

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ZOOLOGIA

Guilherme José da Costa Silva

Estudos evolutivos entre espécies do gênero
Rineloricaria (Siluriformes: Loricariidae:
Loricariinae) com base em caracteres moleculares.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Claudio Oliveira

Botucatu

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ZOOLOGIA

Guilherme José da Costa Silva

Estudos evolutivos entre espécies do gênero
Rineloricaria (Siluriformes: Loricariidae:
Loricariinae) com base em caracteres moleculares.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, Área de Zoologia, para obtenção do título de
Doutor em Zoologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Claudio Oliveira

Botucatu

2013

Silva, Guilherme José da Costa.

Estudos evolutivos entre espécies do gênero *Rineloricaria* (Siluriformes: Loricariidae: Loricariinae) com base em caracteres moleculares / Guilherme José da Costa Silva. – Botucatu : [s.n.], 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Claudio Oliveira

Capes: 20406029

1. Filogenia. 2. Evolução (Biologia). 3. Bagre (Peixe) - Evolução. 4. Bioinformática. 5. Biogeografia. 6. Taxonomia numérica.

Palavras-chave: Biogeografia; Ecomorfologia; *Rineloricaria*; Sistemática molecular; Taxonomia.

*Dedico essa tese à minha mãe Mariza e ao meu pai José
Carlos, por me educarem com bons exemplos e por
serem minhas maiores fontes de inspiração.*

Amo vocês!

“Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve que renunciar para conseguir”.

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde e iluminação que me proporcionou durante toda minha trajetória.

Aos meus pais, José Carlos e Mariza, que são sem dúvidas minhas maiores fontes de inspiração. Às minhas irmãs, Cris e Carol, que tanto me apoiaram e também serviram de modelo a seguir. Aos meus sobrinhos prediletos Caian, Inaiá e Otto. Também aos meus cunhados Flávio e Adinan, pela amizade. Nada seria possível sem todos vocês.

Agradeço a todos os meus familiares, em especial aos meus tios José Marcos, Paulo e Marcos, pela enorme participação em minha criação. Agradeço também ao meu primo/irmão Rafael, pela amizade de sempre.

Agradeço à Débora, minha namorada, que além de me ajudar com a tese, me ajudou a crescer como pessoa e pesquisador. Obrigado Linda! Agradeço também aos membros do outro lado da minha família: Marlene, Rafael e porque não ao Igor. Obrigado!

Aos amigos de Minas, em especial ao Júlio, Diego e Rafael.

Aos amigos de Faculdade, em especial ao Renato, por compartilhar parte dos seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Claudio Oliveira pela orientação, amizade e por acreditar no meu trabalho.

À Dr. Mônica S. Rodriguez pela coorientação e pelas palavras de incentivo durante todo o tempo e execução do trabalho.

Aos meus colegas de trabalho e amigos, pelo incentivo e momentos de descontração, em especial ao Fábio, Jefferson, Bruno Melo, Yuldi, Ricardo e Gabriel, pelas discussões teóricas e também pela ajuda na execução do trabalho.

Ao Renato Devidé, pela ajuda com as coletas e principalmente pela amizade.

Aos amigos de república Júlio, Rodrigo e Diego, pelo companheirismo durante todos esses anos.

Aos membros da banca examinadora.

Aos professores Roberto E. Reis e Cláudio H. Zawadzki pelo material cedido para a nossa pesquisa.

Ao Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, ao Departamento de Morfologia, à Pós Graduação em Ciências Biológicas - Área de Concentração Zoologia, ao Instituto de Biociências, UNESP, FAPESP, CNPq e CAPES pelo apoio ao desenvolvimento do projeto.

RESUMO

O gênero *Rineloricaria* é composto atualmente por 65 espécies válidas, que se distribuem por quase toda a região Neotropical. Por ocuparem grande variedade de habitats, as espécies desse gênero apresentam intensa diversidade morfológica, o que dificulta o entendimento da taxonomia e, sobretudo, dos processos evolutivos das espécies e de seus caracteres morfológicos. Nesse sentido o presente trabalho buscou investigar a evolução do gênero *Rineloricaria*, sob os aspectos taxonômicos, ecomorfológicos e biogeográficos, baseando-se em análises filogenéticas moleculares. Os resultados demonstraram que esse gênero é um grupo monofilético que se originou há aproximadamente 15 milhões de anos na região do sistema de drenagens do paleo Amazonas-Orinoco, e que a evolução dos sistemas de drenagens neotropicais refletiu diretamente nas atuais distribuições das espécies do gênero. Por outro lado, fatores ambientais específicos nortearam a seleção de determinados conjuntos de caracteres de forma convergente, caracteres esses anteriormente utilizados na descrição de grupamentos fenéticos, que por sua vez se demonstraram não naturais.

ABSTRACT

Rineloricaria currently comprises 65 valid species, which are widespread in the Neotropical Region. Because these species occupy a great variety of habitats, they present a wide intra and interspecific morphological diversity, which difficult the understanding of the taxonomical and a specially the evolutionary process of these species and of their morphological characters. In this sense, this study sought to investigate the evolution of *Rineloricaria* genus, under taxonomical, ecomorphological and biogeographical aspects, based on molecular phylogenetic analyses. Results show that this genus is a monophyletic group, which originated about 15 million years ago in the region of the paleo-Amazonas-Orinoco drainage system, and that the evolution of the neotropical drainage systems reflected directly in the current distribution of *Rineloricaria* species. On the other hand, specific environmental factors guided the evolution of some characters in a convergent way, some of them previously used in the description of phenetic groups, which in turn showed to be artificial. This study contributes to the understanding of the evolutionary processes of *Rineloricaria* species, and also proposes alternative routes of dispersion and colonization of neotropical fishes.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fotografias parciais de espécies de <i>Rineloricaria</i> destacando alguns dos caracteres utilizados nas análises ecomorfológicas.	32
Figura 2: Forma geral da estrutura da boca em diferentes espécies de <i>Rineloricaria</i> e uma de <i>Harttia</i>	34
Figura 3: (Primeira parte) Árvore filogenética obtida pelo método Bayesiano entre espécies de Loricariinae com ênfase em <i>Rineloricaria</i>	37
Figura 3: (Segunda parte).....	38
Figura 4: Relações entre os clados principais encontrados: Os números presentes nos nós são contemplados na legenda da Figura 3.	39
Figura 5: Relações entre espécies de <i>Rineloricaria</i> internas ao clado 1: Os números presentes nos nós são contemplados na legenda da Figura 3.	40
Figura 6: Relações entre espécies de <i>Rineloricaria</i> internas ao clado 2: Os números presentes nos nós são contemplados na legenda da Figura 3.	40
Figura 7: Relações entre espécies de <i>Rineloricaria</i> internas ao clado 3: Os números presentes nos nós são contemplados na legenda da Figura 3.	41
Figura 8: Relações entre espécies de <i>Rineloricaria</i> internas ao clado 4: Os números presentes nos nós são contemplados na legenda da Figura 3.	41
Figura 9: Relações entre espécies de <i>Rineloricaria</i> internas ao clado 5 e 6: Os números presentes nos nós são contemplados na legenda da Figura 4.	42
Figura 10: Relações entre espécies de <i>Rineloricaria</i> internas aos clados 7, 8 e 9: Os números presentes nos nós são contemplados na legenda da Figura 4.	42
Figura 11: Relações entre espécies de <i>Rineloricaria</i> internas ao clado 10: Os números presentes nos nós são contemplados na legenda da Figura 4.	43
Figura 12: Mapa indicativo das regiões biogeográficas utilizadas nas análises e Árvore filogenética entre espécies de <i>Rineloricaria</i> com dados das análises de relógio molecular e de Lagrange:.....	45
Figura 13: Arvore filogenética entre espécies de <i>Rineloricaria</i> destacando o tipo de ambiente em que as amostras foram coletadas.	46
Figura 14: Árvores filogenéticas de <i>Rineloricaria</i> comparando a interrelação entre os tipos ambientes e determinadas combinações de caracteres.....	47
Figura 15: Gráficos das frequências de estados de cada um dos caracteres em cada tipo de ambiente com seus respectivos valores de significância.	48
Figura 16: Análise de variáveis canônicas entre três populações de <i>Rineloricaria lanceolata</i>	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Síntese de alguns dos principais eventos geológicos ocorridos na região Neotropical durante os últimos 30 milhões de anos.	3
Tabela 2: lista das amostras analisadas, com os segmentos obtidos para cada uma delas.....	12
Tabela 3: <i>Primers</i> utilizados para a amplificação e sequenciamento dos segmentos de DNA.....	24
Tabela 4: Dados sobre as partições utilizadas nas análises Bayesianas e de Máxima Verossimilhança.	36

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
INTRODUÇÃO	2
Região Neotropical.....	2
A família Loricariidae e o gênero <i>Rineloricaria</i>	6
OBJETIVO	11
MATERIAL E MÉTODOS	11
Material	11
Métodos.....	21
Obtenção, preservação e identificação das amostras.....	21
Extração de DNA Genômico	22
Amplificação dos Segmentos de DNA.....	23
Amplificação dos genes mitocondriais.....	23
Amplificação do gene nuclear	24
Purificação das amostras amplificadas.....	24
Reação de PCR para Sequenciamento.....	25
Limpeza do PCR de Sequenciamento.	25
Análise dos dados.....	26
Sequências consenso e confecção da matriz.	26
Análise de DNA <i>Barcoding</i>	27
Análises filogenéticas.....	27
Análises biogeográficas.....	28
Análises complementares no Grupo <i>Rineloricaria lanceolata</i>	29
Análise ecomorfológica.....	29
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO	50
Sistemática e taxonomia de <i>Rineloricaria</i>	50
Estudos preliminares de ecomorfologia em <i>Rineloricaria</i>	60
Biogeografia de <i>Rineloricaria</i>	68
CONCLUSÕES	78
Referências Bibliográficas	80

APRESENTAÇÃO

A presente tese de doutorado trata da análise de processos evolutivos do gênero *Rineloricaria*, sob os aspectos filogenéticos, ecomorfológicos, biogeográficos e taxonômicos. Grande parte dos trabalhos realizados até o momento sobre o gênero diz respeito à descrição de novas espécies, sem necessariamente abordar a relação de parentesco entre as mesmas. Lançando mão da filogenia molecular, elaboramos hipóteses de relacionamento entre as espécies de *Rineloricaria*, que foram contextualizadas com os eventos geológicos que levaram a conformação atual das bacias hidrográficas da região Neotropical. Dessa forma, sob uma perspectiva filogenética, buscamos adicionar um novo capítulo na história taxonômica do gênero *Rineloricaria*.

INTRODUÇÃO

Região Neotropical

A Região Neotropical compreende uma enorme área que se estende desde o México até a Argentina, abrigando grande quantidade de habitats, duas das maiores bacias hidrográficas e uma das faunas mais ricas do mundo (Wallace, 1876; Albert e Reis, 2011; Holt *et al.*, 2013). Grande parte dessa diversidade sofreu muitas modificações a partir do período Cretáceo tardio, quando houve separação entre as placas tectônicas Sulamericana e Africana, com consequente abertura do Atlântico Sul. Após essa separação a placa Sulamericana continuou sua trajetória, se afastando ainda mais da placa Africana e seguindo em rota de colisão com a placa de Nazca, o que resultou no início do soerguimento dos Andes há cerca de 67 milhões de anos, processo que perdura até os dias atuais (Albert e Reis, 2011).

Os Andes podem ser divididos em porção Sul, Centro-Sul (a primeira a aflorar) e Norte, sendo que esta pode ser subdividida em Cordilheira Oeste (CO), Cordilheira Central (CC) e Cordilheira Leste (CL) (Schaefer, 2011). Há cerca de 12 milhões de anos, com o soerguimento da CL, as bacias hidrográficas da Região Neotropical foram divididas em Cisandina (a leste da CL) e Transandina (a oeste da CL), sendo tal evento documentado como o responsável por muitas das cladogêneses ocorrentes entre espécies de peixes que ocupavam essa região em um tempo pretérito (Lovejoy *et al.*, 2006; Albert *et al.*, 2006; Bloom e Lovejoy, 2011).

