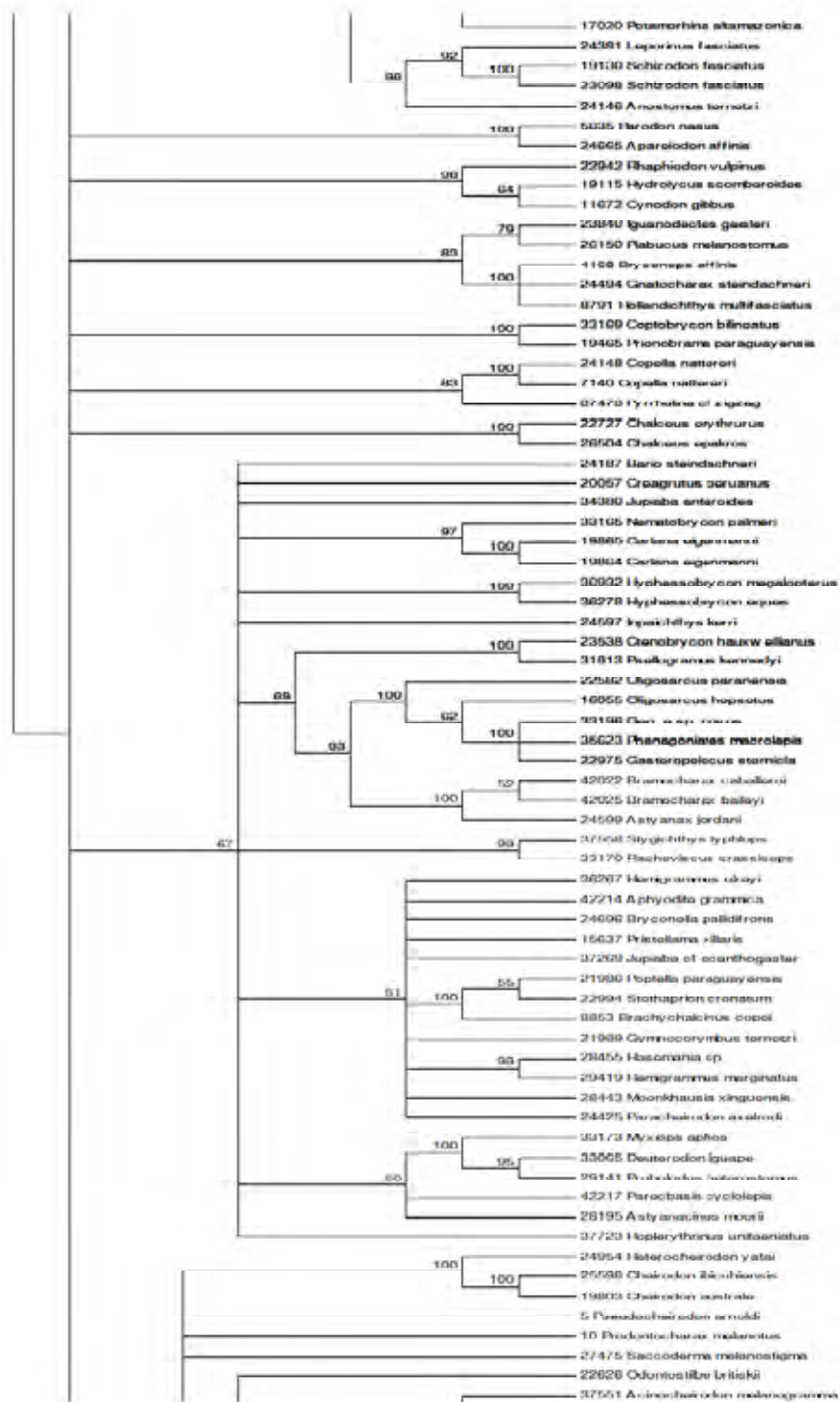


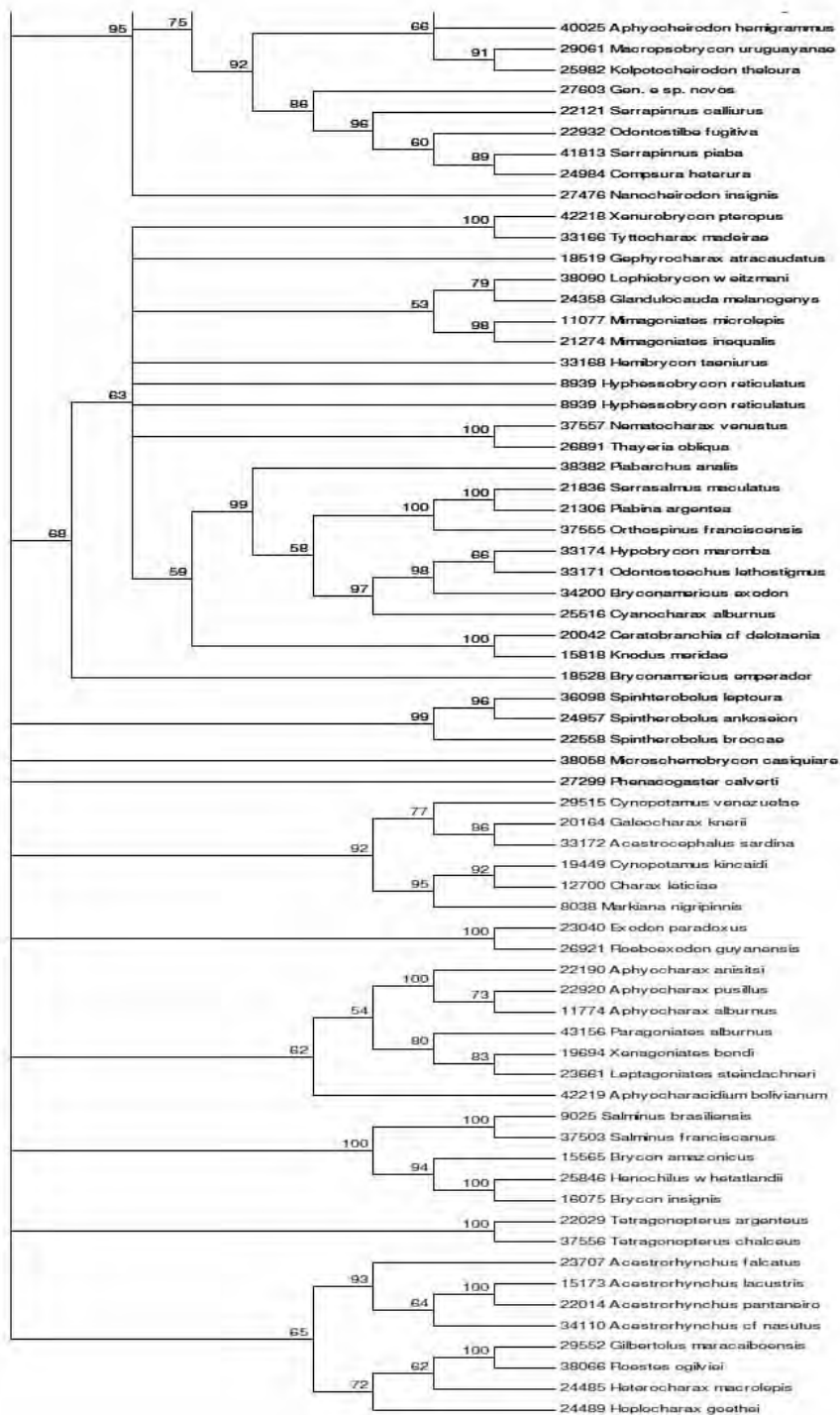


Anexo 2. Árvore de consenso por maioria para o gene *Cytb* construída com o método de ML. Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 100 pseudoréplicas.

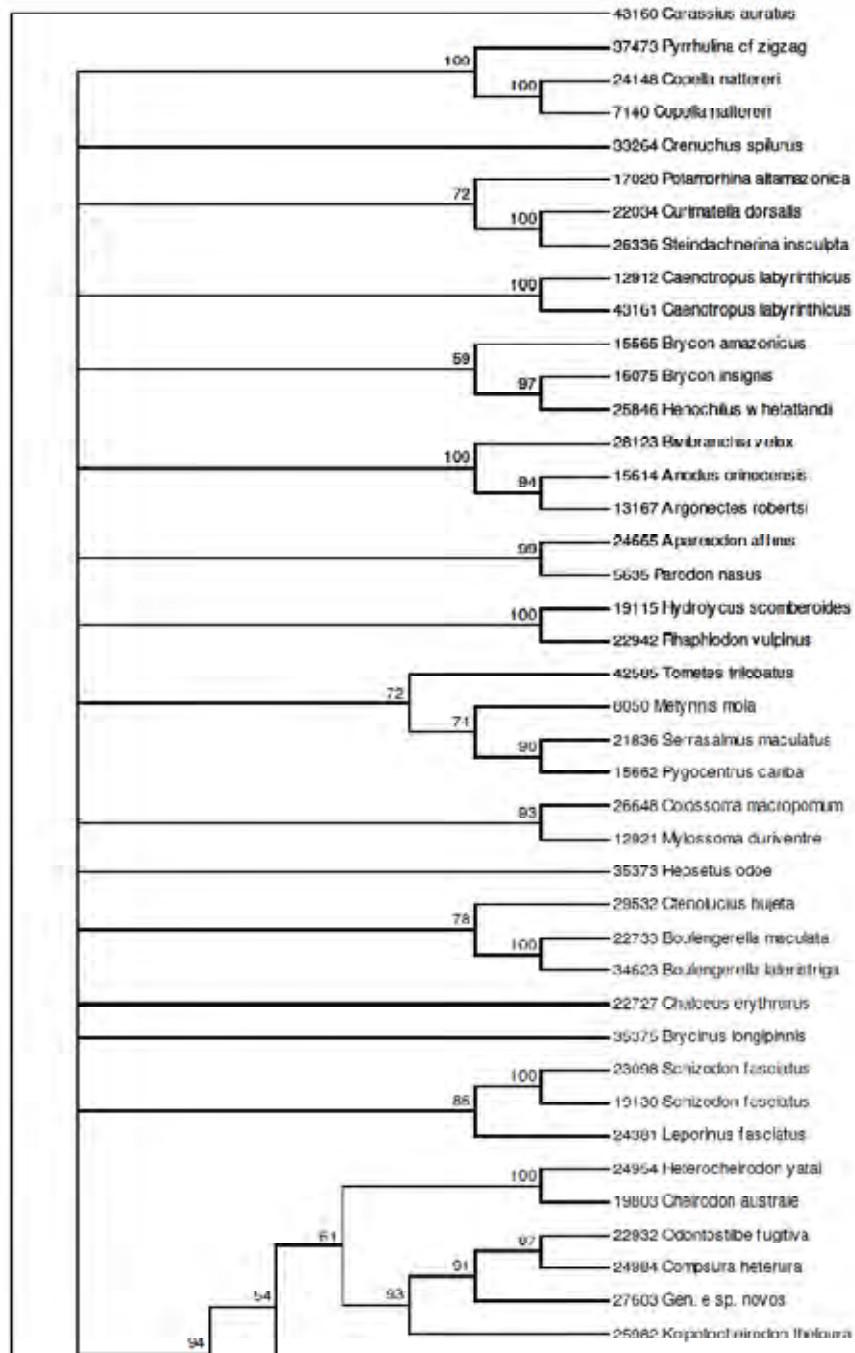


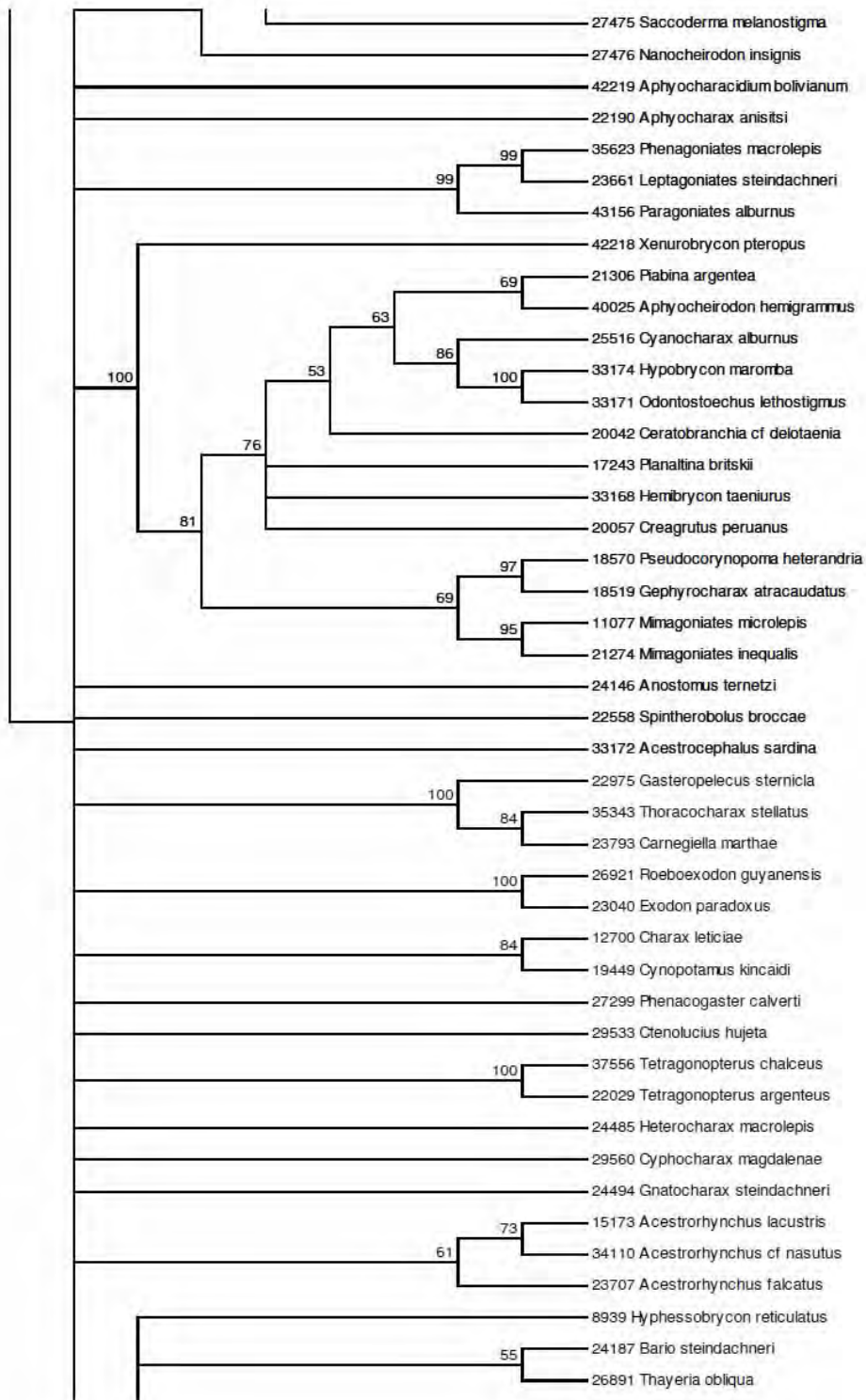


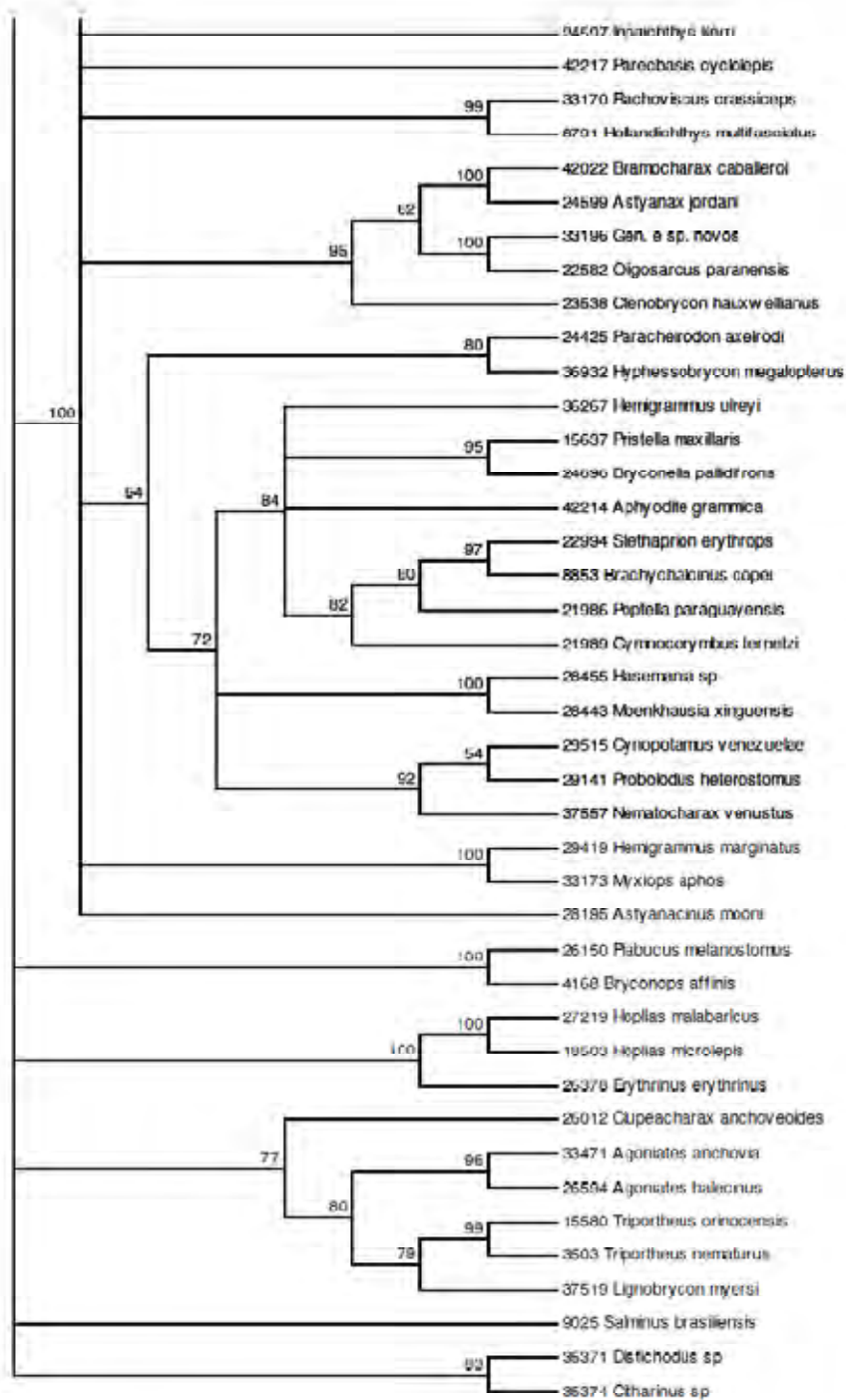




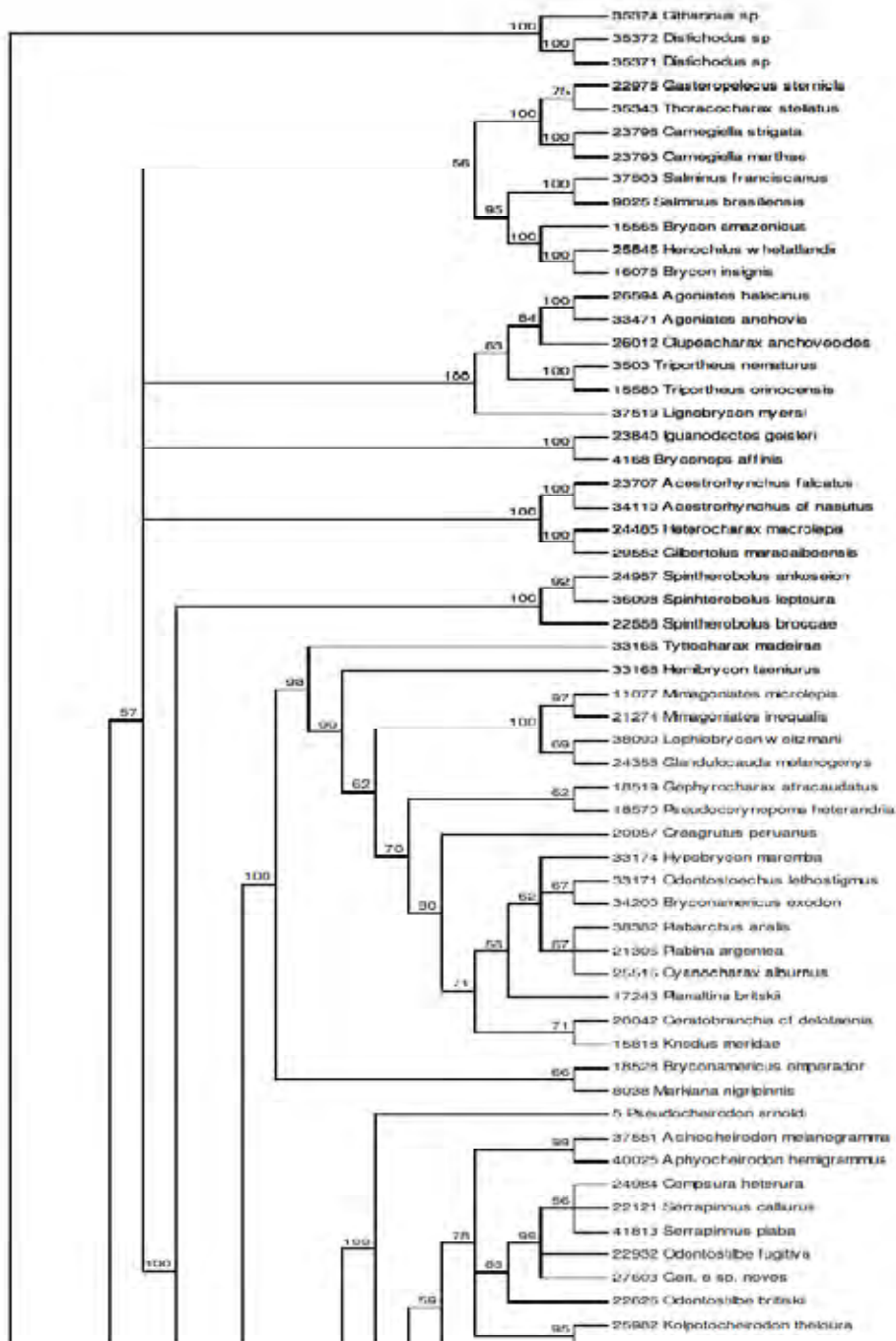
Anexo 3. Árvore de consenso por maioria para o gene ATPase 8/6 construída com o método de ML. Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 100 pseudoréplicas.