Após a divisão da Região Neotropical, a porção Norte dos Andes continuou a soerguer e fruto disso é o surgimento da cordilheira do Merida Andes (fronteira entre as drenagens do Lago Maracaibo e Rio Orinoco) há aproximadamente 8 milhões de anos (Ludberg, 1998; Albert *et al.*, 2006). Esse processo foi acompanhado por um grande rearranjo de bacias

hidrográficas Cisandinas, o que culminou, com o surgimento do Arco Vaupes, na separação da paleo-bacia Amazonas-Orinoco, originando os leitos modernos dos rios Amazonas e Orinoco (Tabela 1) (Lundberg, 1998; Winemiller e Willis, 2011).

Há cerca de 3 milhões de anos um importante evento geológico ocorreu na região Noroeste do continente Sulamericano: a junção do istmo do Panamá (Hulsey e López-Fernández, 2011). Esse evento possibilitou que as espécies transandinas sulamericanas se dispersassem rumo ao sul do México, resultando assim na atual distribuição das espécies terrestres e de água doce da região Neotropical (Ornelas-García *et al.*, 2008).

Tabela 1. Síntese de alguns dos principais eventos geológicos ocorridos na região Neotropical durante os últimos 30 milhões de anos.

EVENTO	DATA	CONSEQUENCIAS BIOGEOGRÁFICAS	REFERÊNCIA
Formação do <i>Chapare Buttress</i>	30 milhões de anos	Separação entre a ictiofauna do Paleo Amazonas-Orinoco e Paraguai	Carvalho e Albert, 2011
Elevação da cordilheira Leste	12 milhões de anos	Separação entre região Cis e Transandina	Albert <i>et al.</i> , 2006
Mudança dos limites entre a bacia do Paraguai e Paleo Amazonas-Orinoco	11,8 e 10 milhões de anos	Grande captura de cabeceiras no sentido do Paraguai para o Paleo Amazonas-Orinoco	Lundberg, 1998; Carvalho e Albert, 2011
Surgimento do Arco Vaupes	Entre 10 e 8 milhões de anos	Separação final entre os rios Amazonas e Orinoco	Lundberg, 1998; Hubert <i>et al.</i> , 2007; Winemiller e Willis, 2011
Oscilações epistáticas	Últimos 10 milhões de anos	Incursões e regressões marinhas nas Terras Baixas sulamericanas	Haq <i>et al.</i> , 1987; Bloom e Lovejoy, 2011
Elevação do Merida Andes	8 milhões de anos	Separação mais recente entre a ictiofauna do Orinoco e Maracaibo	Lundberg, 1998; Albert <i>et al.</i> , 2006; Schaefer, 2011
Grande incursão marinha	5 milhões de anos	Inundação das Terras Baixas do continente sulamericano	Lovejoy <i>et al.</i> , 2006; Bloom e Lovejoy, 2011
Reativação tectônica das falhas presentes na Serra do Mar brasileira	Últimos 2,5 milhões de anos	Capturas de cabeceiras entre drenagens adjacentes presentes na Serra do Mar	Ribeiro, 2006
Ciclos glaciais	Últimos 2,5 milhões de anos	Ciclos de abaixamento e aumento do nível do mar, que causaram eventos vicariantes entre espécies de peixes de água doce nas drenagens litorâneas	Menezes <i>et al.</i> , 2008

A região Cisandina é dividida em regiões de escudos (Terras Altas) e de planícies (Terras Baixas) (Lundberg *et al.* 1998; Ribeiro, 2006; Menezes *et al.*, 2008). As Terras Altas compreendem os escudos cristalinos das Guianas e do Brasil, já as Terras Baixas compreendem principalmente áreas sob as bacias dos rios Amazonas e Paraguai. Essas bacias compartilham grande parte da ictiofauna em diferentes categorias taxonômicas, o que segundo Carvalho e Albert (2011) é reflexo de uma história de trocas entre tais bacias hidrográficas.

Desde o final do período Cretáceo as regiões de Terras Baixas sofreram vários eventos de incursões marinhas, que são caracterizadas pela invasão da água do mar nas Terras Baixas do continente, podendo ocorrer devido ao aumento do nível do mar (movimentos eustáticos) ou devido à mudança de altimetria da placa continental (abaixamentos epirogenéticos). Esse tipo de evento promoveu tanto extinções quanto eventos de vicariância em espécies dessas regiões (Lundberg, 1998; Albert *et al.*, 2006; Bloom e Lovejoy, 2011; Winemiller e Willis, 2011).

As Terras Altas, mais especificamente as do Escudo Brasileiro, constituem uma região com relevo acidentado, com cerca de 600 metros de altitude média. Essa região concentra nascentes de quase todas as bacias hidrográficas brasileiras e suas principais bacias (ou sub-bacias) exclusivas são as do alto rio Paraná, alto rio Uruguai, alto rio Iguaçu (pertencentes ao complexo do rio da Prata), rios Paraíba do Sul e Ribeira de Iguape (pertencentes ao complexo de bacias do Leste ou Atlânticas), rio São Francisco e além disso nascentes de alguns importantes tributários da margem direita do rio Amazonas, como os rios Tapajós, Tocantins-Araguaia e Xingu (Buckup, 2011). Essa região é marcada por apresentar um grande número de espécies e um elevado grau de endemismo (Albert e Reis, 2011; Buckup, 2011).

A região da bacia do Leste sofreu mudanças quanto à composição e diversidade de ictiofauna nos últimos 10 milhões de anos e parte dessas mudanças se deve às misturas de

ictiofauna com drenagens adjacentes. Essas misturas ocorreram por meio de capturas de cabeceiras resultantes de reativações neotectônicas de falhas geológicas presentes na região (Ribeiro, 2006). Outro motivo comumente apontado como causador dessas mudanças é a flutuação do nível do mar devido a ciclos glaciais: em períodos de glaciação, o nível do mar é mais baixo do que nos períodos interglaciais, permitindo que drenagens litorâneas adjacentes comuniquem-se na região de seus deltas, possibilitando misturas. Com o aumento do nível do mar, novas separações entre as ictiofaunas podem ocorrer, possibilitando subsequentes especiações alopátricas (Menezes *et al.*, 2008).

Ao longo dos últimos 12 milhões de anos muitos eventos geológicos vêm transformando o cenário hidrográfico sulamericano, afetando diretamente a ictiofauna no que diz respeito à diversidade de formas e número de espécies. Por serem exclusivamente de ambientes aquáticos, os peixes são importantes modelos de estudo que vêm auxiliando na reconstrução do histórico hidrogeológico da região Neotropical. Nesse sentido, grupos como os da família Loricariidae, por serem endêmicos da região Neotropical, podem ser de grande valia para esse tipo de estudo.

A família Loricariidae e o gênero *Rineloricaria*

A região Neotropical abriga a ictiofauna de água doce mais rica em número de espécies do planeta, com mais de 7000 espécies descritas e muitas outras ainda não descobertas pela ciência (Reis *et al.*; 2003). Dentro dessa enorme ictiofauna a família Loricariidae é sem dúvida uma das mais diversas e bem distribuídas. Com mais de 858 espécies (Eschmeyer e Fong, 2013), é a maior em número de espécies entre os Siluriformes e também uma das maiores famílias da ictiofauna mundial (Nelson, 2006).

Loricariidae é atualmente dividida em sete subfamílias (Armbruster, 2004; Reis *et al.*, 2006; Chiachio *et al.*, 2008): Lithogeninae, Delturinae, Hypoptopomatinae, Otothirinae, Neoplecostominae, Hypostominae e Loricariinae. Algumas dessas subfamílias possuem uma distribuição relativamente restrita, como por exemplo Neoplecostominae, restrita à região de Terras Altas do Brasil. Por outro lado Loricariinae se distribui em grande parte das bacias hidrográficas neotropicais incluindo transandinas e cisandinas, tanto em Terras Altas como em Terras Baixas.

Os Loricariinae são muito diversos em relação a hábitos e formas, contudo possuem como sinapomorfias a ausência da nadadeira adiposa e o pedúnculo caudal longo e deprimido (Regan, 1904; Rapp Py-Daniel, 1997; Covain *et al.*, 2007), além das demais características que definem a família. Por serem bastante achatados, esses peixes são chamados popularmente de “cascudos-viola”, “cascudos-lagartixa” e “cascudos-chinelo”. Possuem hábito de ficar sobre o substrato inorgânico (rocha, cascalho, areia, silte, etc.) ou orgânico (madeira morta, resíduos vegetais, etc.), ocupando desde ambientes lóticos (como exemplo as *Harttia*) a lênticos (como exemplo *Loricariichthys*). A coloração varia em tons de castanho, com ou sem faixas e a presença de manchas arredondadas escuras na região dorsal. O tamanho médio das espécies dentro da subfamília também é bastante variado, variando de

aproximadamente 13 cm em *Harttia* até algumas espécies de *Paraloricaria* e *Planiloricaria* atingindo cerca de 50 cm.

Atualmente são reconhecidos entre 31 e 34 gêneros na subfamília Loricariinae, (Ferraris, 2007; Covain e Fisch-Muller, 2007; Fichberg e Chamon, 2008; Ghazzi, 2008; Ingenito *et al.*, 2008; Rapp Py-Daniel e Fichberg, 2008; Rodriguez e Miquelarena, 2008; Rodriguez e Reis, 2008; Rodriguez *et al.*, 2011). Essa variação se dá principalmente devido ao *status* incerto dos gêneros *Cteniloricaria*, *Hemiloricaria* e *Fonchiiichthys*. Autores mais recentes tendem a considerar *Cteniloricaria* como sinônimo júnior de *Harttia*, enquanto que os outros dois como sinônimos juniores de *Rineloricaria*. Essa discussão segue em aberto devido à ausência de uma análise filogenética que resolva esse impasse.

Rapp Py-Daniel (1997) propôs a primeira hipótese filogenética entre os gêneros de Loricariinae. Nessa hipótese foi proposto que a subfamília é dividida nas tribos Hartiini e Loricariini, cada uma com suas subtribos. Covain *et al.* (2008) propôs um novo arranjo para a subfamília, onde a subtribo Farlowellina (na ocasião chamada Sturisomina) foi realocada na tribo Loricariini. Posteriormente, em Rodriguez *et al.* (2011) a subtribo Farlowellina foi confirmada como integrante da tribo Loricariini, deixando assim a subtribo Harttiina como única integrante de Harttiini e grupo irmão dos demais Loricariinae.

A subtribo Loricariina possui como característica a nadadeira caudal com I-10-I raios, dentes pouco numerosos (≤ 20) fortemente diferenciados e em formato de colher, pré-molares reduzidos ou ausentes, lábios predominantemente filamentosos, lábio superior mais estreito do que o inferior, com muitas prolongações membranosas (Rapp Py-Daniel, 1997; Covain e Fisch-Muller, 2007; Covain *et al.*, 2008). Essa subtribo é composta pelos gêneros *Apistoloricaria*, *Crossoloricaria*, *Rhadinoloricaria*, *Dentectus*, *Pseudohemiodon*, *Pixiloricaria*, *Planiloricaria*, *Reganella*, *Ricola*, *Brochiloricaria*, *Loricaria*, *Planiloricaria*,

Dasylicaria, *Spatuloricaria*, *Furcodontichthys*, *Hemiodontichthys*, *Loricariichthys*, *Limatulichthys*, *Ixiandria*, *Pseudoloricaria* e *Rineloricaria* (considerando *Hemiloricaria*, *Leliella* e *Fonchiiichthys* como sinônimos juniores) (Covain e Fisch-Muller, 2007), sendo *Rineloricaria* o gênero mais especioso e tido como o mais complexo taxonomicamente.

A primeira hipótese filogenética para algumas espécies do gênero *Rineloricaria* foi apresentada por Rapp Py-Daniel (1997), onde também foi proposto o parafiletismo do gênero. Segundo o autor, a primeira espécie a divergir de todo o clado foi *R. lima*, a espécie-tipo do gênero, o que implicaria em mudanças drásticas na taxonomia do grupo. Entretanto, o holótipo de *R. lima* é perdido e sua localidade-tipo é questionada, o que dificulta a proposta e a aceitação de tais rearranjos taxonômicos pela comunidade científica. Atualmente acredita-se que essa espécie tenha sido coletada nas drenagens litorâneas do sudeste do Brasil (Fichberg, 2008; Rosa *et al.*, 2011).