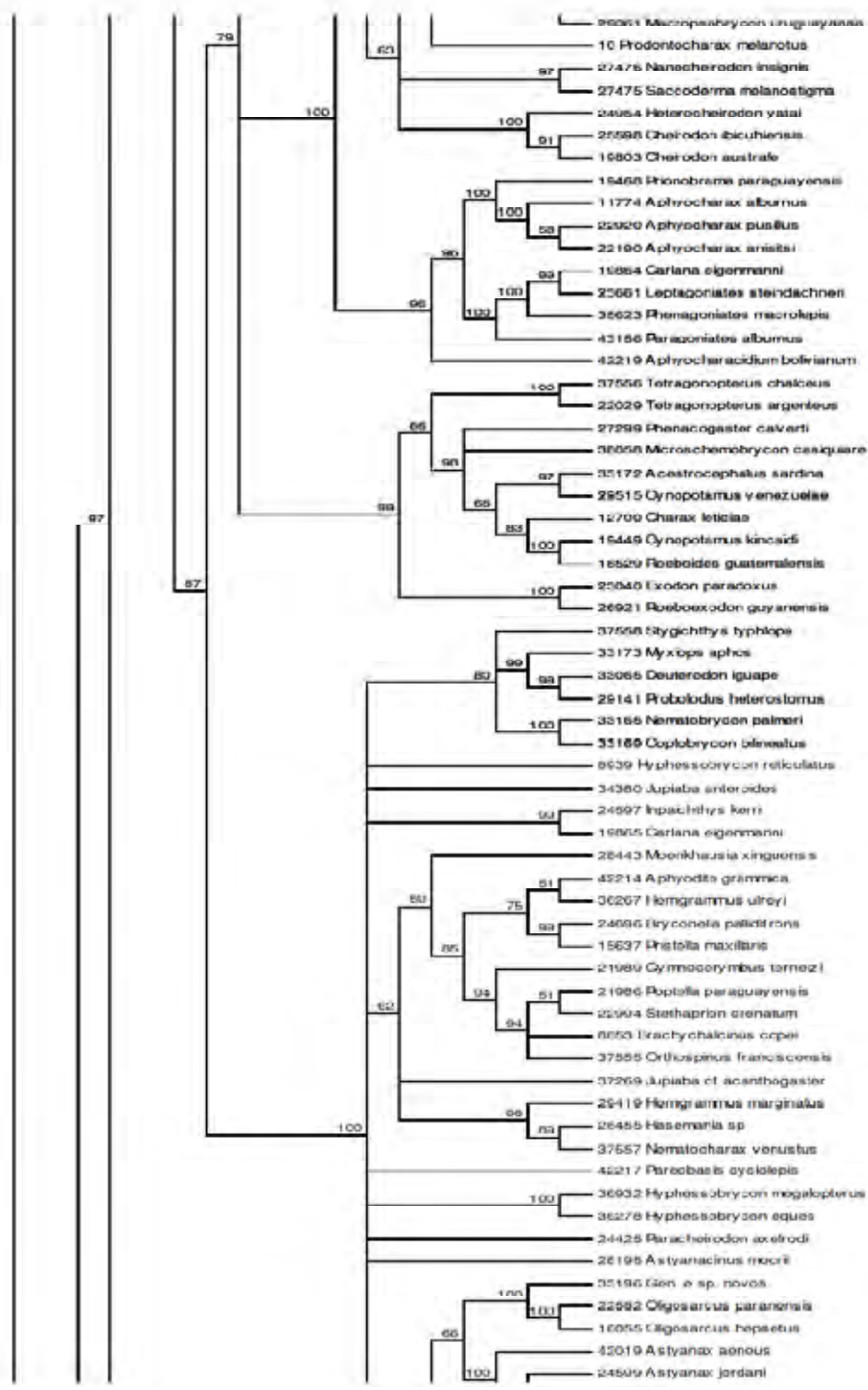


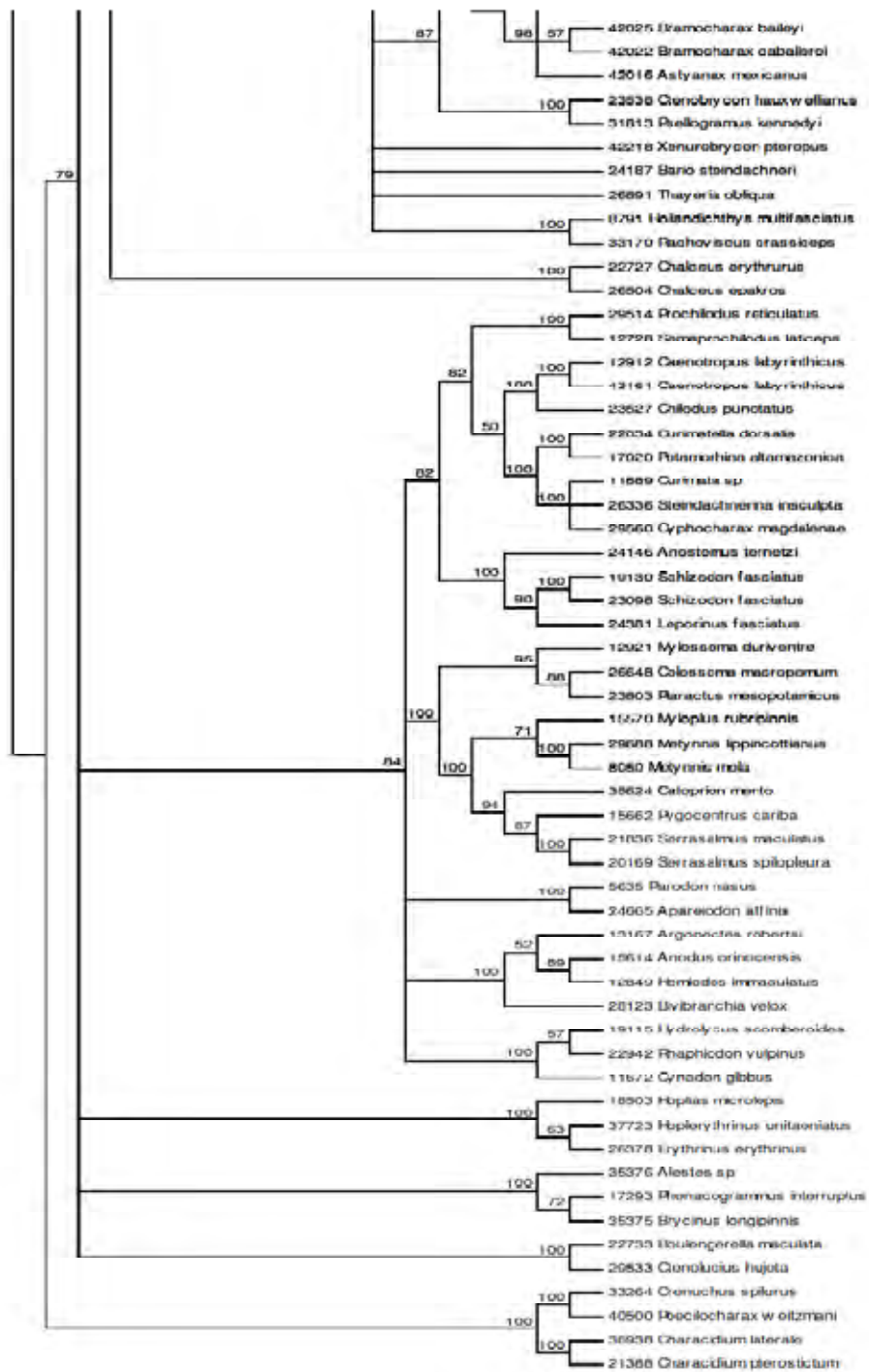




Anexo 4. Árvore de consenso por maioria para o gene Rag1 construída com o método de ML. Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 100 pseudoréplicas.