Fichberg (2008), em sua filogenia, confirmou a monofilia de *Rineloricaria* (incluindo *Leliella*, *Hemiloricaria* e *Fonchiiichthys* como sinônimos) sustentada por 12 sinapomorfias, na maioria das vezes não exclusivas. No mesmo trabalho foi encontrado e descrito o único caráter diagnóstico exclusivo que sustenta *Rineloricaria*: “a presença de um processo desenvolvido no quarto faringo”. Embora o monofiletismo de *Rineloricaria* tenha sido constatado, pouco se esclareceu sobre as relações filogenéticas interespecíficas.

Grande parte dos trabalhos sobre *Rineloricaria* se referem à descrição de novas espécies, sem necessariamente existir uma análise filogenética entre elas. Atualmente o gênero possui 65 espécies válidas (Covain e Fisch-Muller, 2007; Ferraris, 2007; Rodriguez e Reis, 2008; Rapp Py-Daniel e Fichberg, 2008; Ghazzi, 2008; Ingenito *et al.*, 2008; Fichberg e Chamon, 2008; Rodriguez e Miquelarena, 2008). Por outro lado grupos fenéticos sempre foram descritos dentro de *Rineloricaria* geralmente baseados em caracteres de dimorfismo

sexual ou outros caracteres de morfologia externa (Isbrücker *et al.*, 2001; Rodriguez e Reis, 2008). Mesmo sabendo que tais agrupamentos podem não ser naturais, estes também são utilizados na escolha de materiais comparativos em trabalhos de descrição.

Rineloricaria é um dos gêneros de peixes neotropicais de água doce com maior distribuição, ocupando a maioria das principais drenagens desde o Panamá até a Argentina, além de ocupar uma grande variedade de habitats. Sempre associado ao substrato - seja ele rochoso, arenoso ou de matéria orgânica como galhos, raízes ou folhas submersas – as espécies desse gênero ocupam desde regiões de correnteza forte até regiões de lagos. A profundidade em que se encontram as espécies também varia muito, sendo que algumas ocupam leitos principais de grandes drenagens e outras ocupam preferencialmente pequenos riachos (Reis e Cardoso, 2001; Fichberg e Chamon, 2008)

Devido à variedade de habitats em que as espécies do gênero se distribuem, *Rineloricaria* possui uma grande variedade de formas, cores e estratégias de vida. Existem espécies de *Rineloricaria* que são diferenciadas por pequenas alterações morfológicas, como por exemplo *R. baliola* com *R. microlepidogaster* e *R. cadeae* com *R. longicauda* (Rodriguez e Reis, 2008), mas por outro lado existe grande variabilidade morfológica dentro de algumas espécies, como por exemplo variação na cobertura de placas abdominais em populações de *R. microlepidogaster* (Rodriguez e Reis, 2008). Essas pequenas diferenças interespecíficas e grandes diferenças intraespecíficas dificultam a descrição das espécies.

Rineloricaria é comumente definida por apresentar a seguinte combinação de caracteres: uma grande placa pré-anal poligonal normalmente circundada por placas trapezoidais, acentuado dimorfismo sexual secundário, papilas pequenas e arredondadas no lábio inferior, entalhe pós-orbital, sete a quinze dentes em cada pré-maxilar, dentes do dentário fortes, profundamente bicuspidados e maiores do que os da pré-maxilar e odontódios

e cerdas rostrais mais desenvolvidas nos machos reprodutivos (Reis e Cardoso, 2001; Rapp Py-Daniel e Fernandes, 2005; Covain e Fisch-Muller, 2007; Fichberg e Chamon, 2008). Cabe ressaltar que nenhum desses caracteres é exclusivo de *Rineloricaria*.

Mesmo sabendo-se dessa ampla distribuição e dos problemas quanto à taxonomia do gênero *Rineloricaria*, o último trabalho de revisão do gênero foi Regan (1909). Depois disso apenas alguns trabalhos que se propunham a fazer revisões regionais das espécies do gênero foram publicados, como é o caso de Rodriguez e Reis (2008), Ghazzi (2008) e Vera-Alcaráz *et al.* (2012).

Diante dessa grande complexidade, tanto taxonômica como filogenética e dos impasses recentes quanto à validação de gêneros como *Hemiloricaria* e *Fonchiiichthys*, no presente trabalho elaborou-se uma hipótese filogenética com base em caracteres moleculares, que buscou o redimensionamento de *Rineloricaria*, além de elucidar aspectos evolutivos do gênero sob uma perspectiva biogeográfica e ecomorfológica.

OBJETIVO

O objetivo principal deste estudo foi elaborar uma hipótese de relacionamento entre as espécies do gênero *Rineloricaria*. Como objetivos complementares buscou-se elaborar uma hipótese biogeográfica que explicasse a atual distribuição das espécies do gênero, bem como gerar um banco de sequências de genes mitocondriais e nucleares do maior número de espécies de *Rineloricaria* e de gêneros relacionados.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Inicialmente, 197 amostras de *Rineloricaria* foram analisadas pelo método de DNA *Barcoding* e, a partir dessa análise, pudemos selecionar os haplótipos que utilizamos na reconstrução filogenética. Um total 163 amostras de Loricariinae foram utilizadas para as análises filogenéticas, sendo nove do grupo externo e 154 do grupo interno (Tabela 2), cujos tecidos e vouchers encontram-se depositados no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP-Botucatu. O grupo interno é composto de 35 espécies válidas e cinco espécies morfológicamente similares a espécies válidas do gênero. Também foram amostradas 13 espécies que apresentam diferenças morfológicas das espécies nominais e que possivelmente se tratam de espécies não descritas formalmente. Essas espécies estão identificadas como *Rineloricaria* sp. 1 a *Rineloricaria* sp. 13.

Tabela 2: lista das amostras analisadas, com os segmentos obtidos para cada uma delas. *representam as amostras cedidas pelos MCP (RS), ** representa as amostras cedidas pelo NUPELIA, (X) representam os seguimentos gênicos obtidos e analisados no presente trabalho.

ESPÉCIE	LOTE	TECIDO	BACIA	LOCALIDADE	COORDENADA	COI	CitB	12-16s	F-Reticulon 4
<i>Brochiloricaria macrodon</i>	5048	24033	Rio Taquari/ Rio Paraguai	Coxim--MT	S 18°31' W 54°44'	X	-	X	X
<i>Farlowella</i> sp.	4043	22907	Rio Juruá/ Amazonas	Cruzeiro do Sul--AC	S 7°37'20.0" W 72°47'42.2"	X	-	X	X
<i>Harttia leiopleura</i>	2121	21363	Rio Paraitinga/ Rio Paraíba do Sul	Campos da Cunha--SP	S 22°52'13.0" W 44°51'02.8"	X	-	X	X
<i>Lamontichthys filamentosus</i>	162	4038	Rio Acre/ Amazonas	Rio Branco--AC	S 10°03,320' W 67°51,450'	X	-	X	X
<i>Loricaria</i> sp.	169	4032	Rio Acre/ Amazonas	Rio Branco--AC	S 10°03,320' W 67°51,450'	X	-	X	X
<i>Loricariichthys platymetopon</i>	3094	19255	Rio Baía/ Rio Paraná	Batayporã--MS	S 22°43'19.4" W 53°17'11.3"	X	X	X	X
<i>Pseudohemiodon</i> sp.	163	4060	Rio Acre/ Amazonas	Rio Branco-AC	S 10°03,320' W 67°51,450'	X	-	X	X
<i>Rineloricaria aequalicuspis</i>	8943	41701	Rio Cerrito	Maquiné--RS	S 29°34'14" W 50°15'50"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria aequalicuspis</i>	14482	60668	Costeiro Atlântico	Maquiné--RS	S 29°43'13.9" W 50°11'55.2"	X	X	X	-
<i>Rineloricaria aequalicuspis</i>	14482	60669	Costeiro Atlântico	Maquiné--RS	S 29°43'13.9" W 50°11'55.2"	X	X	X	-
<i>Rineloricaria</i> aff. <i>cadeae</i>	11422	51142	Rio Uruguai	São Miguel das Missões--RS	S 28°41'42.4" W 54°22'39.5"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> aff. <i>cadeae</i>	11432	51152	Rio Jacuí	Agudo--RS	S 29°33'53.3" W 53°17'07.9"	X	-	X	X
<i>Rineloricaria</i> aff. <i>latirostris</i>	5168	26332	Tietê/Paraná	Itatinga,-SP	S 23°13'50" W 48°31'58"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> aff. <i>latirostris</i>	5168	26333	Tietê/Paraná	Itatinga-SP	S 23°13'50" W 48°31'58"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> aff. <i>microlepidogaster</i>	11421	51141	Rio Uruguai	São Miguel das Missões--RS	S 28°41'42.4" W 54°22'39.5"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> aff. <i>microlepidogaster</i>	11416	51116	Rio Uruguai	Paim Filho--RS	S 27°43'00.7" W 51°44'18.8"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> aff. <i>morrowi</i>	Não Tombada	52978	Purus/ Amazonas	Rio Branco--AC		X	-	-	-

ESPÉCIE	LOTE LBP	TECIDO LBP	BACIA	LOCALIDADE	COORDENADA	COI	CitB	12-16s	F-Reticulon 4
<i>Rineloricaria aff. morrowi</i>	Não Tombada	52979	Purus/Amazonas	Rio Branco--AC		X	-	-	-
<i>Rineloricaria anhangupitan</i>	11413	51131	Rio Cará/ Uruguai	Cacique Duple--RS	S 27°46'44.8" W51°39'31.7"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria anhangupitan</i>	11417	51163	riacho s/ nome/Rio Uruguai	Ibiãça--RS	S 28°02'39.3" W51°46'12.4"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria anitae</i>	11410	51129	Rio São João/ Uruguai	Campos Novos--SC	S 27°23'31.3" W51°09'30.7"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria aurata</i>	10615	41710	Igarapé Quinoá	Rio Branco--AC	S 09°56'31.0" W 67°53'46.2"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria aurata</i>	10564	41711	Igarapé próximo a São Francisco	Rio Branco--AC	S 09°55'52.9" W 67°53'07.8"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria aurata</i>	Não Tombada	a definir	Igarapé do Meio--Rio Guamá	Tracuateua Vila Mirasselas	S1° 5' 56.30" W46° 57' 41.60"	X	-	X	-
<i>Rineloricaria aurata</i>	Não Tombada	52987	Tapajós/Amazonas			X	-	-	-
<i>Rineloricaria aurata</i>	Não Tombada	52988	Tapajós/Amazonas			X	-	-	-
<i>Rineloricaria aurata</i>	681	8022	Rio Pirai/Prata	Região de Rombado--MT	S 16°25,680' W 56°25,143'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria aurata</i>	9160	36244	Lagoa Margina rio Cuiabá	Barão de Melgaço--MT	S 16°11'39.5" W 55°48'25.1"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria aurata</i>	11176	47903	Ribeirão dos Veados/Paraguai	Coxim--MS	S 18°42.338' W 54°83.472'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria aurata</i>	11176	47904	Ribeirão dos Veados/Paraguai	Coxim--MS	S 18°42.338' W 54°83.472'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria aurata</i>	11174	47905	Rio Guaporé/Amazonas	Vila Bela da Santíssima Trindade--MT	S 14°96.904' W 59°98.319'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria aurata</i>	11175	47908	Rio Guaporé/Amazonas	Vila Bela da Santíssima Trindade--MT	S 15°01.0642" W 59°95.762'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria baliola</i>	14684	61394	Rio Jacuí	Cruz Alta--RS	S 28°54'30.1" W 53°17'10.7"	X	-	X	-
<i>Rineloricaria baliola</i>	14684	61400	Rio Jacuí	Cruz Alta--RS	S 28°54'30.1" W 53°17'10.7"	X	-	-	-
<i>Rineloricaria cadeae</i>	3336	20466	Costeira Atlântico	Rio Grande--RS	S 32°09'06.9" W 52°06'24.2"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria cadeae</i>	9159	21283	Arroio dos Corrientes	Pelotas--RS	S 31°28'46.3" W 52°12'46.9"	X	X	X	X

ESPÉCIE	LOTE LBP	TECIDO LBP	BACIA	LOCALIDADE	COORDENADA	COI	CitB	12-16s	F-Reticulon 4
<i>Rineloricaria cadeae</i>	8946	41704	Rio Jacuí/costeira	Jacuí--RS	S 29°31'35" W 53°18'08"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria capitania</i>	11418	51132	Tributario do Uruguai	Condor--RS	S 28°12'30.3" W 53°27'25.7"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria capitania</i>	11415	51136	Tributario do Uruguai	Ijuí--RS	S 28°12'53.8" W 53°26'11.0"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria caracacensis</i>	9986	43540	Orinoco	Caicara del Orinoco-- Bolívar	N 7°37'53.2" W 66°09'14.6"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria caracacensis</i>	9986	43541	Orinoco	Caicara del Orinoco-- Bolívar	N 7°37'53.2" W 66°09'14.6"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria caracacensis</i>	9986	43542	Orinoco	Caicara del Orinoco-- Bolívar	N 7°37'53.2" W 66°09'14.6"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria cf. wolfei</i>	11177	47910	Rio Jaci-Paraná	Porto Velho--RO	S 09°15'23.3" W 64°23'13.6"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria cf. wolfei</i>	11181	47917	Rio Lajeado/Madeira	Guajará Mirim--RO	S 10°44.1568" W 65°34.434'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria cf. wolfei</i>	11184	47926	Afluente rio Abunã	Porto Velho--RO	S 09°66.0115" W 65°37.2148"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria cf. wolfei</i>	11188	47937	Rio Quinta2	Porto Velho--AM	S 9°03'40.6" W 64°01'16.3"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria cubataonis</i>	2036	13818	Rio Canela	Joinville--SC	S 26°10'35.4" W 48°54'37.0"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria fallax</i>	11183	47923	Madeira/Amazonas	Guajará Mirim--RO	S 10°13'54.4" W 65°16'58.8"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria fallax</i>	11183	47924	Madeira/Amazonas	Guajará Mirim--RO	S 10°13'54.4" W 65°16'58.8"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria fallax</i>	11187	47933	Madeira/Amazonas	Humaitá--AM	S 8°11'46" W 63°51'48"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria hasemani</i>	7061	34185	Negro/Amazonas	São Gabriel da Cachoeira--AM	N 00°02.975' W 66°38.365'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria hasemani</i>	7061	34186	Negro/Amazonas	São Gabriel da Cachoeira--AM	N 00°02.975' W 66°38.365'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria heteroptera</i>	1731	12864	Rio Urubuí/Rio Amazonas	Presidente Figueiredo-- AM	S 01°59'39.3" W 60°01'40.3"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria heteroptera</i>	1731	12865	Rio Urubuí/Rio Amazonas	Presidente Figueiredo-- AM	S 01°59'39.3" W 60°01'40.3"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria jaraguensis</i>	730	8369	Ribeirão Cavallo/ Atlântico	Jaraguá do Sul--SC	S 21°14'07.4' W 43°30'50.5"	X	X	X	-

ESPÉCIE	LOTE LBP	TECIDO LBP	BACIA	LOCALIDADE	COORDENADA	COI	CitB	12-16s	F-Reticulon 4
<i>Rineloricaria jaraguensis</i>	3633	21659	Ribeirão Cavalão/ Atlântico	Jaraguá do Sul--SC	S 26°28'17.2" W 49°10'55.1"	X	X	-	-
<i>Rineloricaria jaraguensis</i>	3633	21662	Ribeirão Cavalão/ Atlântico	Jaraguá do Sul--SC	S 26°28'17.2" W 49°10'55.1"	X	X	-	-
<i>Rineloricaria jaraguensis</i>	728	8265	Rio Itapucu/ Atlântico	Jaraguá do Sul--SC	S 26°26,812' W 49°09.908'	X	X	X	-
<i>Rineloricaria kronei</i>	771	8536	Rio Marumbi/ Atlântico	Morretes--PR	S 25°29,197' W 48°49,978'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria kronei</i>	771	8535	Rio Marumbi/ Atlântico	Morretes--PR	S 25°29,197' W 48°49,978'	X	X	X	-
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	1557	11501	Araguaia/Amazonas	Barra do Garça--MT	S 15°29'57.3" W 52°12'10.4"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	1557	11503	Araguaia/Amazonas	Barra do Garça--MT	S 15°29'57.3" W 52°12'10.4"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	1557	11504	Araguaia/Amazonas	Barra do Garça--MT	S 15°29'57.3" W 52°12'10.4"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	2433	16282	Araguaia/Amazonas	Barra do Garça--MT	S 15°40'57.7" W 52°13'24.8"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	4051	22930	Rio Juruá/Amazonas	Cruzeiro do Sul--AC	S 7°37'20.0" W 72°47'42.2"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	4367	24135	Igarapé Água Azul/Amazonas	Mucajai--RR	N 02°18'02.0" W 60°55'20.7"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	4367	24136	Rio branco/Amazonas	Mucajai--RR	N 02°18'02.0" W 60°55'20.7"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	8537	38076	Rui seputuba/ Paraguai	Nova Fernadópolis--MT	14 56"54.6' 57 44"11.3"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	12199	41709	Rio Acre/Amazonas	Rio Branco--AC	S 09°56'31.0" W 67°53'46.2"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	9073	42671	Rio Guamá/Amazonas	Ourém--PA	S 01°34'28.3" W 47°02'03.5"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	11173	47901	Ribeirão dos Veados/Paraguai	Coxim--MS	S 18°42.338' W 54°83.472'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	11173	47902	Ribeirão dos Veados/Paraguai	Coxim--MS	S 18°42.338' W 54°83.472'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	11178	47911	Madeira/Amazonas	Porto Velho--RO	S 09°61.7900" W 64°93.339'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	11182	47918	Madeira/Amazonas	Guajará Mirim--RO	S 10°44.1568" W 65°34.434'	X	X	X	X

ESPÉCIE	LOTE LBP	TECIDO LBP	BACIA	LOCALIDADE	COORDENADA	COI	CitB	12-16s	F-Reticulon 4
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	13732	57003	Rio Tapajós/Amazonas	Itaituba--PA	S 04°29'11.1" W 56°17'22.1"	X	X	X	-
<i>Rineloricaria langei</i>	2028B	13886	Rio Garuva/Atlântico	Garuva--SC	S 26°00'09.2" W 48°51'56.6"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria langei</i>	2047	13959	Rio Garuva/Atlântico	Garuva--SC	S 26°00'14.2" W 48°52'05.9"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria langei</i>	2070	14396	Rio Nhundiaquara/Atlântico	Morretes--PR	S 25°27'29.4" W 48°50'05.0"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria langei</i>	2082	14424	Rio Sagrado/Atlântico	Morretes--PR	S 25°33'17.4" W 48°48'02.5"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria langei</i>	3657	21720	Rio Passa Sete/Atlântico	Morretes--PR	S 25°31'14.9" W 48°47'52.7"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria langei</i>	7157	34312	Ribeirão Jacarei/Atlântico	Matinhos--PR	S 25°32'23.4" W 48°41'19.2"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria langei</i>	11401	51111	Rio Piraquara/Iguaçu	Curitiba--PR	S 25°28'49.0" W W49°06'10.2"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria langei</i>	11401	51112	Rio Piraquara/Iguaçu	Curitiba--PR	S 25°28'49.0" W W49°06'10.2"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria latirostris</i>	2949	19533	Rio Grande/Rio Paraná	Colômbia--SP	S 20°14'10.2" W 48°40'42.0"	X	-	X	-
<i>Rineloricaria latirostris</i>	Não Tombada	38088	Rio Tietê/Paraná	Marapuama--SP		X	-	X	X
<i>Rineloricaria cf. lima</i>	4949	7930	Rio Paraíba do Sul	Bananal--SP	S 22°49,107' W 44°27,769'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria cf. lima</i>	802	7940	Rio Paraíba do Sul	Bananal--SP	S 22°49,107' W 44°27,769'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria cf. lima</i>	6351	29876	Paraíba do Sul	Pindamonhangaba--SP	S 22°47'08.4" W 45°27'20.2"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria cf. lima</i>	10716	49671	Rio Marambaia/Paraíba do Sul	Queluz--SP	S 22°30'16.5" W 44°44'23.1"	X	-	X	-
<i>Rineloricaria cf. lima</i>	10716	49673	Rio Marambaia/Paraíba do Sul	Queluz--SP	S 22°30'16.5" W 44°44'23.1"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria cf. lima</i>	6318	29377	Ribeirão Água Santa /Rio Paraíba do Sul	São José dos Barreiros--SP	S 22°39'19.6" W 44°34'44.0"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria cf. lima</i>	6453	29139	Rio Paraíba do Sul	Guararema--SP	S 23°21'38.2" W 45°59'69.0"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria longicauda</i>	7564	21282	Arroio dos Corrientes/Atlântico	Pelotas--RS	S 31°28'46.3" W 52°12'46.9"	X	X	X	X

ESPÉCIE	LOTE LBP	TECIDO LBP	BACIA	LOCALIDADE	COORDENADA	COI	CitB	12-16s	F-Reticulon 4
<i>Rineloricaria longicauda</i>	8944	41702	Arroio Arambaré/ Atlântico	São Gonçalo--RS	S 31°51'51" W 52°49'24"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria longicauda</i>	14494	60699	Costeira/ Atlântico	Palmares do Sul--RS	S 30°19'03.8" W 50°29'16.4"	X	-	-	-
<i>Rineloricaria longicauda</i>	14494	60700	Costeira/ Atlântico	Palmares do Sul--RS	S 30°19'03.8" W 50°29'16.4"	X	X	-	-
<i>Rineloricaria maackii</i>	11402	51107	Rio Iguaçu	São Mateus do Sul-PR	S 25°47'11.0" W 50°13'40.0"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria maackii</i>	11403	51108	Rio Iguaçu	Paulo Frontin-PR	S 26°00'01.3" W 50°51'44.4"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria malabarbai</i>	8950	41708	Arroio do Tigre/ costeira	Jacuí-RS	S 29°29'25" W 53°28'45"	X	X	X	-
<i>Rineloricaria microlepidogaster</i>	8947	41705	Rio Jacui	Jacuí-RS	S 29°36'02" W 53°16'49"	X	X	X	-
<i>Rineloricaria microlepidogaster*</i>	Números da PUC RS	22176	Arroio sem nome/ Atlântico	Ernestina-RS	28.495833,- 52.5925	X	-	X	-
<i>Rineloricaria morrowi</i>	10641	41712	Igarapé do Iquiri/Amazonas	Rio Branco-AC	S 10°04'44.3" W 67°32'33.9"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria morrowi</i>	10641	41713	Igarapé do Iquiri/ Amazonas	Rio Branco-AC	S 10°04'44.3" W 67°32'33.9"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria nigricauda</i>	6465	29101	Rio Paraíba do Sul	Guararema-SP	S 23°22'08.5" W 46°01'28.3"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria nigricauda</i>	11400	51101	Rio Macucu/ paraiba	Cordeiro-RJ do sul	S 21°59'37.1" W 42°16'41.4"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria nigricauda</i>	11400	51102	Rio Macucu/ Paraíba do Sul	Cordeiro-RJ	S 21°59'37.1" W 42°16'41.4"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria nigricauda</i>	6444	29081	Rio Paraíba do Sul	Guararema-SP	S 23°22'26.2" W 46°03'10.6"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria nigricauda</i>	6459	29119	Rio Paraíba do Sul	Guararema-SP	S 23°21'45.7" W 45°59'26.2"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria osvaldoi</i>	1650	11818	Rio Vermelho/ Araguaia	Goiás-GO	S 15°55'01.5" W 50°07'43.3"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria parva</i>	9160	36245	Lagoa Margina rio Cuiabá	Barão de Melgaço-MT	S 16°11'39.5" W 55°48'25.1"	X	X	X	-
<i>Rineloricaria parva</i>	8471	38071	Rio Paraguai	Cáceres- MT	S 16°03'50.7" W 57°42'29.8"	X	X	X	-
<i>Rineloricaria parva*</i>	Números da PUC RS	21616	Uruguiana	Uruguai		X	-	X	-