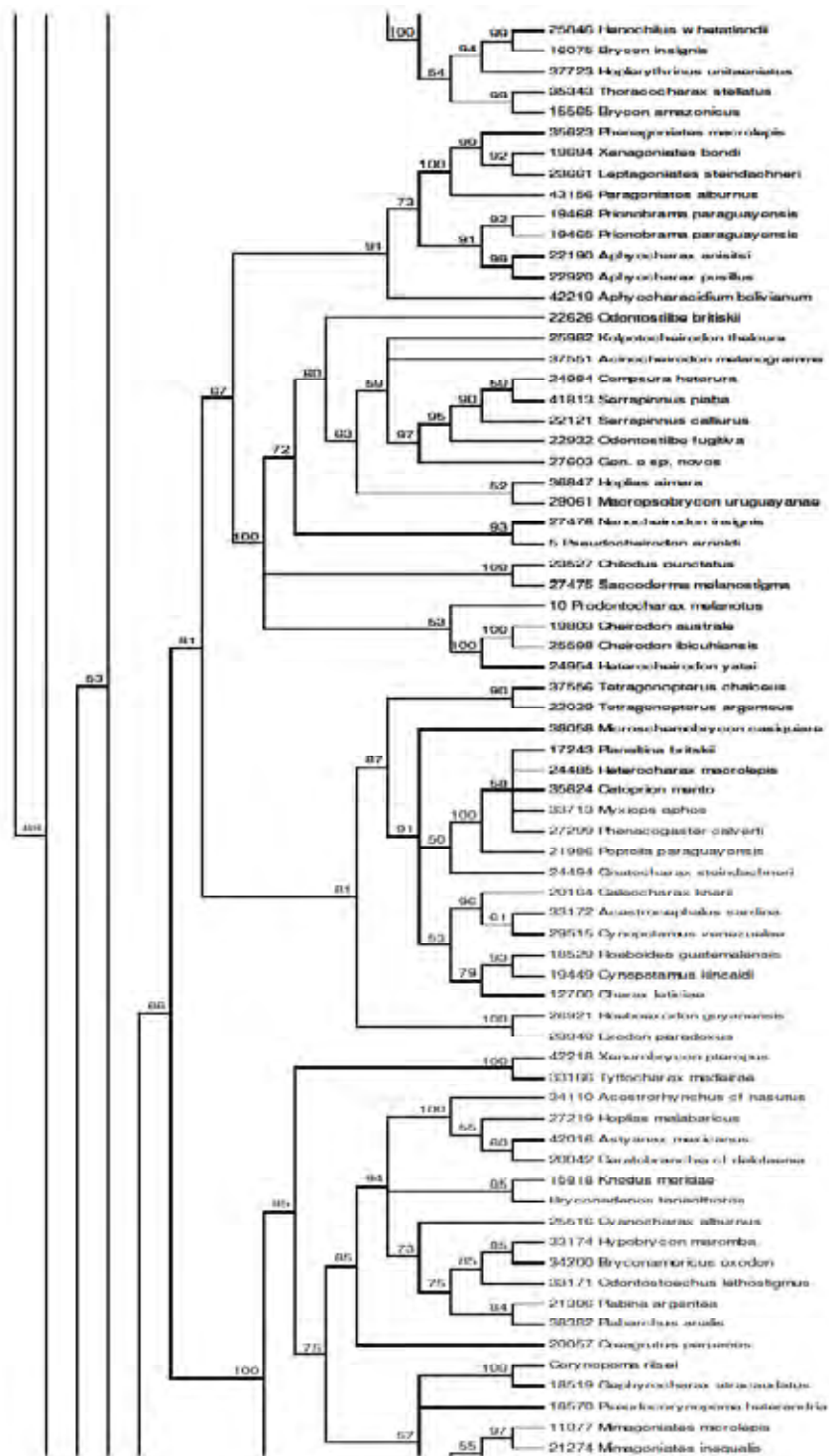


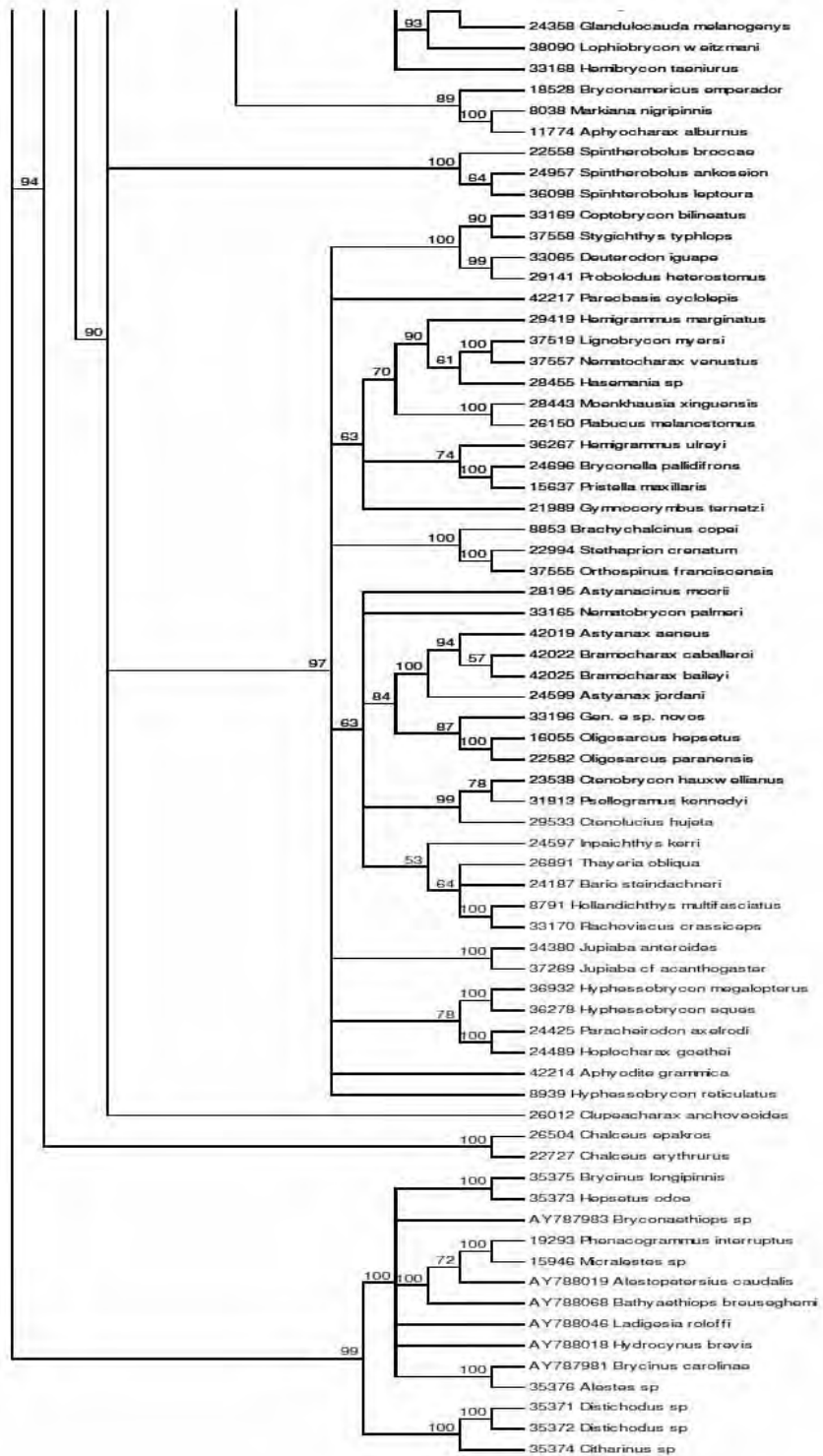




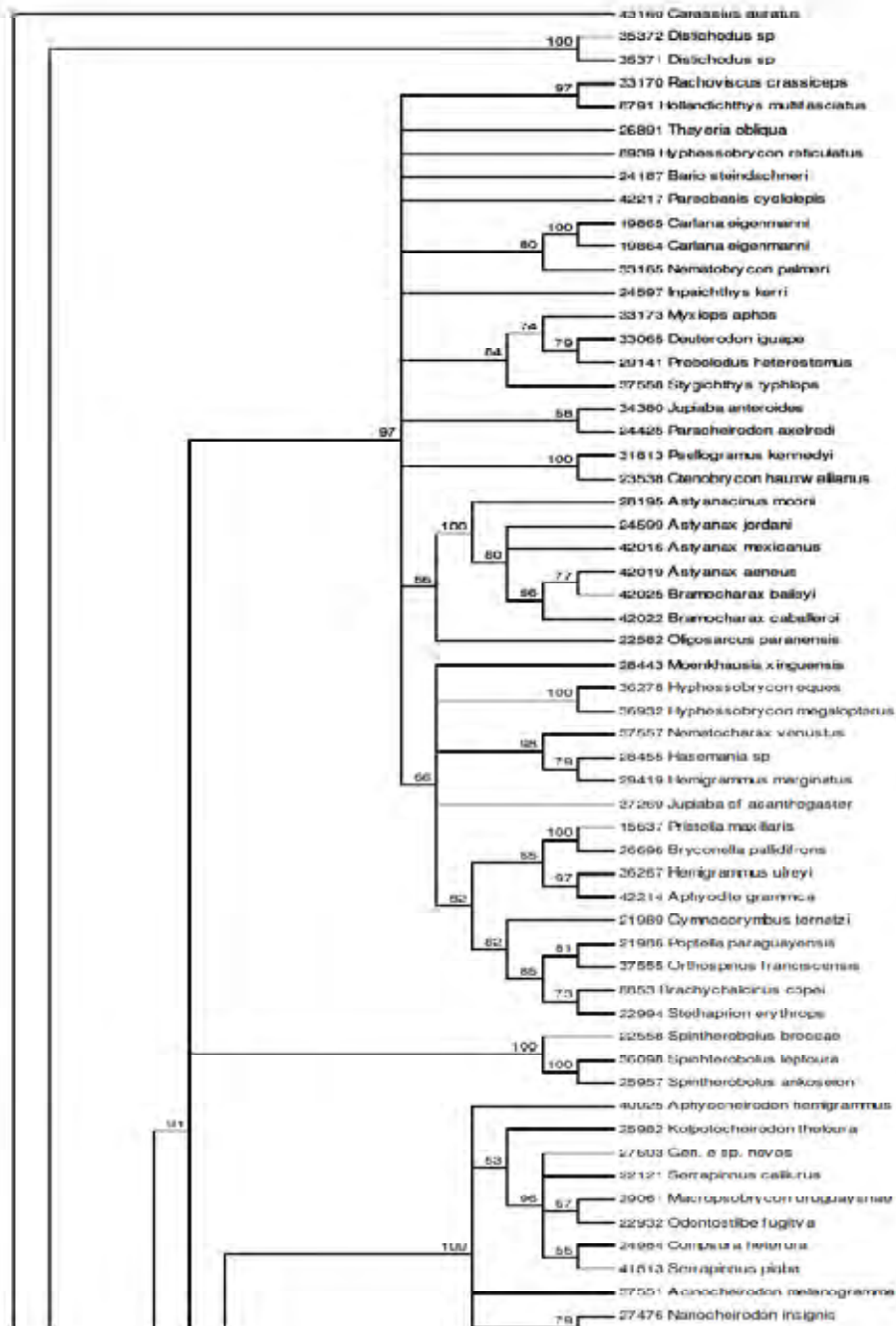


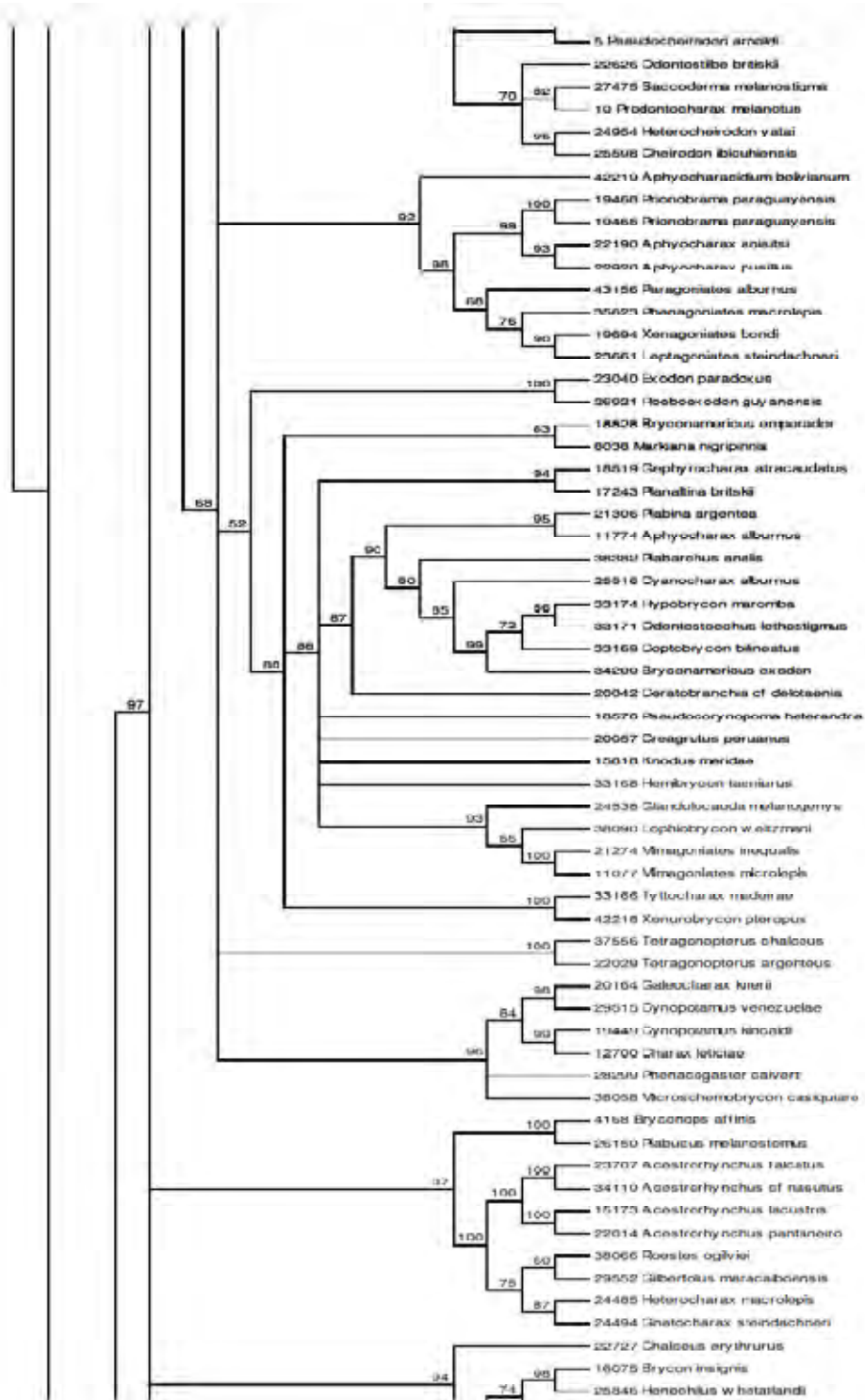


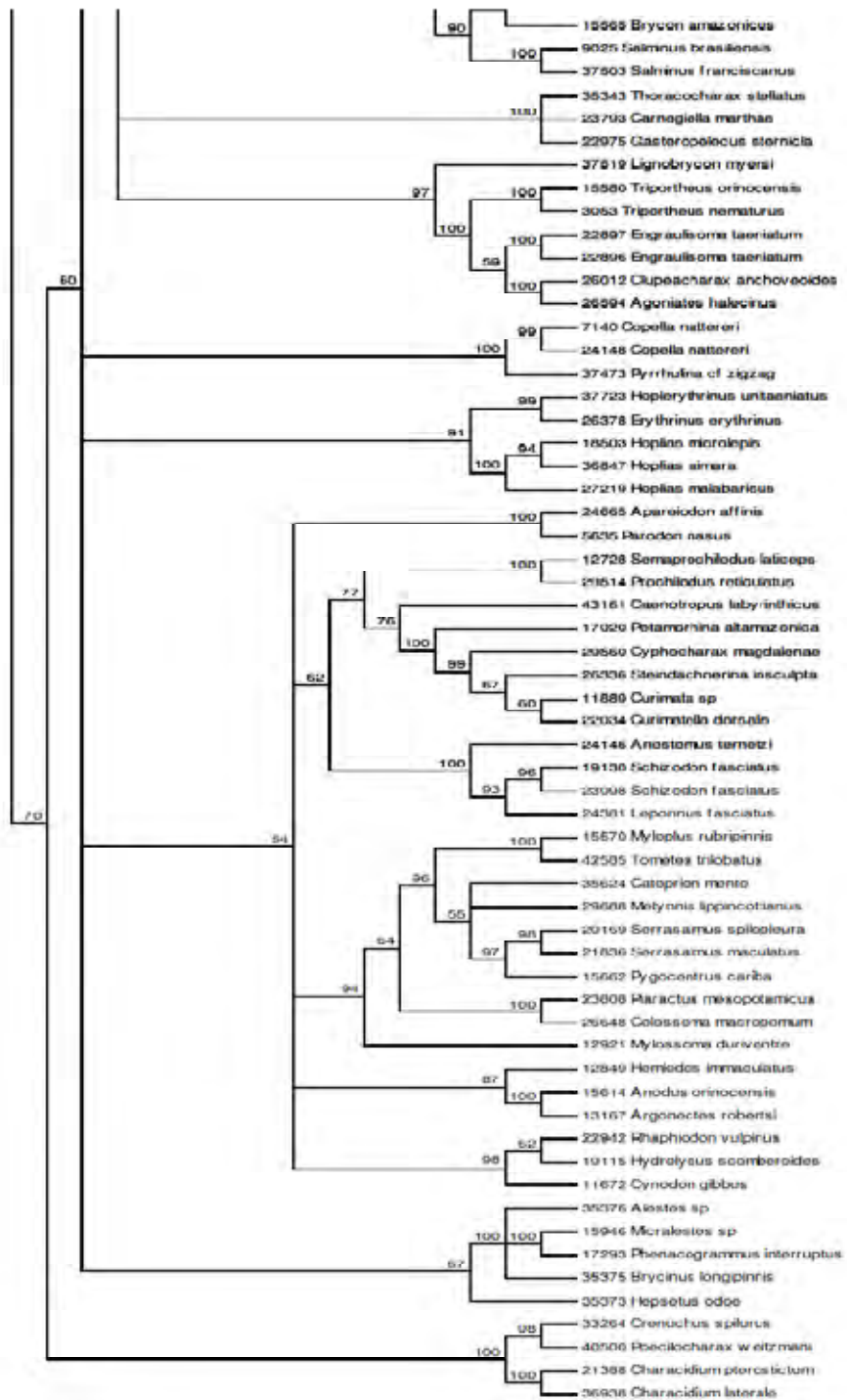




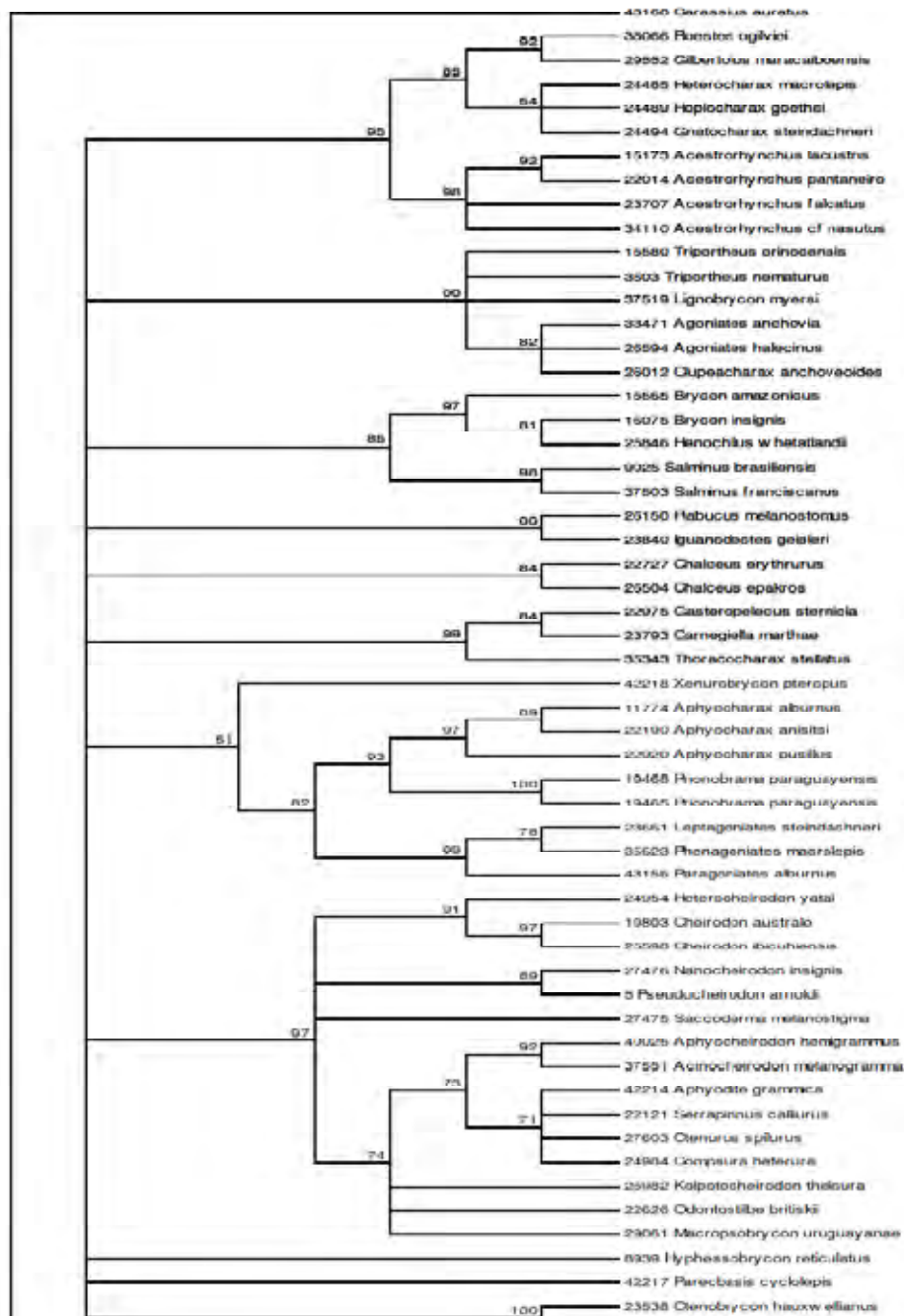
Anexo 5. Árvore de consenso por maioria para o gene *Myh6* construída com o método de ML. Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 100 pseudoréplicas.