ESPÉCIE	LOTE LBP	TECIDO LBP	BACIA	LOCALIDADE	COORDENADA	COI	CitB	12-16s	F-Reticulon 4
<i>Rineloricaria pentamaculata</i>	6390	29769	Rio Tibagi	Califórnia-PR	S 23°40.915' W 51°18.913'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria pentamaculata</i>	6390	29770	La Plata Basin/Rio Tibagi	Califórnia-PR	S 23°40.915' W 51°18.913'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria pentamaculata</i>	6390	29772	La Plata Basin/Rio Tibagi	Califórnia-PR	S 23°40.915' W 51°18.913'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria pentamaculata**</i>	11434	50971	Ribeirão Andirá/Rio Paraná	Ivaí-PR		X	X	X	X
<i>Rineloricaria pentamaculata**</i>	11434	50972	Ribeirão Andirá/Rio Paraná	Ivaí-PR		X	X	X	X
<i>Rineloricaria phoxocephala</i>	11185	47927	Purus/Amazonas	Humaitá-AM	S 07°31'19.9" W 63°20'50.6"	X	-	X	X
<i>Rineloricaria quadrensis</i>	8945	41703	Lagoa Fortaleza	Tramandaí-RS	S 30°09'02" W 50°14'39"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria rupestris</i>	6135	29526	Rio Santa Rosa/Lago Maracaibo	Machiques de Perijá-Zulia- Venezuela	N 09°38'53.8' W 72°34'56.4"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria sp.1</i>	4343	24076	Igarapé do Cajual/Rio Amazonas	Boa Vista-RR	N 03°11'00.8" W 60°33'20.0"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria sp. 1</i>	4343	24075	Rio branco / Rio Amazonas	Boa Vista-RR	N 03°11'00.8" W 60°33'20.0"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria sp. 2</i>	4409	24247	Rio Negro/Amazonas	Barcelos-AM	S 00°55'30.0" W 62°51'51.4"	X	-	X	X
<i>Rineloricaria sp. 2</i>	4409	24248	Rio Negro/Amazonas	Barcelos-AM	S 00°55'30.0" W 62°51'51.4"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	4878	25653	Rio Negro/Amazonas	Barcelos-AM	S 00°53'14.8" W 63°02'49.5"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	7048	34141	Rio Negro/Rio Amazonas	São Gabriel da Cachoeira -AM	N 00°16.259' W 66°38.365'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria sp. 3</i>	7048	23513	Rio Negro/Rio Amazonas	São Gabriel da Cachoeira-AM	N 00°16.259' W 66°38.365'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria sp. 4</i>	4085	23513	Rio Moa/Rio Juruá	Mâncio Lima-AC	S 07°34'28.8' W 72°55'24.9"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria sp. 5</i>	9080	42669	Rio Guamá/Amazonas	Ourém-PA	S 01°34'28.3" W 47°02'03.5"	X	X	X	-
<i>Rineloricaria sp. 5</i>	9084	42686	Rio Guamá/Amazonas	Ourém-PA	S 01°34'17.0" W 47°10'10.5"	X	X	X	-
<i>Rineloricaria sp. 6</i>	14125	59109	Rio Amazonas/Rio Tapajós	Itaituba-PA	S 04°47'24.1" W 56°46'39.5"	X	X	X	

ESPÉCIE	LOTE LBP	TECIDO LBP	BACIA	LOCALIDADE	COORDENADA	COI	CitB	12-16s	F-Reticulon 4
<i>Rineloricaria</i> sp. 7	7949	37294	Arinos/Tapajós/Amazonas	Nova Mutum-MT	S 13°48'03.1" W 56°01'38.4"	X	X	-	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 7	7965	37320	Arinos/Tapajós/Amazonas	Nova Mutum-MT	S 13°48'13.2" W 56°09'25.5"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 7	7965	37321	Arinos/Tapajós/Amazonas	Nova Mutum-MT	S 13°48'13.2" W 56°09'25.5"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 7	8617	38081	Rio Arinos/ Tapajós/ Amazonas	Diamantino- MT	S 14°08'39.8' W 56°05'48.6"	X	X	X	-
<i>Rineloricaria</i> sp. 7	13874	57379	Rio Amazonas/Rio Tapajós/ Rio Tracua	Itaituba-PA	S 04°37'28.0" W 56°23'18.0"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 8	9495	43536	Córrego santa Rita/ São Francisco	Formosa- Go	S 15°34'53.7' W 47°20'34.6"	X	-	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 8	9495	43537	Córrego santa Rita/ São Francisco	Formosa- Go	S 15°34'53.7' W 47°20'34.6"	X	-	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 9	3262	20051	Bacia Rio Pozuzo/Ucayali	Pozuzo-Pasco-Peru	S 10°02'20.4" W 075°34'55.4"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 9	3262	20052	Bacia Rio Pozuzo/Ucayali	Pozuzo-Pasco Peru	S 10°02'20.4" W 075°34'55.4"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 9	3273	20083	Bacia Rio Pozuzo/Ucayali	Pozuzo-Pasco Peru	S 10°02'57.6" W 075°32'28.8"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 10	728	8266	Rio Itapucu/ Atlântico	Jaraguá do Sul-SC	S 26°26,812' W 49°09.908'	X	X	-	X
<i>Rineloricaria</i> sp.11	9162	21658	Ribeirão Cavalo/ Atlântico	Jaraguá do Sul-SC	S 26°28'17.2" W 49°10'55.1"	X	X	-	-
<i>Rineloricaria</i> sp.11	9162	21661	Ribeirão Cavalo/ Atlântico	Jaraguá do Sul-SC	S 26°28'17.2" W 49°10'55.1"	X	-	-	-
<i>Rineloricaria</i> sp. 12	2128	21376	Riacho Sítio do Meio/ Atlântico	Mongaguá-SP	S 24°05'11.7" W 46°43'59.5"	X	-	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 12	1248	11176	Ribeirão Grande/ Atlântico	Miracatu-SP	S 18°42.338' W 54°83.472'	X	-	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 12	2128	21378	Costeira/ Atlântico	Mongaguá-SP	S 24°05'11.7" W 46°43'59.5"	X	X	X	-
<i>Rineloricaria</i> sp. 12	2134	21396	Rio do Peixe/ Ribeira de Iguape	Pedro de Toledo-SP	S 24°16'35.5" W 47°13'33.2"	X	-	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 12	7487	35583	Rio Ribeira de Iguape	Registro-SP	S 24°23'29.8" W 47°50'06.6"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 12	8222	38083	Costeira/Atlântico	Mongaguá-SP	S 24°06'02.9" W 46°43'51.2"	X	X	X	X

ESPÉCIE	LOTE LBP	TECIDO LBP	BACIA	LOCALIDADE	COORDENADA	COI	CitB	12-16s	F-Reticulon 4
<i>Rineloricaria</i> sp. 12	2134	21394	Rio do Peixe/ Ribeira de Iguape	Pedro de Toledo-SP	S 24°16'35.5" W 47°13'33.2"	X	-	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 13	6832	33084	Rio Fau/ Ribeira de Iguape	Miracatu-SP	S 24°12,441' W 47°28,616'	X	X	X	X
<i>Rineloricaria</i> sp. 13	6832	33085	Rio Fau/ Ribeira de Iguape	Miracatu-SP	S 24°12,441' W 47°28,616'	X	-	X	X
<i>Rineloricaria stelatta</i>	11419	51170	Rio Uruguai	Augusto Pestana-RS	S 28°32'03.2" W 53°58'03.9"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria strigilata</i>	8941	41699	Rio Jacui/Atlântica	Jacuí -RS	S 29°26'49" W 53°15'36"	X	X	X	-
<i>Rineloricaria strigilata</i>	3384	21279	Arroio dos Corrientes/Atlântica	Pelotas-RS	S 31°28'46.3" W 52°12'46.9"	X	X	X	-
<i>Rineloricaria tropeira</i>	11404	51121	Rio Uruguai	Rufino-SC	S 27°51'45.6" W 49°47'05.4"	X	X	X	-
<i>Rineloricaria tropeira</i>	11409	51123	Rio São João/ Uruguai	Campos Novos-SC	S 27°23'31.3" W 51°09'30.7"	X	X	X	X
<i>Rineloricaria uracantha</i>	2762	18551	Río Llano Sucio/ Atlântico	Santa Rita Arriba-Colón Panamá	N 09°19'26.2" W 79°46'08.2"	X	-	X	X
<i>Rineloricaria uracantha</i>	2762	18552	Río Llano Sucio/ Atlântico	Santa Rita Arriba-Colón Panamá	N 09°19'26.2" W 79°46'08.2"	X	-	X	X
<i>Rineloricaria zaina</i>	11412	51158	Córrego do Leão/ urugai	Palmitinho-RS	S 27°20'21.6" W 53°37'26.9"	X	X	X	X
<i>Spatuloricaria</i> sp.	5049	11506	Rio das Mortes/Araguaia	Barra do Garça-MT	S 15°29'57.3" W 52°12'10.4"	X	-	X	X
<i>Sturisoma</i> sp.	161	4046	Rio Acre/Amazonas	Rio Branco-AC	S 10°03,320' W 67°51,450'	X	-	X	X

Métodos

Obtenção, preservação e identificação das amostras.

Para obtenção do material foram realizadas diversas expedições de coleta em localidades da região Neotropical, sendo que a maioria delas ocorreu nos últimos seis anos (Figura 1). Nessas expedições, além de serem coletadas amostras de *Rineloricaria* e gêneros aparentados, também foram observadas algumas características referentes ao ambiente em que as espécies eram mais frequentemente encontradas. A caracterização do ambiente foi realizada levando em consideração o tipo de substrato em que os indivíduos estavam, variando entre rochas, areia e matéria orgânica submersa como galhos, folhas e raízes. Além disso, os ambientes também foram caracterizados quanto à velocidade da água, sendo classificados em ambiente de água rápida e lenta.

Após as coletas, parte do material foi fixada em etanol 95% e parte em formol 4%, garantindo assim que o material genético e as características morfológicas fossem bem preservados. Algumas das amostras foram cedidas por pesquisadores de outras instituições e essas estão em destaque na Tabela 2. A identificação do material cedido foi realizada pelos próprios pesquisadores e conferidas por nós em visitas às coleções onde elas se encontravam depositadas. A identificação foi realizada baseada em dados disponíveis na Literatura (Rodrigues e Reis, 2008; Fichberg e Chamon, 2008; Ingênito *et al.*, 2008; Vera-Alcaráz *et al.*, 2012; Ghazzi, 2008; Covain e Fisch-Muller, 2007) e com auxílio de especialistas, em especial da Dra. Mónica Sonia Rodríguez, co-orientadora do presente trabalho.

A técnica de *DNA barcoding* foi auxiliar na identificação, pois forneceu uma ideia prévia das espécies ou populações com possíveis problemas taxonômicos e de distribuição. Essa análise também foi utilizada para investigar a distância genética existente entre as

amostras analisadas. Uma vez estabelecidos os táxons terminais das análises, duas amostras de cada grupo foram utilizadas para amplificação e sequenciamento de todos os genes.

Extração de DNA Genômico

O DNA foi obtido a partir de amostras de músculo ou nadadeiras preservados em etanol 95%. A extração foi realizada com auxílio do *Kit* Comercial “*DNeasy Tissue Kit*”, Quiagen Peqlab®, segundo instruções do fabricante. Brevemente:

1. Aproximadamente 5 mg de tecido foram colocados em microtubos de 1,5 mL e incubados em “banho seco” (*Termoblock*) à 55°C por cerca de 25 minutos até a evaporação completa do etanol presente na amostra;

2. Após a secagem foram adicionados 180 µL do ATL buffer e 20 µL de Proteinase K (20 mg/mL), homogeneizando o tubo em vórtex;

3. Para a digestão completa do tecido, o tubo foi encubado em *termoblock* a 55°C, *overnight*;

4. Após a digestão, adicionou-se 200 µL de Tampão AL e 200 µL de EtOH 100%, homogeneizando-se sempre em vórtex;

5. O conteúdo do tubo (digestão) foi transferido para uma coluna acoplada a tubo coletor e centrifugado por 1 minuto a 10.000 rpm;

6. Após a transferência da coluna para um novo tubo coletor adicionou-se 500 µL de *Wash Buffer* 1 (preparado com etanol) na coluna; o material foi centrifugado por 1 minuto a 10.000 rpm e o líquido do tubo coletor descartado, mantendo-se a coluna;

7. Adicionou-se 500 µL de *Wash Buffer* 2 (preparado com etanol) na mesma coluna,

repetindo-se o procedimento de centrifugação;

8. A coluna vazia acoplada foi centrifugada por 2 minutos a 13.000 rpm, para a secagem completa da coluna;

9. Por fim, à coluna acoplada em um novo tubo adicionou-se 200 mL de *Elution Buffer*, centrifugando-se por 2 minuto a 10.000 rpm, obtendo-se assim o DNA.

Amplificação dos Segmentos de DNA.

As reações de amplificação foram realizadas com o *Kit OneTaqTM Hot Start* (BioLabs) sendo empregados os seguintes volumes e concentrações: 8,19 mL de água pura, 2,5 mL de tampão Standart da Taq, 0,25 mL (10 M) de *primer* direto, 0,25 mL (10 M) de *primer* reverso, 0,25 mL (2 mM) de dNTPs, 0,06 mL de *OneTaq* e 1 mL de DNA total na concentração de 10 ng/mL. Os *primers* utilizados estão listados na Tabela 3. Todo o produto amplificado foi checado em gel de agarose a 1%.

Amplificação dos genes mitocondriais.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) realizada para a amplificação de todos os genes mitocondriais teve um passo de desnaturação inicial de cinco minutos a 95°C, seguida da fase de ciclos: desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 54°C por 30 segundos e extensão a 68°C por 1 a 2,5 minutos (dependendo do tamanho do fragmento). Foram realizados 28 ciclos em cada amplificação e após esses uma extensão final foi realizada a 68°C durante 5 minutos. Os produtos da PCR foram estocados a 7°C até a purificação.

Amplificação do gene nuclear.

A amplificação do gene nuclear F-Reticulon4 foi realizada em duas etapas: na primeira foram utilizados os *primers* D e R (Tabela 3) seguindo-se os mesmos passos utilizados para a amplificação dos genes mitocondriais. O produto dessa primeira PCR foi diluído na proporção de 1/20 e esse foi utilizado na reação da segunda etapa (Nested PCR), utilizando-se os *primers* D2 e Rs (Tabela 3), também seguindo-se os mesmos passos das outras reações.

Purificação das amostras amplificadas.

A purificação dos produtos de PCR foi realizada através do *kit* ExoSap-IT[®] (USB Corporation) seguindo os procedimentos sugeridos pelo fabricante. Em resumo, 2,0 mL da enzima exosap foi adicionado a 5 mL do DNA amplificado (entre 80 e 120 ng/mL). Essa solução foi incubada a 37° C durante 15 minutos e a reação foi inativada elevando-se a temperatura a 80° C durante 15 minutos.

Tabela 3: *Primers* utilizados para a amplificação e sequenciamento dos segmentos de DNA. (*) representa os primers utilizados apenas para amplificação e não no sequenciamento.

Região e tamanho do fragmento	Nome	Referência	Sequência Do Primer
12S rDNA, 16S rDNA e transportados de valina entre eles ~ 2400 pb	Ans-D1	Claudio Oliveira (com. pessoal)	5'GTA TGA CAC TGA AGA TGT TA 3'
	An12S-D2	Covain, 2008	5'-GCC AGC TTA CCC TGT GAA GG-3'
	Lor12S-D3		5'-CCT CGT ACC TTT TGC ATC ATG-3'
	H3059	Covain, 2008	5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3'
COI 660 pb	Fish F1	Ward <i>et al.</i> , 2005	5' TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC 3'
	Fish R1		5' TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG GAA TCA 3'
CitB 1100 pb	LNF	Claudio Oliveira (com. pessoal)	5'GAC TTG AAA AAC CAY CGT TGT 3'
	H08R2		5'GCT TTG GGA GTT AGD GGT GGG AGT TAG AAT C 3'
F-Reticulon 4	* Freticul4-D (D)	Chiachio <i>et al.</i> ,	5' - AGG CTA ACT CGC TYT SGG CTT TG - 3'

Entre 1900 e 2600 pb	* Freticul4-R (R)	2008	5' - GGC AVA GRG CRA ART CCA TCT C - 3'
	Freticul4 D2 (D2)		5'- CTT TGG TTC GGA ATG GAA AC - 3'
	Freticul4 R2 (R2)		5'- AAR TCC ATC TCA CGC AGG A - 3'
	Freticul4 iR (iR)		5' -AGG CTC TGC AGT TTC TCT AG - 3'
	Freticul4 LiD (LiD)	Rodriguez <i>et al.</i> ,	5' - ATG ACC GTG AGC TGC CAG GC - 3'
	Freticul4 iD2 (iD2)	2011	5'- CAA CAT CAC YTG GAT TGA GG - 3'

Reação de PCR para Sequenciamento.

Para a reação de PCR de sequenciamento foi utilizado o kit “*Big DyeTM Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction*” (Applied Biosystems®). Nessa reação foi preparada uma solução com 3,55 mL de água pura, 1,05 mL de Tampão, 0,7 mL de *BigDye*, 0,7 mL de um dos *primers* e 1 mL do produto da amplificação purificada. Essa solução foi levada ao termociclador, realizando-se a reação de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 36 ciclos de reações: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 54°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Após esses ciclos foi realizada uma extensão final a 72° C por 4 minutos.

Para o sequenciamento dos genes 12s rDNA, 16s rDNA e F-Reticulon 4 foram utilizados não somente os mesmos *primers* da amplificação (no caso do F-Reticulon 4 os *primers* D2 e R2) como também foram utilizados os demais *primers* internos listados na Tabela 3. Isso foi necessário principalmente devido ao grande tamanho desses segmentos.

Limpeza do PCR de Sequenciamento.

Para a purificação do produto da reação de sequenciamento preparou-se uma solução com 2 µL do produto da reação, 0,7 µL de EDTA (125 mM), 0,7 µL de Acetato de sódio (3mM) e 17,5 µl de Etanol 100%. Essa mistura foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e depois levada a uma centrifugação de 15 minutos a 13000 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado realizada uma segunda lavagem, adicionando-se 24 µL de etanol 70% e centrifugando-se por 10 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi novamente descartado, o *pellet* novamente lavado e em seguida, após o descarte do sobrenadante, o material foi levado ao termociclador por 8 minutos a 96°C, com a tampa do microtubo aberta, para que não sobrassem resíduos de etanol, melhorando assim a qualidade da sequência.

As amostras limpas e secas foram armazenadas a temperatura ambiente e protegidas de umidade e de incidência direta da luz. O sequenciamento de cada segmento foi realizado em um sequenciador de capilar do modelo ABI3130 (Applied Biosystems®).

Análise dos dados.

Sequências consenso e confecção da matriz.

A edição das sequências consenso de cada gene foi realizada no programa ATGC (Genetix Inc). Após essas edições os indivíduos de uma mesma população foram comparados e para os que apresentaram diferenças foi realizado novo procedimento de sequenciamento, incluindo-se uma terceira amostra dessa mesma população. Além disso, foi checada a presença de *stopcodons* em todos os fragmentos codificantes, no programa SeqScape® Software v2.5 (Applied Biosystems®). Esses procedimentos foram adotados para minimizar a incidência de pseudogenes nas análises.

Para a confecção da matriz os genes foram trabalhados de forma independente e somente então os alinhamentos individuais dos genes foram concatenados, gerando uma só matriz. O alinhamento foi executado pelo algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) e correções manuais dos erros de alinhamentos evidentes foram realizadas no programa BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999). A matriz foi dividida em 11 partições, utilizando-se como critérios de separação o gene e a posição das bases de cada códon de todos os genes codificantes, enquanto que genes não-codificantes foram alocados em uma partição única. Para cada partição o melhor modelo de evolução nucleotídica foi estimado com o programa Modeltest 3.06 (Posada e Crandall, 1998). O teste de saturação foi realizado no Dambe 5.2.14 (Xia e Xie, 2001) tanto pelo método gráfico quanto pelos métodos de Xia *et al.* (2003) e Xia e Lemey (2009).

Análise de DNA *Barcoding*.

A análise de DNA *barcoding* foi utilizada na identificação de haplótipos e também na quantificação da distância genética intra e interespecífica em *Rineloricaria*. Essa análise foi realizada no programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) como o modelo de evolução nucleotídica de Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980). Nessa análise as mutações tiveram a mesma pesagem, independentemente da posição do gene e da posição dos códons em que elas ocorreram.

Análises filogenéticas.

Para a análise filogenética Bayesiana foi utilizado o programa MrBayes 1.3 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) com 20.10^6 gerações. Uma amostra de *Harttia leiopleura* foi colocada como raiz seguindo a filogenia de Rodriguez *et al.*, (2012). Os nós com valores de

probabilidade a posteriori inferiores a 95% foram colapsados. A análise de Máxima Verossimilhança particionada foi realizada pelo método de busca RAXML implementado no servidor online do CIPRES Science Gateway (<http://www.phylo.org>). Nessa análise foi utilizado o teste estatístico de *Bootstrap* (Felsenstein, 1985) com 1000 pseudoréplicas. Por fim, para a análise de Máxima Parcimônia foi utilizado o programa PAUP (Swofford, 2002), considerando a matriz como uma partição única. Como teste estatístico utilizou-se também o de *Bootstrap*, porém com 100 pseudoréplicas.

Análises biogeográficas.

Para a análise de relógio molecular foram utilizados os programas BEAUti v1.5.3 para a regar o script, Beast 1.5.3 (Drummond *et al.*, 2009) para a realização da análise de relógio molecular propriamente dita. Nessa análise foram selecionados como parâmetros o relógio relaxado do tipo log normal, modelo de substituição nucleotídico GTR (Tavaré, 1986) e *distribuição para kappa* do tipo de distribuição Normal, o TreeAnnotator v1.5.3 e o Tracer v1.5 para a estimativa e realização do *burning* respectivamente e por fim utilizou-se o FigTree v1.3.1. Como ponto de calibração utilizou-se o tempo de soerguimento da porção oeste dos Andes, datado em aproximadamente 12 milhões de anos (Ma) (Albert *et al.*, 2006), já que esse evento teria sido responsável por cladogêneses entre espécies cis e transandinas, no caso entre *Rineloricaria uracantha* e as demais espécies do grupo em que ela se encontra.

A análise de Lagrange foi realizada no Pyton 2.7.3 9 (Python Software Foundation) dividindo as regiões de onde foram obtidas as amostras de *Rineloricaria* em sete regiões biogeográficas, sendo: 1ª bacias do Amazonas, Orinoco e regiões Transandinas, 2ª bacia do Prata excluindo Alto Paraná, Alto Iguaçu e Alto Uruguai, 3ª bacia do Alto Paraná, 4ª bacia do Leste, que é composta pelo conjunto de bacias litorâneas compreendidas entre a foz do rio

Paraíba do Sul e a foz do rio da Prata, 5ª bacia do alto rio Iguaçu, 6ª bacia do alto Uruguai e 7ª bacia do São Francisco. Adotou-se que a restrição de fluxo ocorre apenas entre regiões não adjacentes.

Análises complementares no Grupo *Rineloricaria lanceolata*.

Foi realizada a análise de variáveis canônicas no programa Past version 2.16 (Hammer *et al.*, 2001) na tentativa de distinguir três populações distintas de *Rineloricaria lanceolata*. Para tanto foram tomadas medidas de 14 caracteres de morfologia externa de amostras de *R. lanceolata* das bacias dos rios Madeira, Araguaia e Sepetuba, totalizando 36 indivíduos. As medidas adotadas nessa comparação foram: comprimento padrão, comprimento pré-dorsal, comprimento pós-dorsal, largura cleitral, comprimento do espinho da nadadeira dorsal, altura do corpo na origem da nadadeira dorsal, largura do corpo na origem da nadadeira dorsal, largura do corpo na origem da nadadeira anal, largura da cabeça, altura da cabeça, distância do supraoccipital até a base da nadadeira dorsal, largura interorbital e largura internasal.

Análise ecomorfológica.

Para a análise da interação entre determinados padrões morfológicos presentes em *Rineloricaria* com os ambientes em que eles habitam, caracterizou-se os ambientes em três tipos básicos: ambiente de rocha, ambiente de areia e ambiente de vegetação.

Os ambientes de rocha são ambientes onde a velocidade do fluxo da água é grande e o leito é coberto por rochas de diferentes tamanhos. As *Rineloricaria* que habitavam esse tipo de ambiente eram encontradas sob ou sobre essas rochas. Os ambientes de areia são ambientes com o substrato variando em granulometria, de cascalho a argila e nesse ambiente as espécies

de *Rineloricaria* ficam em contato com a areia, algumas vezes parcialmente enterradas. Por fim, nos ambientes de vegetação o substrato em que as *Rineloricaria* ficavam aderidas variou bastante, sendo composto por restos de vegetações submersas, sejam eles troncos, gravetos, raízes ou folhas. Esse ambiente foi o mais heterogêneo dentre os analisados.