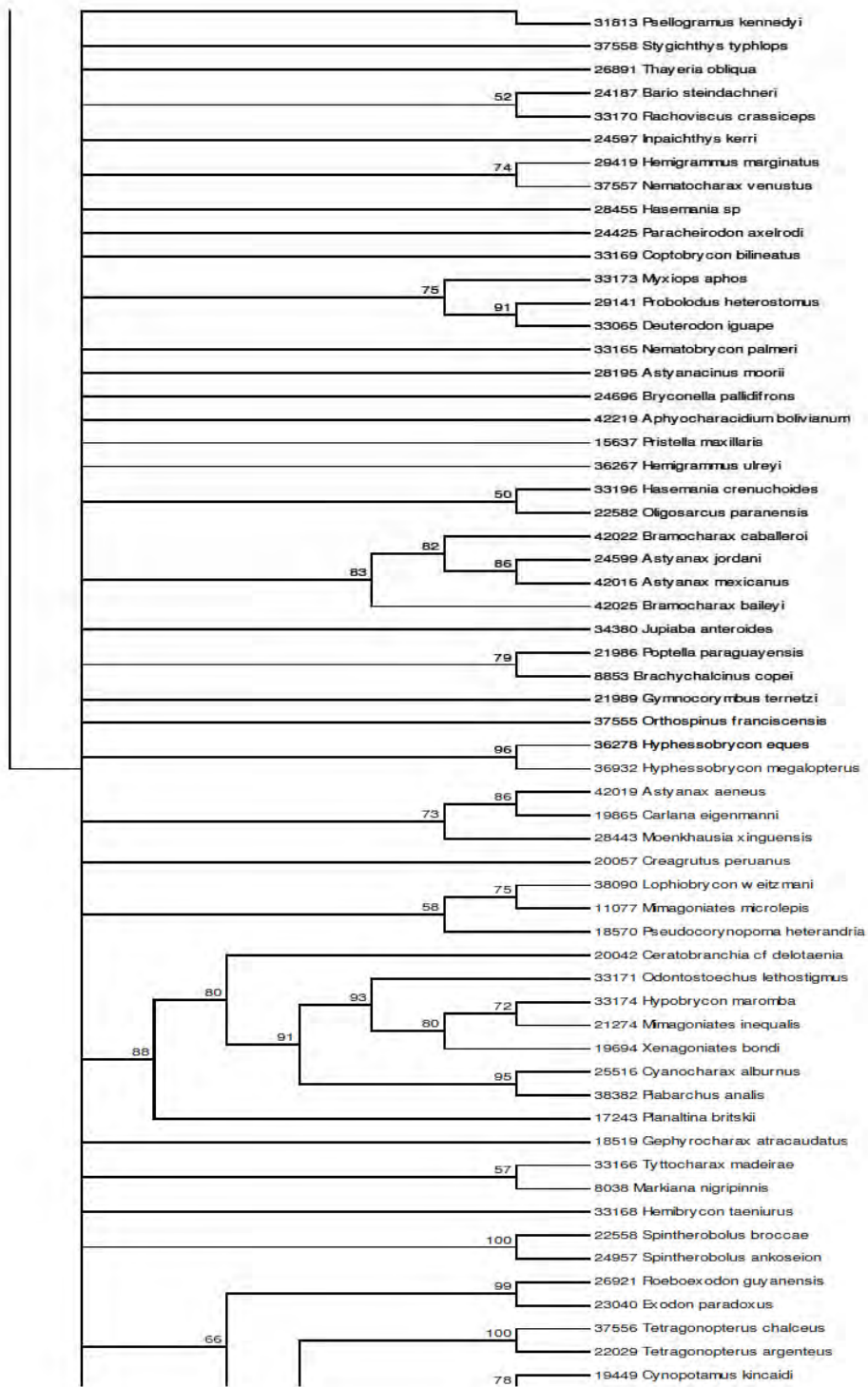




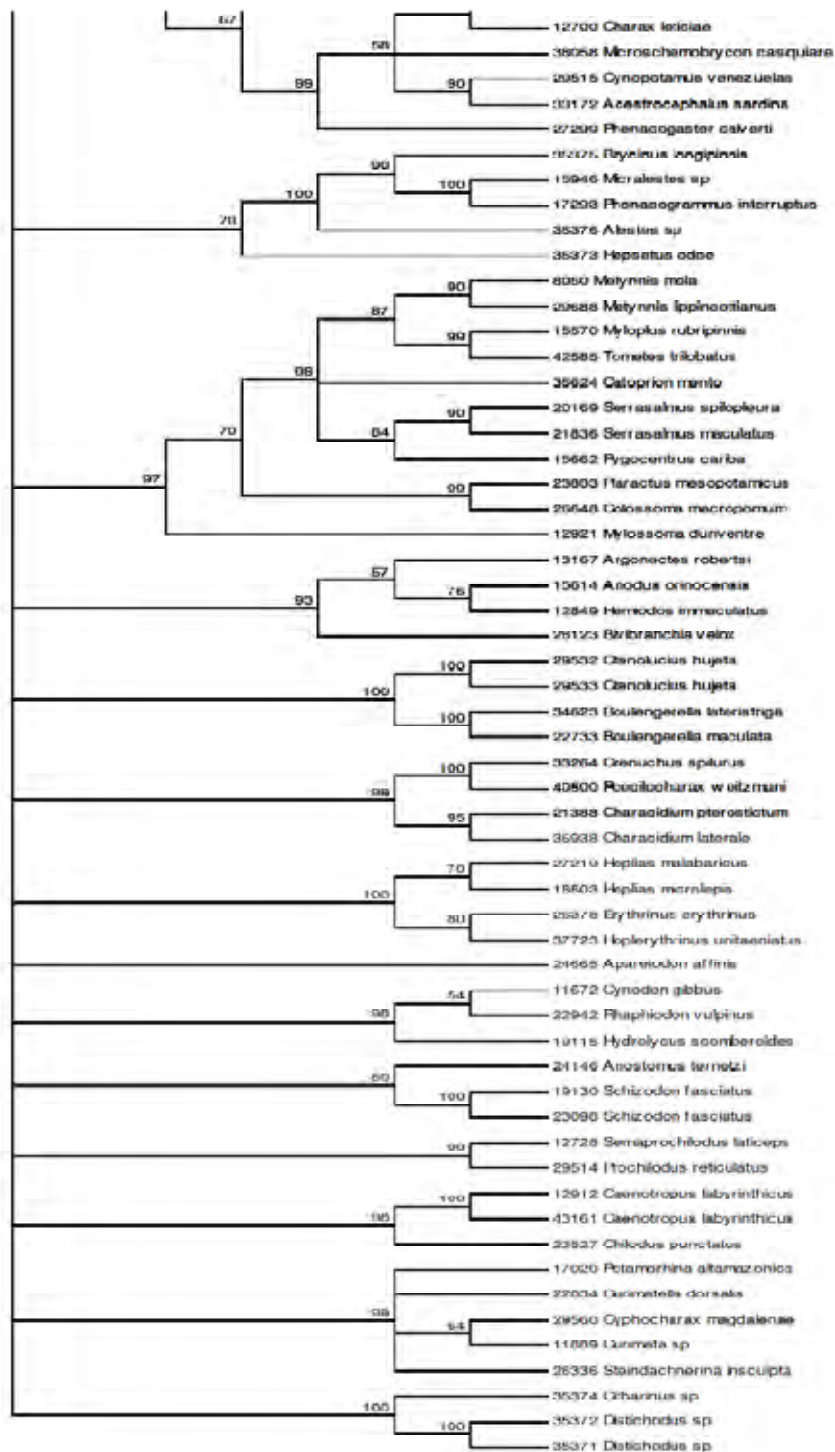


Anexo 7. Árvore de consenso por maioria para o gene *Sreb2* construída com o método de ML. Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 100 pseudoréplicas.