Para essa análise levou-se em consideração os caracteres e seus respectivos estados de caráter listados a seguir:

Caráter 1: forma do pedúnculo caudal.

- A. Espesso
- B. Achatado
- C. Afilado

Pedúnculos caudais espessos são aqueles em que o comprimento do pedúnculo caudal é relativamente pequeno e a altura do mesmo é relativamente grande. Já as espécies com pedúnculo caudal achatado possuem o pedúnculo caudal relativamente pequeno, com a largura do mesmo relativamente grande em relação à altura. Por fim, os pedúnculos caudais afilados são caracterizados por serem muito longos quando comparados à altura e largura do mesmo (Figura 2).

Caráter 2: forma da cabeça (margem em vista dorsal, entre os dois opérculos) (Fichberg, 2008) (Figura 2).

- A. Arredondada
- B. Triangular
- C. Alongada

Caráter 3: comprimento do barbilhão.

- A. Curto
- B. Médio

C. Grande

Foram considerados como barbilhões curtos aqueles que não atingem a margem do lábio inferior, barbilhões médios aqueles que atingem a margem do lábio inferior mas não a ultrapassa e barbilhões longos aqueles que ultrapassam a borda do lábio inferior (Figura 3).



Figura

Figura 1: Fotografias parciais de espécies de *Rineloricaria* destacando alguns dos caracteres utilizados nas análises ecomorfológicas. 1A: Pedúnculo caudal espesso em vista lateral e dorsal; 1B: Pedúnculo caudal achatado em vista lateral e dorsal; 1C: Pedúnculo caudal afilado em vista lateral e dorsal; 2A: vista dorsal de uma cabeça do tipo arredondada; 2B: vista dorsal de uma cabeça do tipo triangular; 2C: vista dorsal de uma cabeça do tipo alongada.

Caráter 4: número de séries de placas laterais (Rodriguez e Reis, 2008).

A. Quatro séries de placas laterais

B. Cinco séries de placas laterais

Caráter 5: profundidade da fenda labial.

A. Fenda labial rasa ou ausente

B. Fenda labial profunda

Quando presentes, a fenda labial se localiza imediatamente abaixo da base dos barbilhões. Essas fendas são flanqueadas por papilas e se estendem da borda lateral dos lábios até a cavidade oral (Figura 3).

O método de chi-quadrado foi utilizado para avaliar se cada ambiente possui seu próprio padrão de características

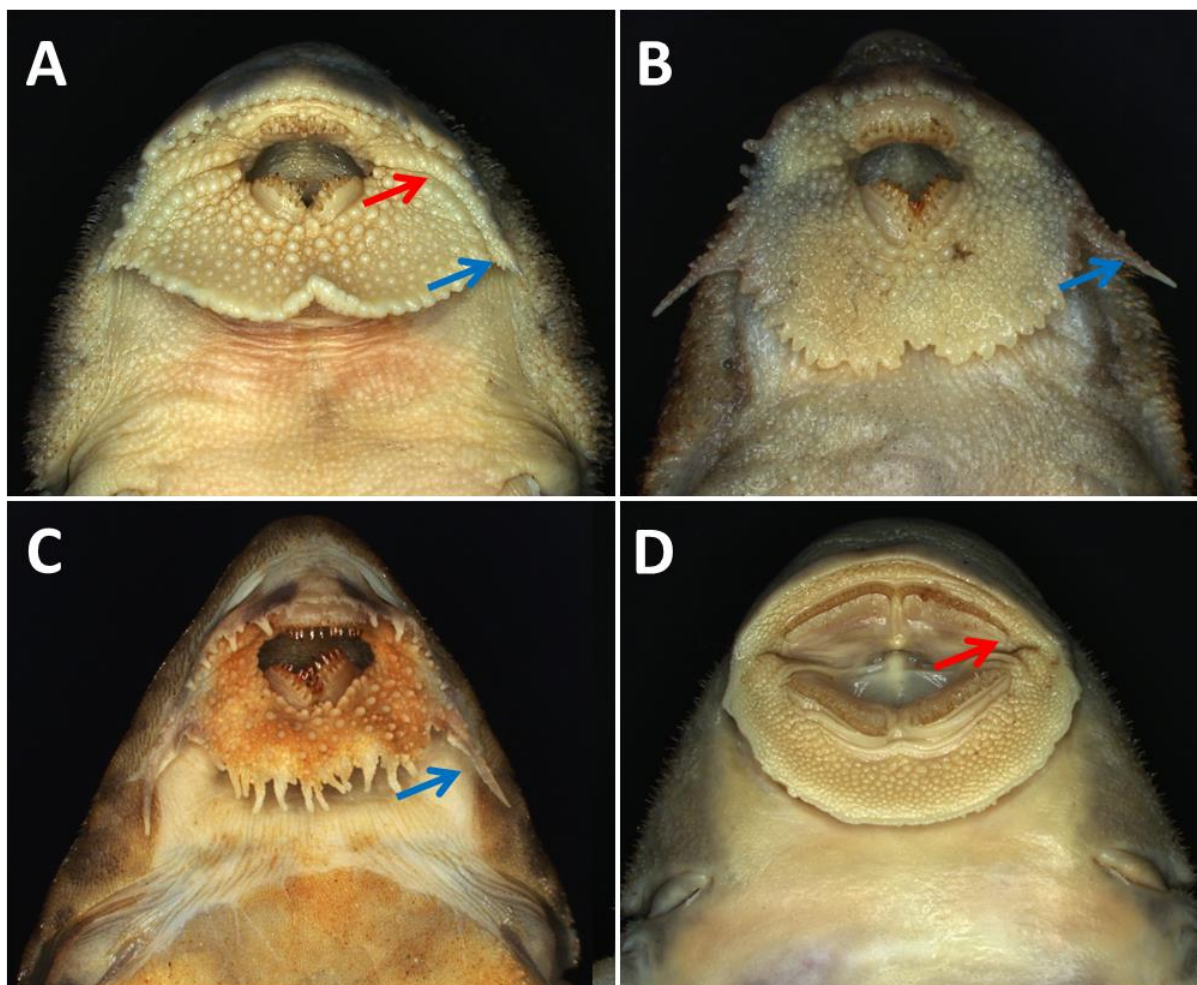


Figura 2: Forma geral da estrutura da boca em diferentes espécies de *Rineloricaria* e uma de *Harttia* (A): boca de uma *Rineloricaria anitae* com barbilhão pequeno (Caráter 3 A: seta azul) e fenda labial grande (caráter 5 B: seta vermelha); (B): boca de uma *Rineloricaria lima* com barbilhão de tamanho médio (caráter 3 B: seta azul), fenda labial pequena ou inexistente (caráter 5 A); (C): boca de uma *Rineloricaria fallax* com barbilhão grande (caráter 3 C: seta azul) e fenda labial pequena (caráter 5 A); (D): boca de uma *Harttia carvalhoi* com barbilhão pequeno ou ausente e com a expansão lateral da cavidade bucal (seta vermelha).

RESULTADOS

Pela técnica de *DNA Barcoding* foram identificados 97 haplótipos de *Rineloricaria* distintos em nosso conjunto de amostras. Para as análises finais somamos representantes de cada um desses haplótipos a todo material identificado morfologicamente, incluindo os grupos externos, assim obtivemos o número total de 163 táxons listados na Tabela 2. Os segmentos gênicos obtidos para cada uma das amostras estão presentes na Tabela 2. Pela análise de *DNA Barcoding* constatamos que a divergência média do COI, encontrada entre as espécies *Rineloricaria* é de 11%, variando de 1 a 18%, enquanto que a divergência máxima entre populações analisadas de uma mesma espécie é de 8% (*R. lanceolata*). Além disso, as 13 espécies que acreditávamos serem novas demonstram acentuada diferenciação genética.

Embora nossas tentativas de sequenciamento dos segmentos gênicos tenham sido bastante eficientes, não foi possível obter todos os segmentos gênicos para todas as amostras. Os segmentos obtidos para cada uma das amostras estão representados na Tabela 2.

A partir do alinhamento, concatenação e edição final obteve-se uma matriz com 6675 caracteres, sendo 3034 variáveis e destes 2370 informativos para Máxima Parcimônia (a matriz em formato NEXUS encontra-se no material suplementar 1). A matriz foi dividida em 11 partições e os dados referentes a cada partição, tal como seus respectivos melhores modelos de evolução nucleotídica são apresentados na Tabela 4. A análise de saturação demonstrou que os dados não se encontram saturados, apresentando valores de R^2 das transições = 0,88 e R^2 das transversões = 0,83 e a relação de Iss/Issc maior que 5.

Tabela 4: Dados sobre as partições utilizadas nas análises Bayesianas e de Máxima Verossimilhança.

Gene	Critério da partição	Melhor modelo encontrado pelo teste AIC implementado no model test	Modelo utilizado para a inferência bayesiana	Posições da matriz correspondente a cada partição
COI	Primeiras posições dos códons	GTR+G	Nst=6 + G	1 - 569\3
COI	Segundas posições dos códons	TIM+G	Nst=6 + G	2 - 569\3
COI	Terceiras posições dos códons	F81	Nst=1	3 - 569\3
CITB	Primeiras posições dos códons	SYM+I+G	Nst=6 + I + G	570 - 1627\3
CITB	Segundas posições dos códons	HKY+I+G	Nst=2 + I + G	571 - 1627\3
CITB	Terceiras posições dos códons	GTR+I+G	Nst=6 +I + G	572 - 1627\3
12s16s	Segmento total	GTR+I+G	Nst= 6 +I +G	1628 - 3879
Íntron F Reticulon 4	Segmento total	HKY+G	Nst=2 + G	3880 - 5629
Éxon F Reticulon 4	Primeiras posições dos códons	K81uf+G	Nst=6 + G	5630 - 6675\3
Éxon F Reticulon 4	Segundas posições dos códons	TVM+I+G	Nst=6 +I +G	5631 - 6675\3
Éxon F Reticulon 4	Terceiras posições dos códons	K81uf+I	Nst=6 +I	5632 - 6675\3

A árvore filogenética obtida pela análise Bayesiana apresentou-se bastante resolutive e com poucas politomias. Com o enraizamento da árvore em *Harttia*, *Rineloricaria* aparece como um dos gêneros da subtribo Loricariina tendo *Loricariichthys* como mais aparentado dentre os gêneros analisados (Figura 4).