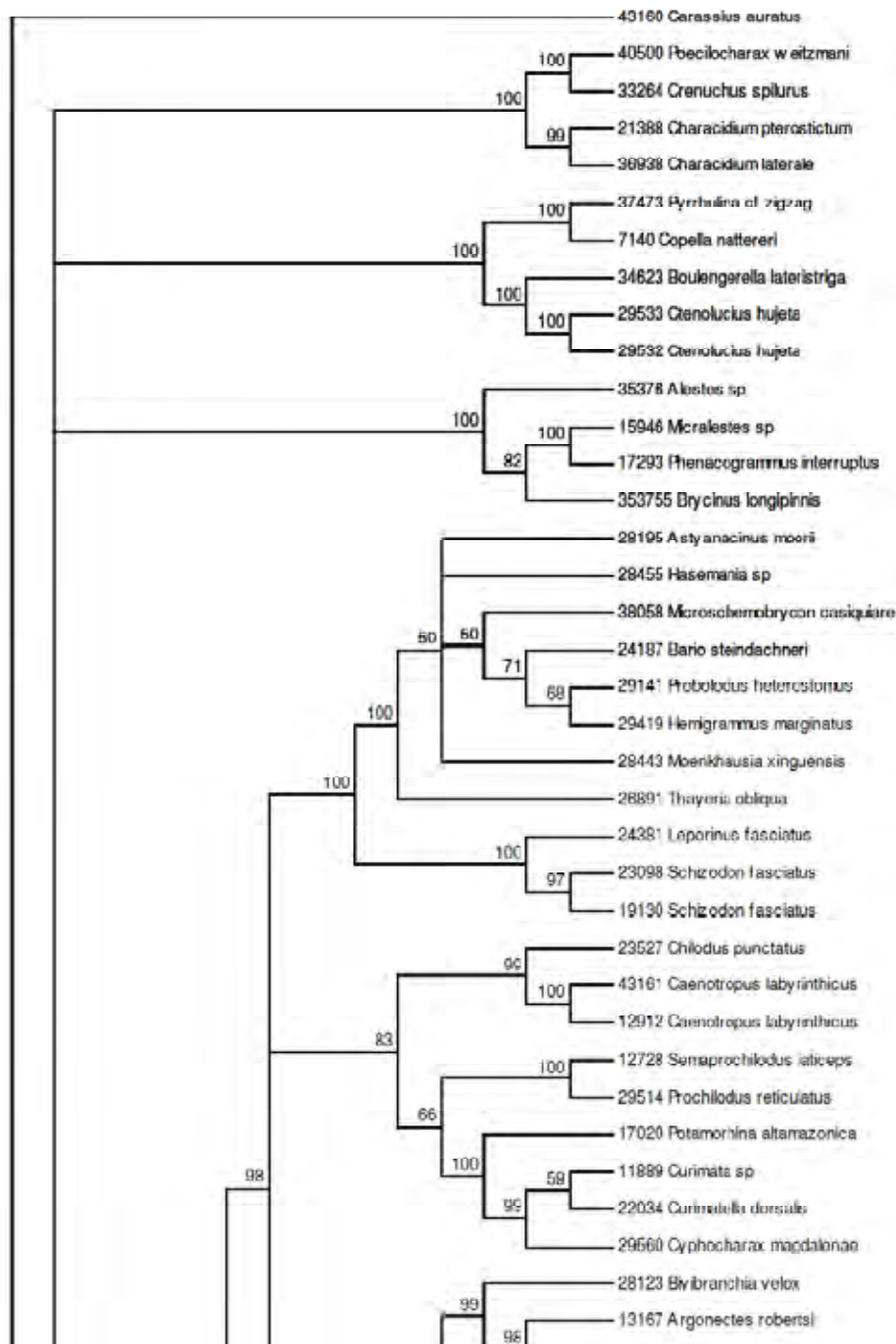


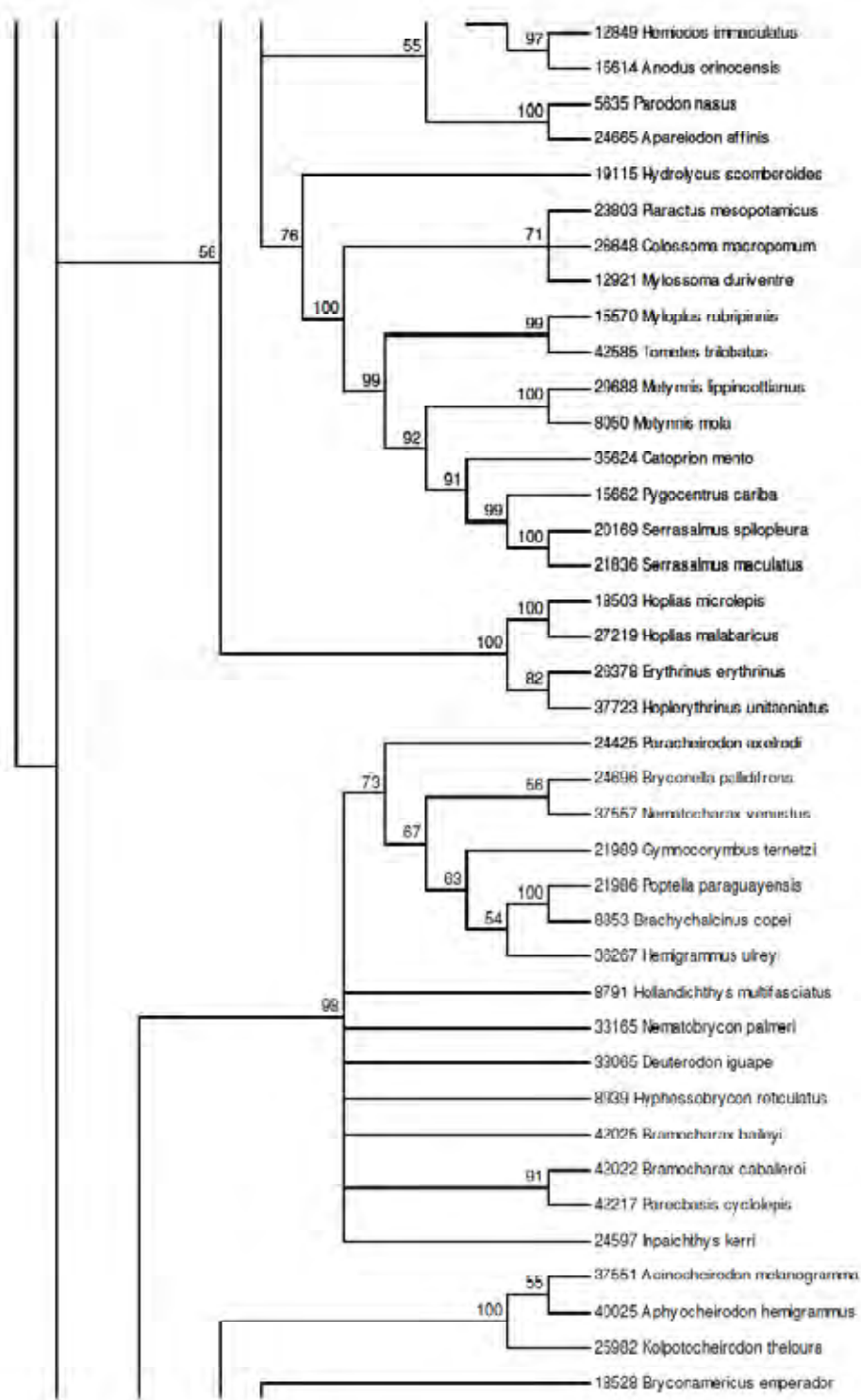


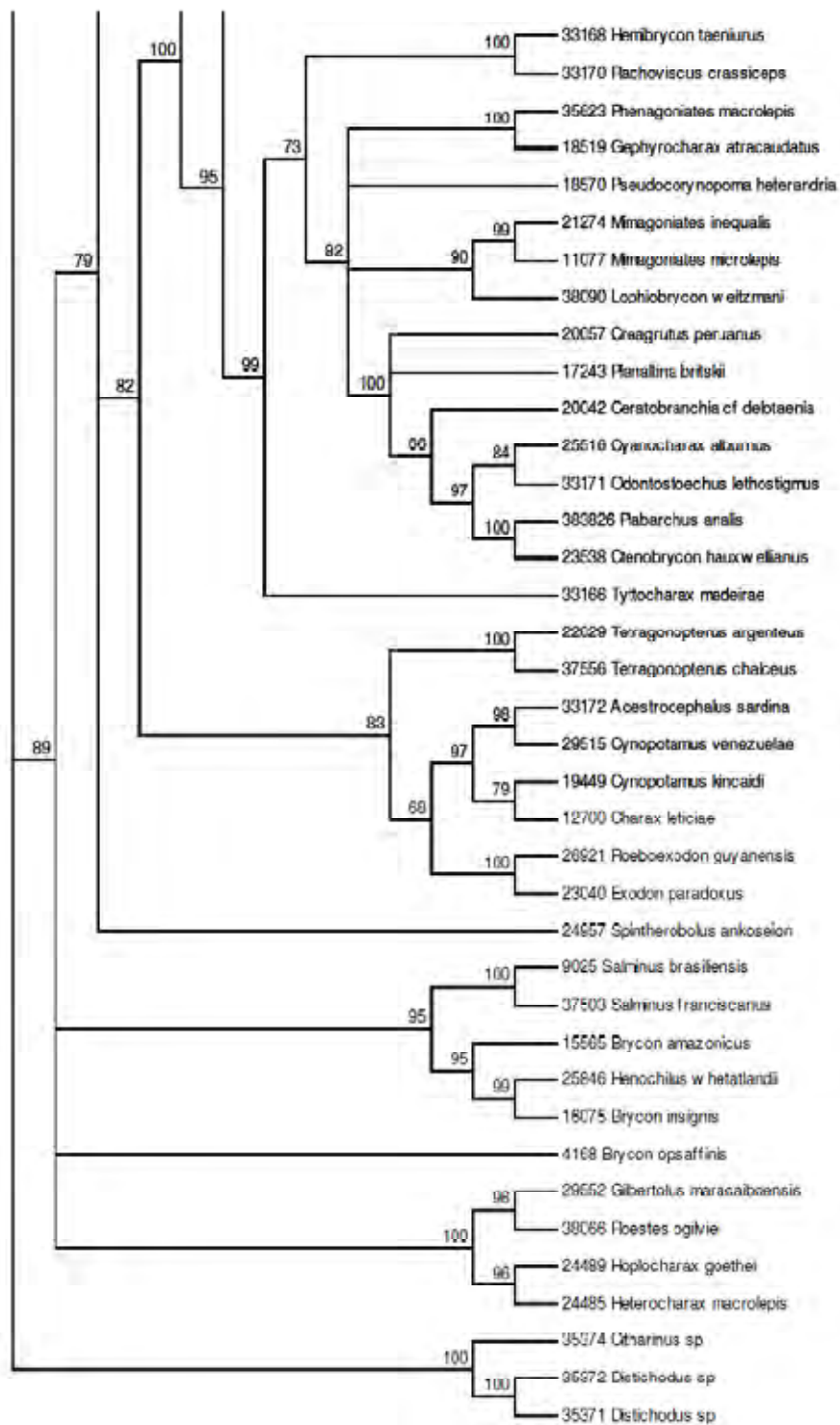




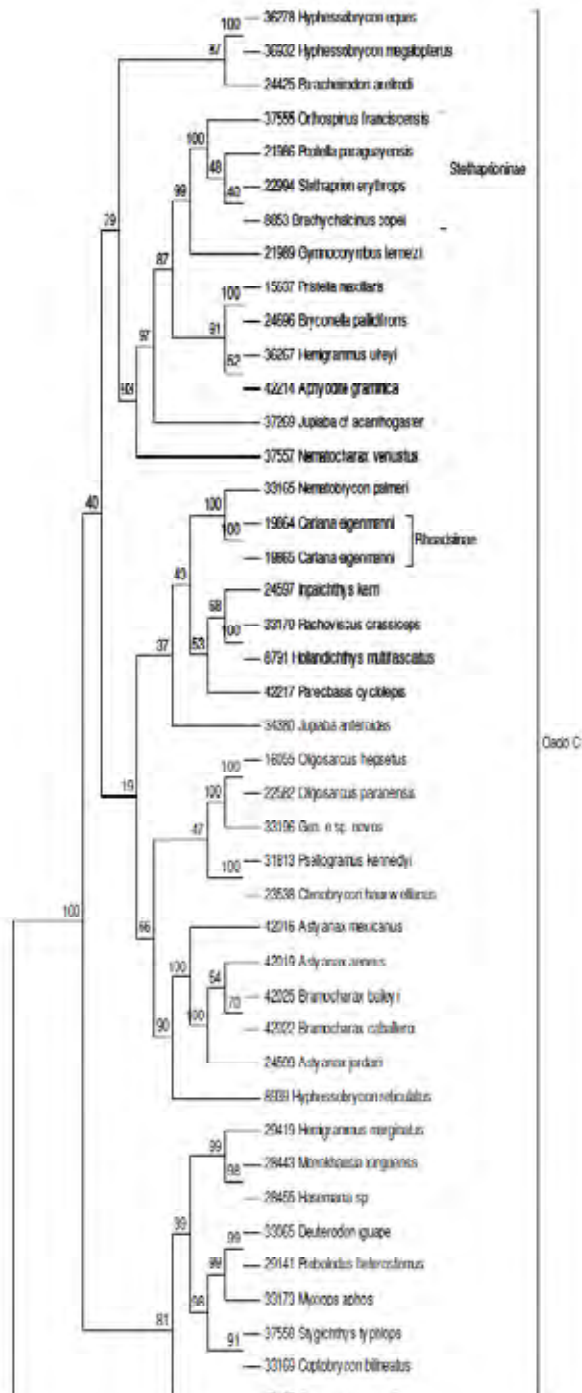
Anexo 8. Árvore de consenso por maioria para o gene *Glyt* construída com o método de ML. Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 100 pseudoréplicas.

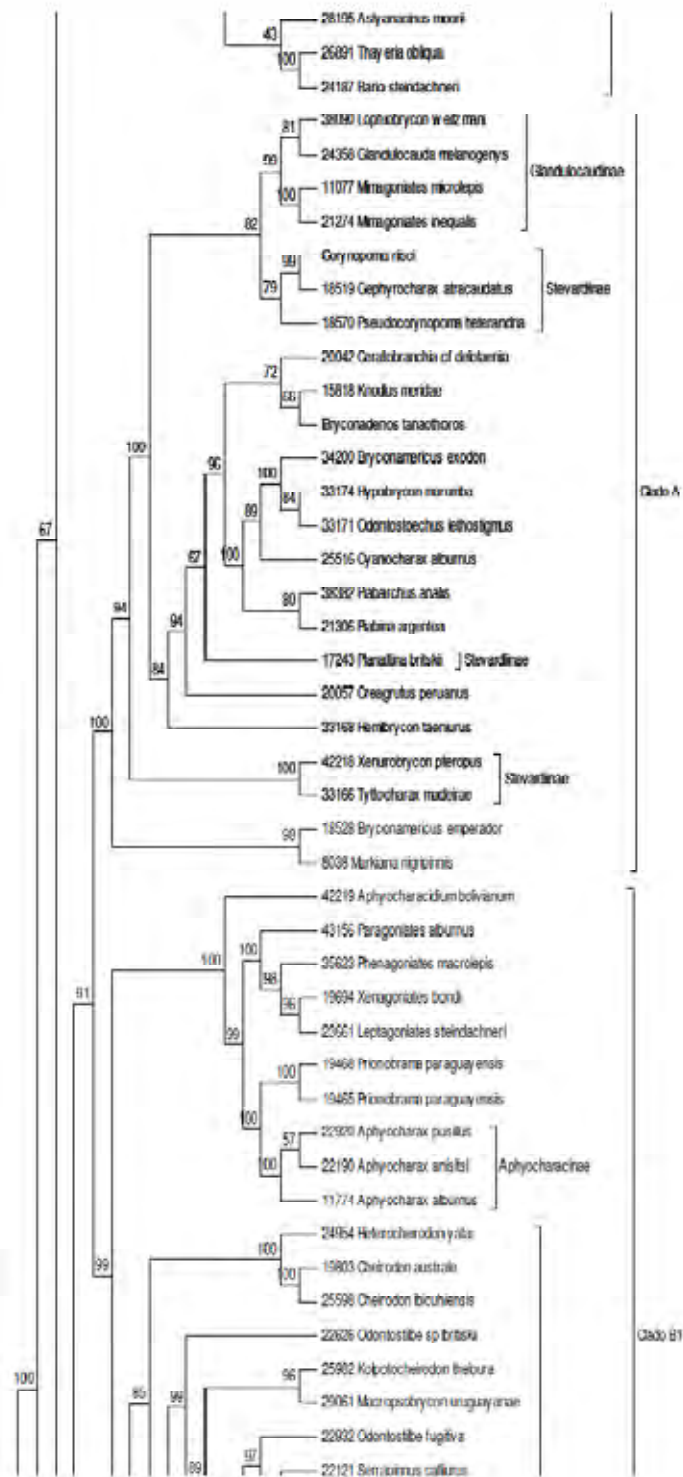


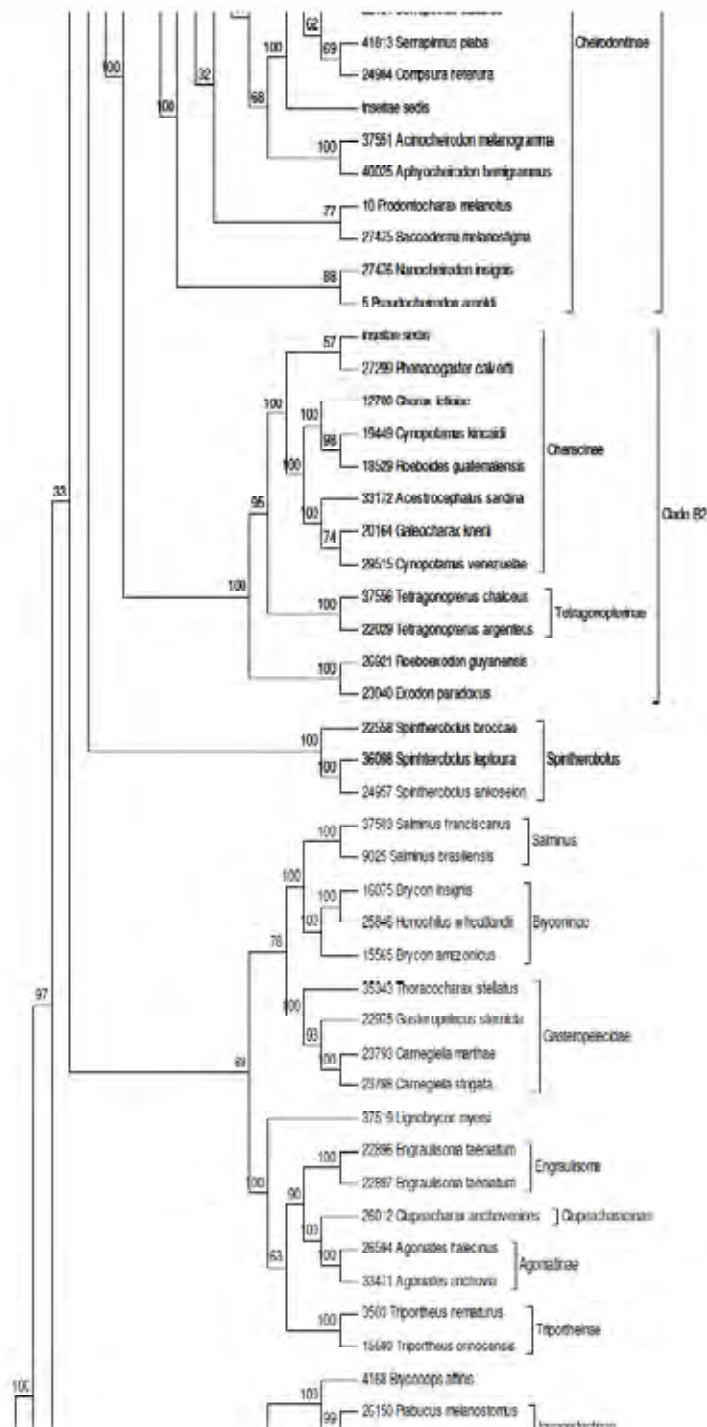


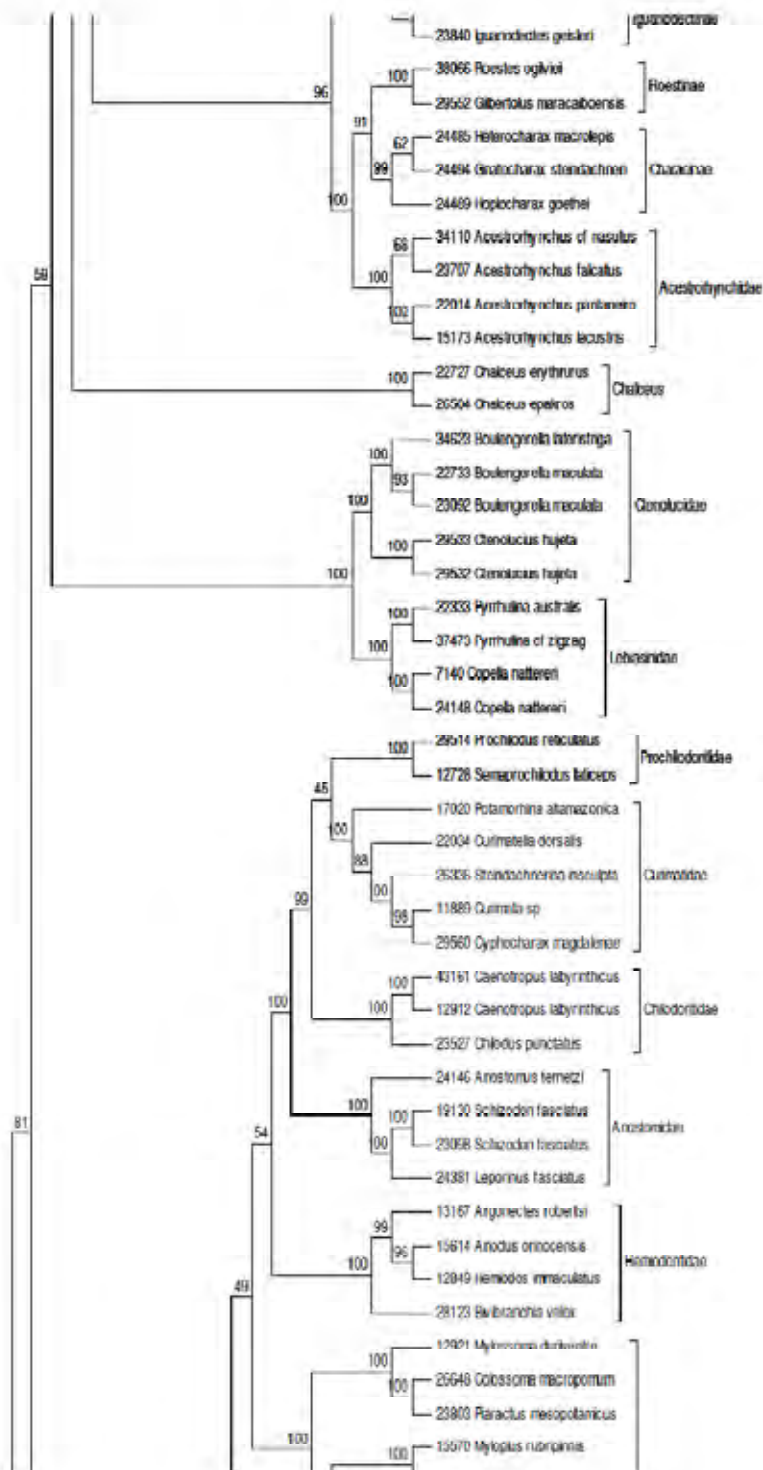


Anexo 9. Árvore final construída com o método de Máxima Verossimilhança (ML).  
Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas.

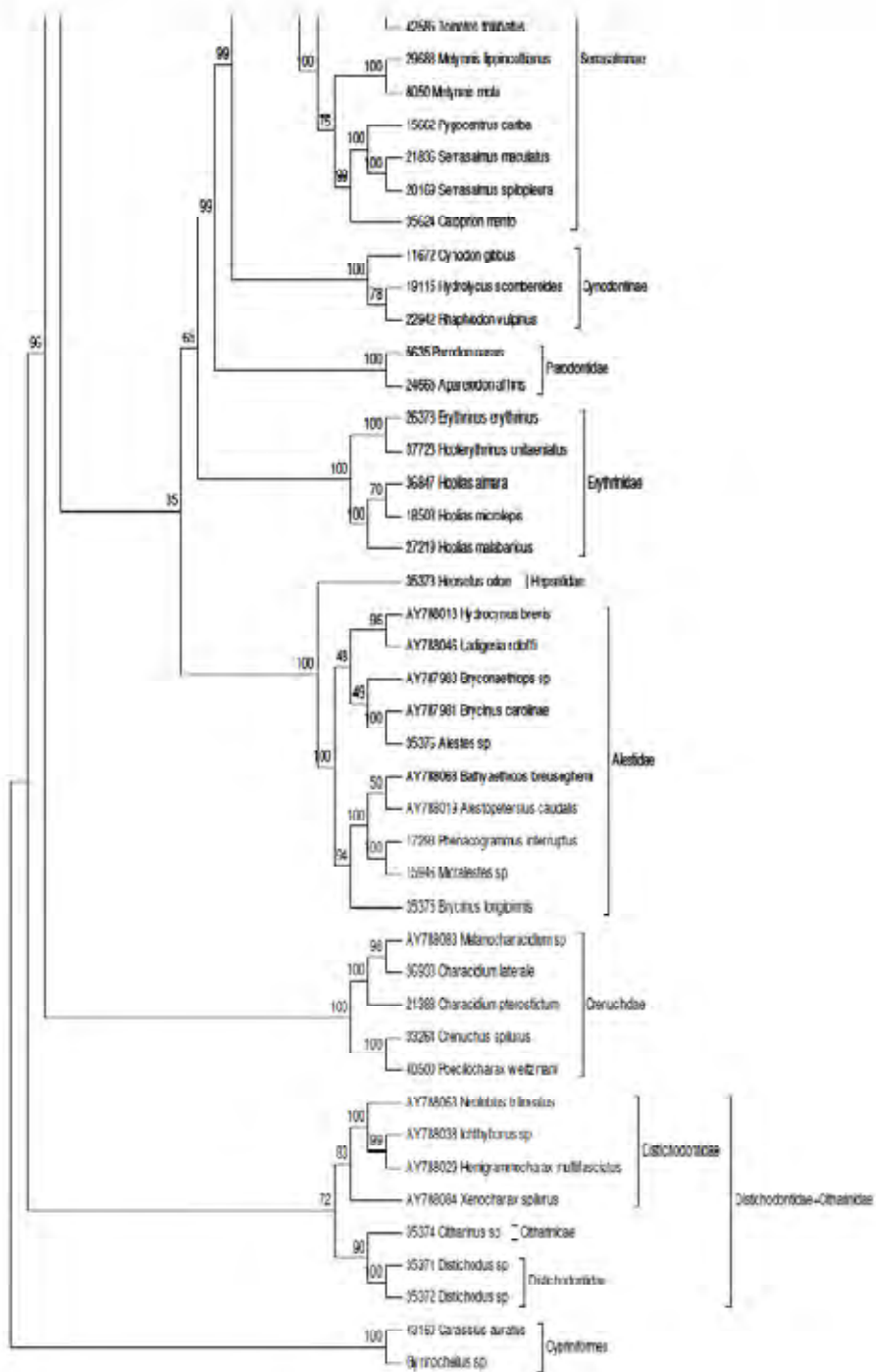




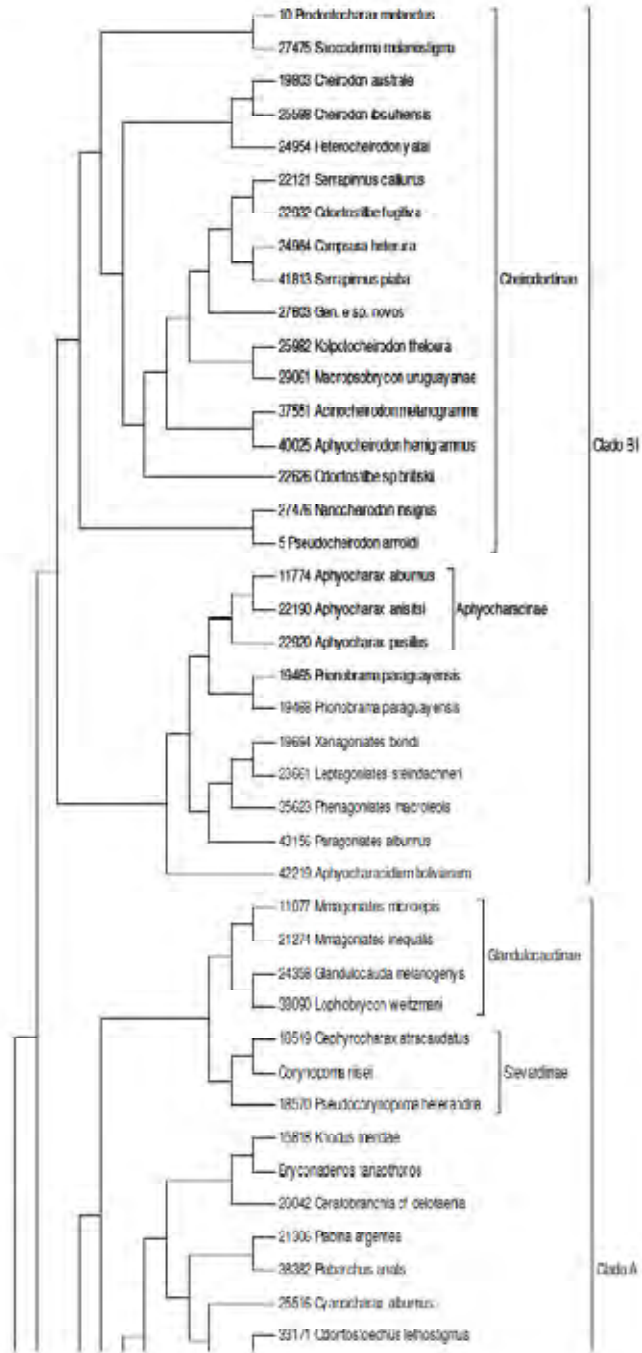


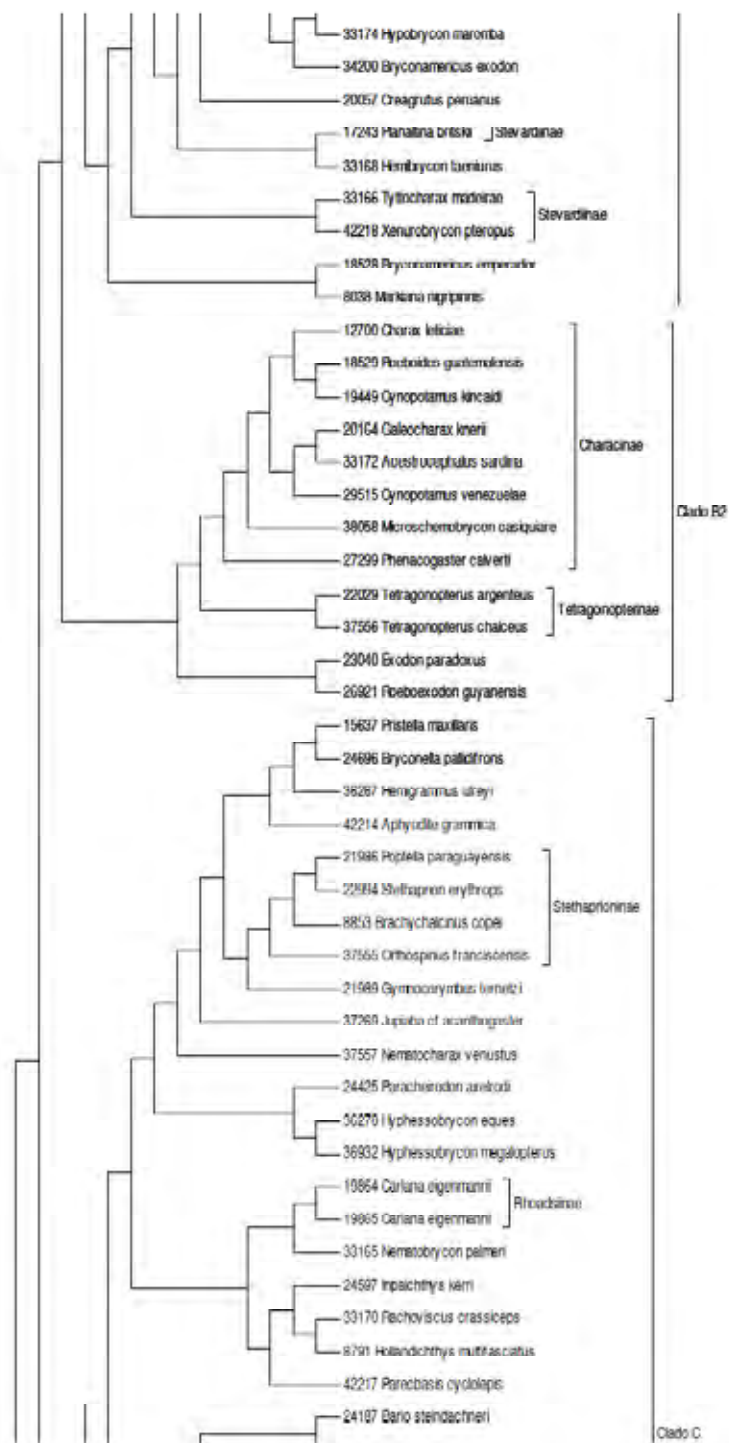


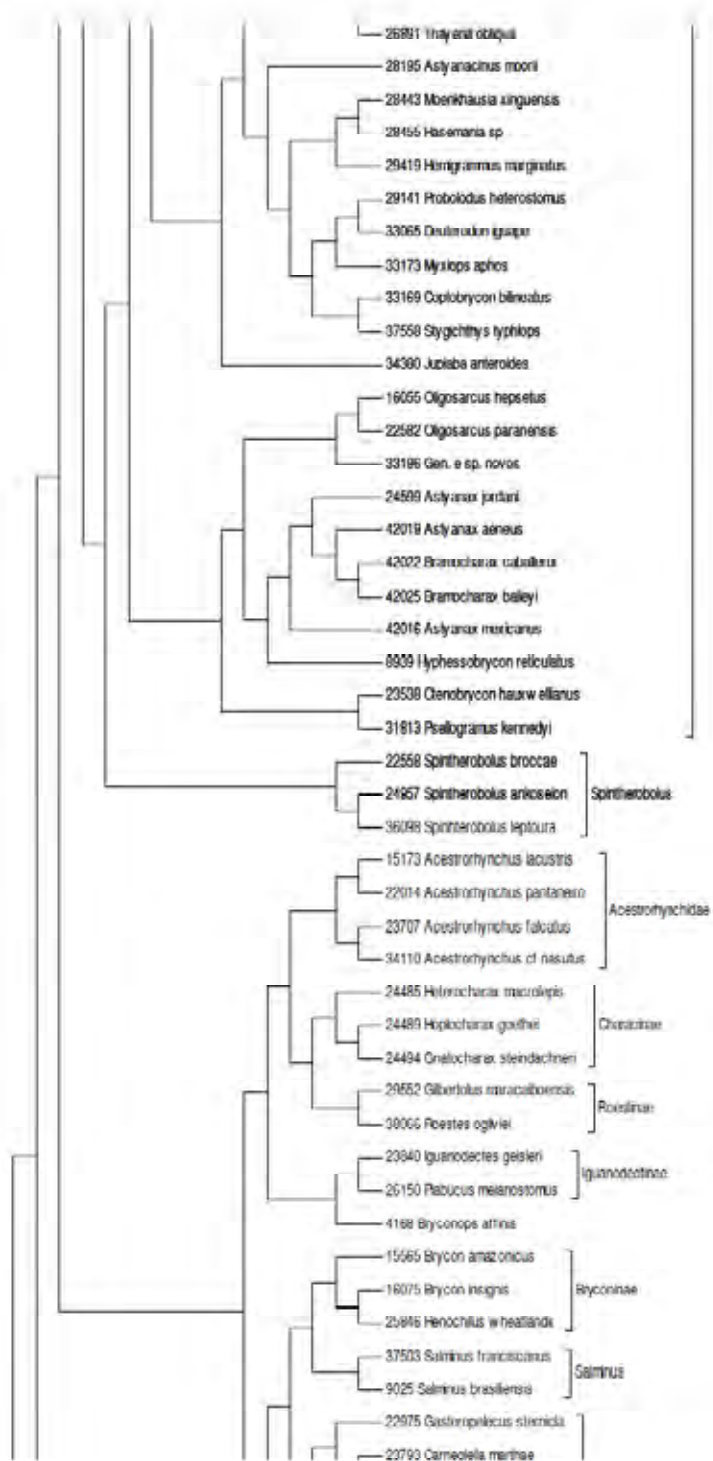


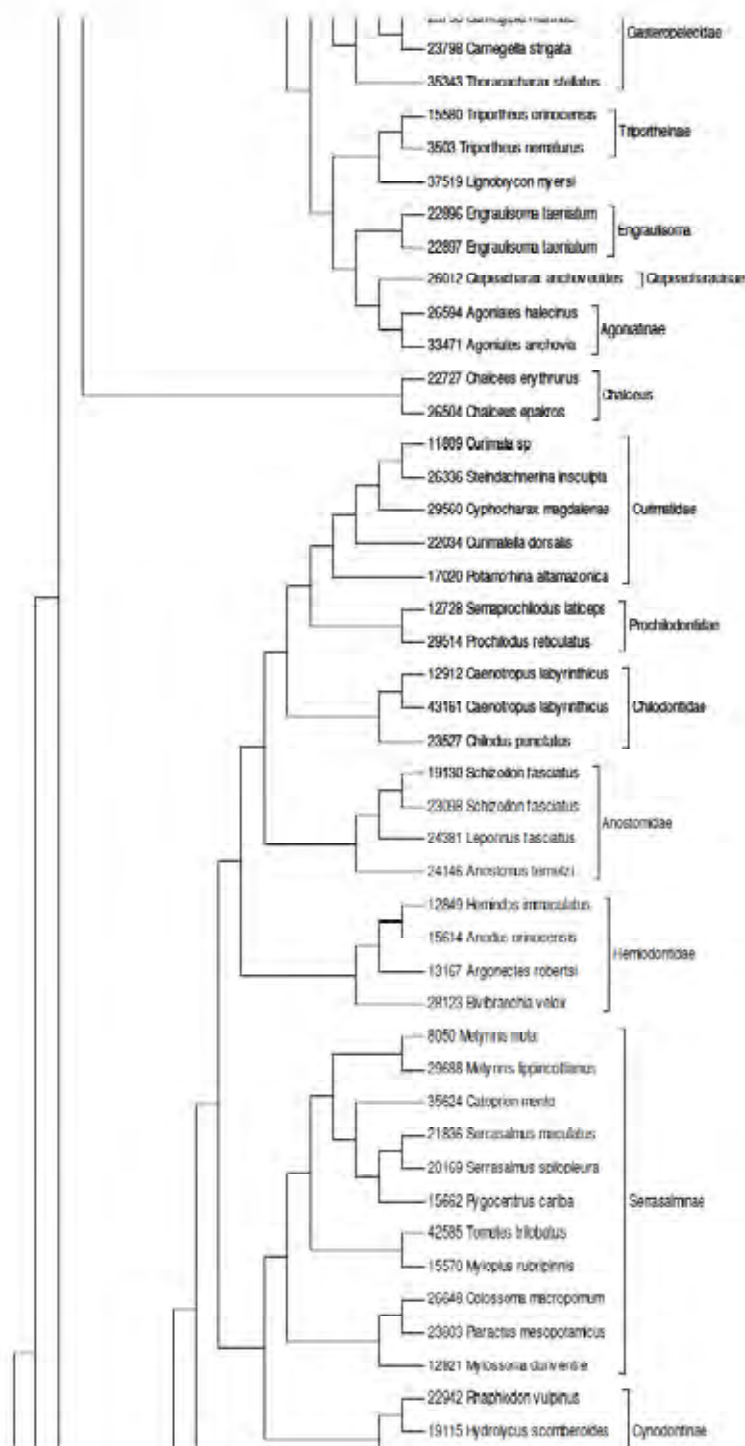


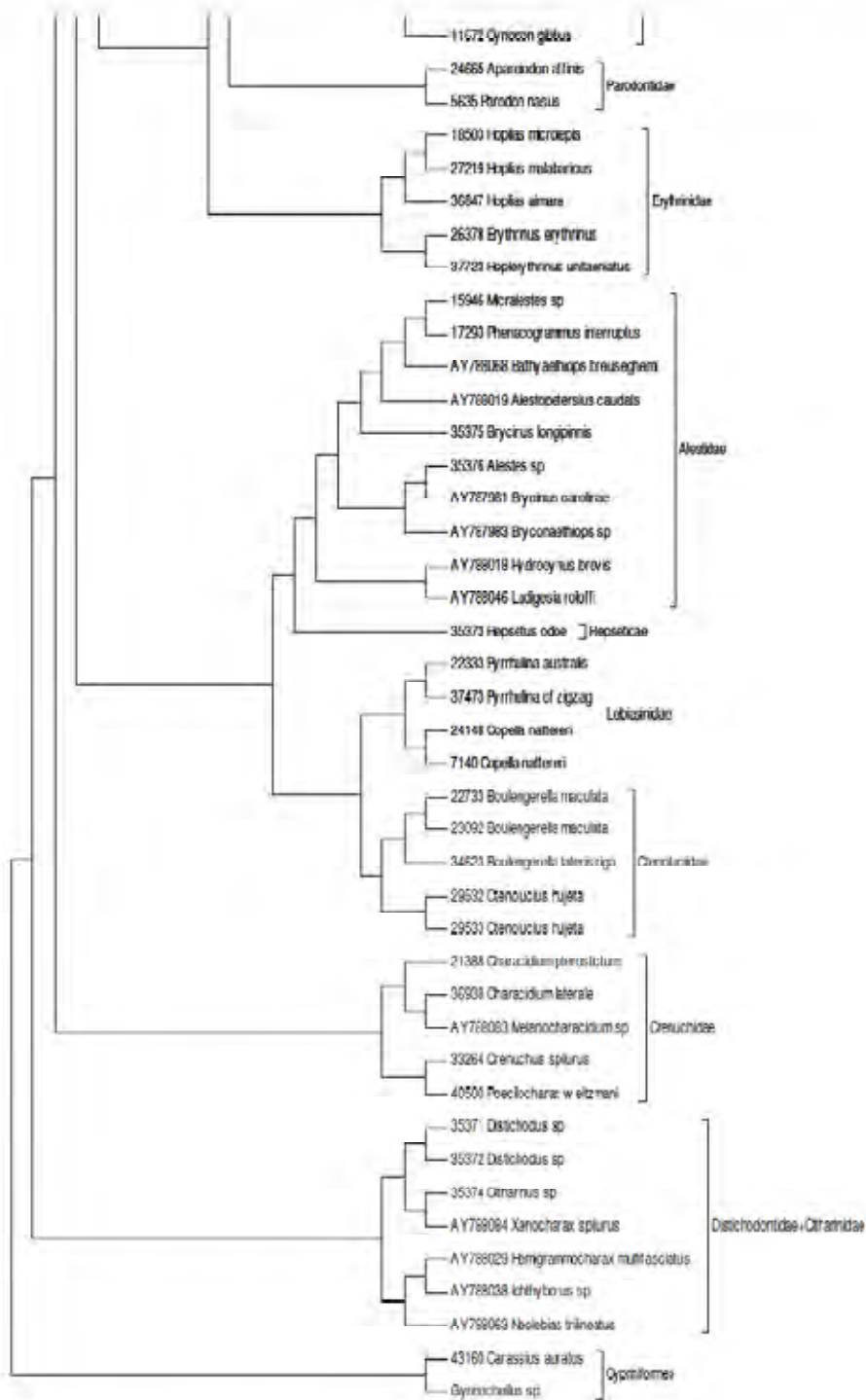
Anexo 10. Árvore final construída com o método de Máxima Parcimônia (MP).  
Os números nos nós representam o valor de *bootstrap* para 1000 pseudoréplicas.











Anexo 11. Árvore final construída com o método bayesiano. Os números acima nos nós representam o valor das probabilidades posteriores obtidas na análise de 18.000.000 de gerações.