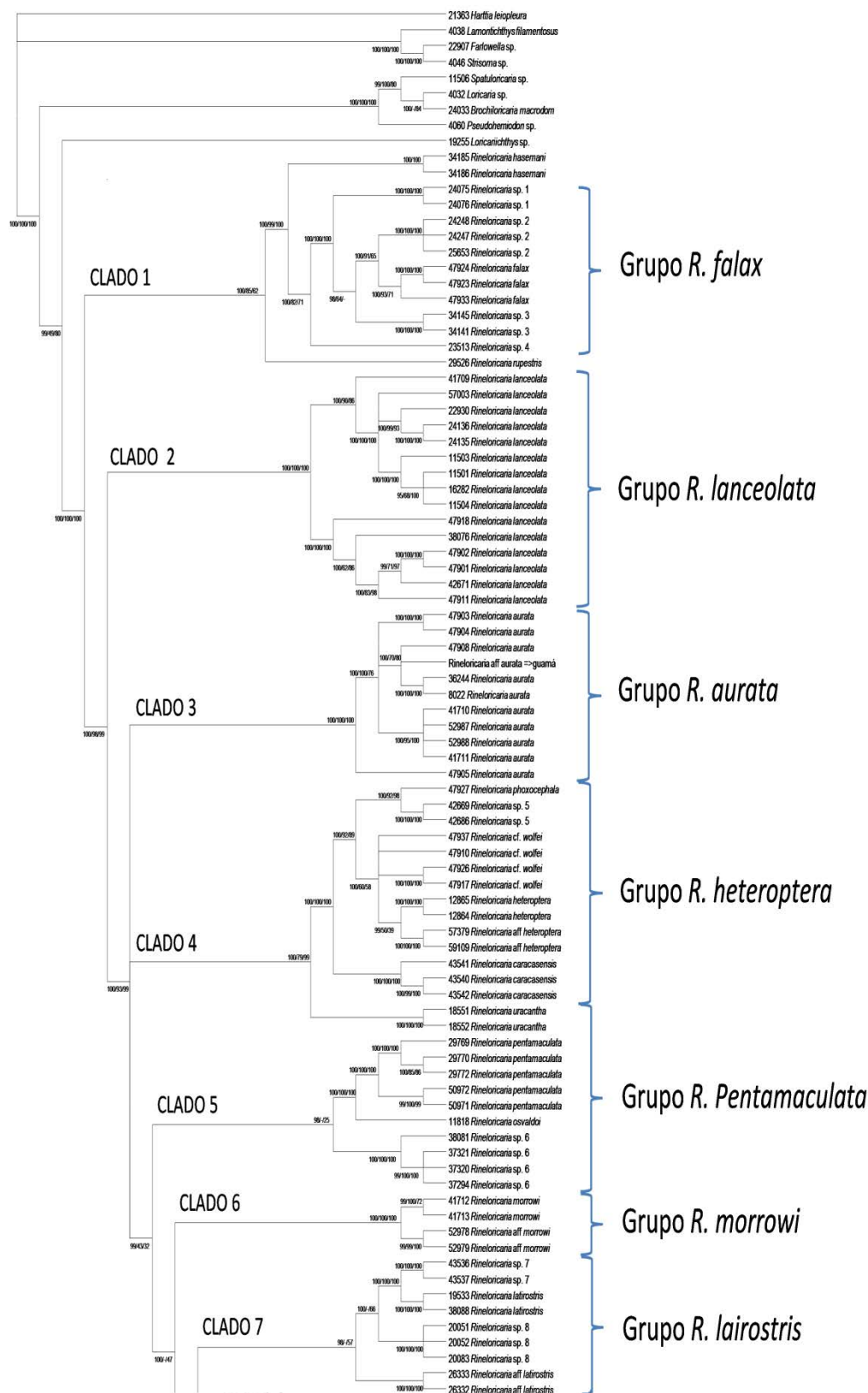


Figura 3 (Primeira parte) Árvore filogenética obtida pelo método Bayesiano entre espécies de Loricariinae com ênfase em *Rineloricaria*. Números presentes nos nós representam os valores probabilísticos bayesianos, *bootstrap* (100 pseudoréplicas) da análise de Máxima Parcimônia e valores de *bootstrap* (1000 pseudoréplicas) da análise de Máxima Verossimilhança respectivamente. (Continua na próxima página).

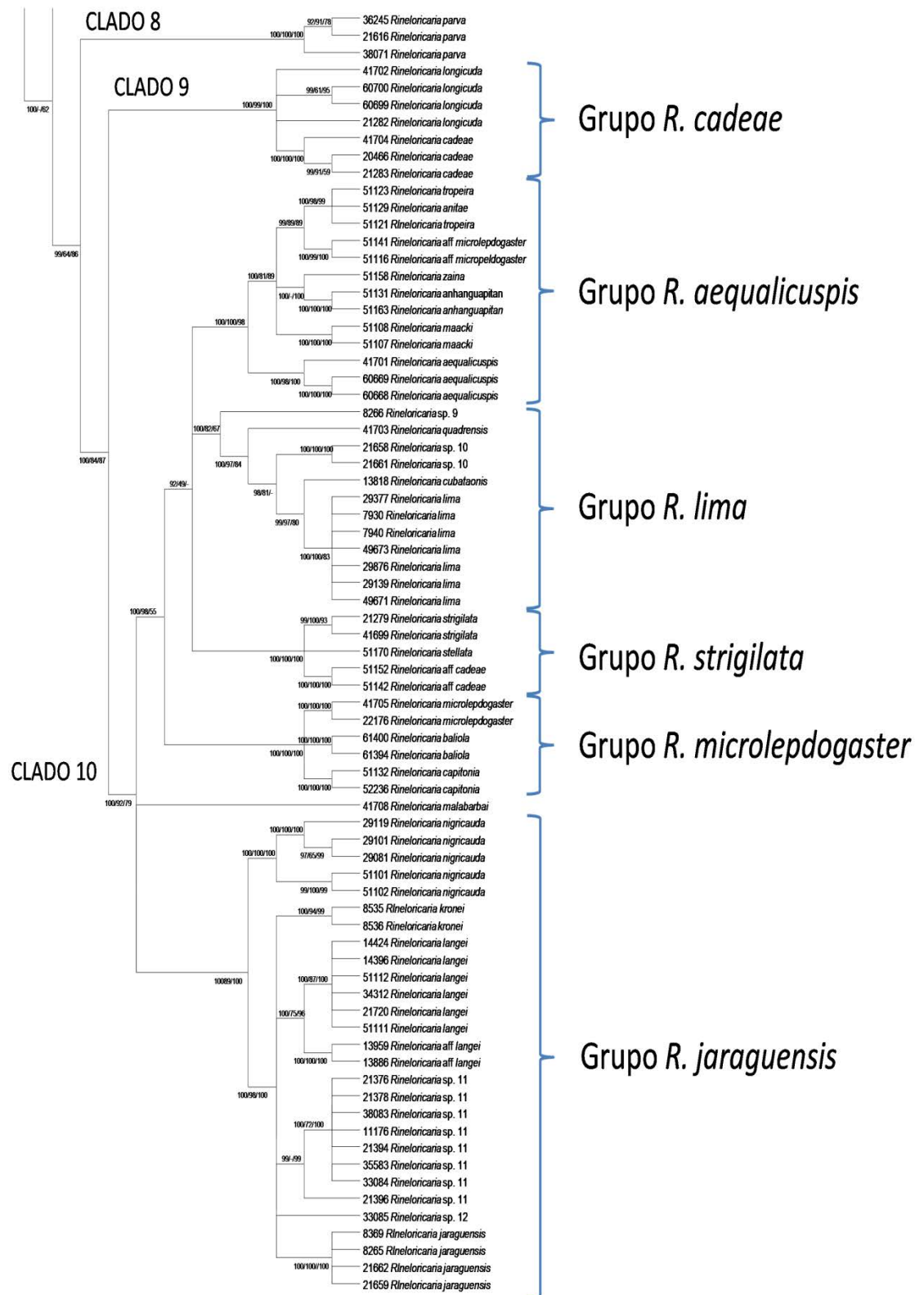


Figura 3: (segunda parte) Árvore filogenética obtida pelo método Bayesiano entre espécies de Loricariinae com ênfase em *Rineloricaria*. Números presentes nos nós representam os valores probabilísticos bayesianos, *bootstrap* (100 pseudoréplicas) da análise de Máxima Parcimônia e valores de *bootstrap* (1000 pseudoréplicas) da análise de Máxima Verossimilhança respectivamente.

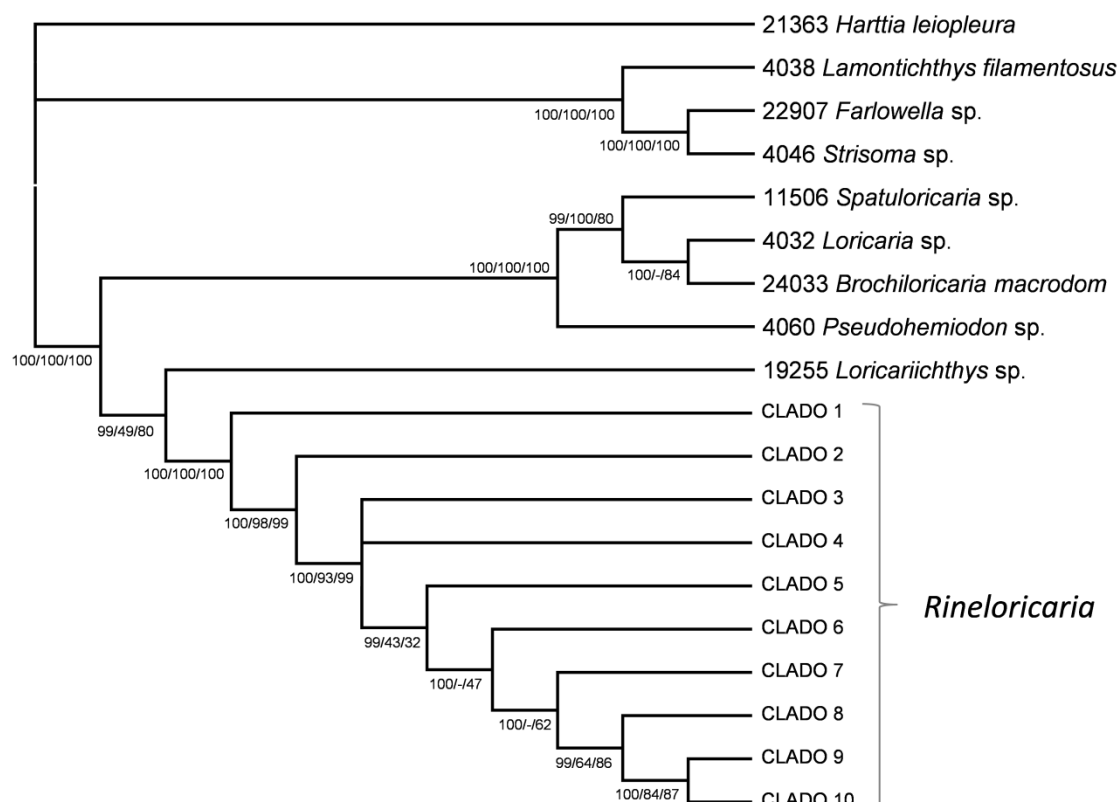


Figura 4 Relações entre os clados principais encontrados: Os números presentes nos nós são contemplados na legenda da Figura 3.

As reconstruções filogenéticas pelos métodos de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança resgataram topologias muito próximas à obtida pelo método Bayesiano. Os índices de *bootstrap* das análises de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança estão representados nas Figuras da topologia juntamente com a probabilidade a posteriori da análise Bayesiana.

A partir da reconstrução filogenética foram resgatados 10 clados bem sustentados e dentro de cada clado existem grupos de espécies que compartilham caracteres que os diagnosticam (Figuras 4 a 11). Os resultados obtidos apontam que *Hemiloricaria* e *Fonchiichthys* não são grupos monofiléticos e juntamente com *Leliella* aparecem internos a *Rineloricaria*. Outros grupamentos fenéticos, como o “grupo de rocha” e “grupo de areia”, propostos em Rodriguez e Reis (2008), também se demonstraram não monofiléticos (Figuras

Phylogenetic tree showing the relationships between *Rineloricaria* species. The tree is rooted on the left. Bootstrap values are indicated at the nodes. The species names are listed on the right, with some in bold. A bracket on the far right groups several species under the label 'Grupo R. falax'.

CLADO 1

100/85/62

100/99/100

100/100/100

100/100/100

100/91/65

100/100/100

100/93/71

100/100/100

34185 *Rineloricaria hasemani*

34186 *Rineloricaria hasemani*

24075 *Rineloricaria* sp. 1

24076 *Rineloricaria* sp. 1

24248 *Rineloricaria* sp. 2

24247 *Rineloricaria* sp. 2

25653 *Rineloricaria* sp. 2

47924 *Rineloricaria falax*

47923 *Rineloricaria falax*

47933 *Rineloricaria falax*

34145 *Rineloricaria* sp. 3

34141 *Rineloricaria* sp. 3

23513 *Rineloricaria* sp. 4

29526 *Rineloricaria rupestris*

Grupo *R. falax*

CLADO 2

100/100/100

100/90/86

100/100/100

100/99/93

100/100/100

100/100/100

95/68/100

100/100/100

100/62/86

99/71/97

100/83/98

41709 *Rineloricaria lanceolata*

57003 *Rineloricaria lanceolata*

22930 *Rineloricaria lanceolata*

24136 *Rineloricaria lanceolata*

24135 *Rineloricaria lanceolata*

11503 *Rineloricaria lanceolata*

11501 *Rineloricaria lanceolata*

16282 *Rineloricaria lanceolata*

11504 *Rineloricaria lanceolata*

47918 *Rineloricaria lanceolata*

38076 *Rineloricaria lanceolata*

47902 *Rineloricaria lanceolata*

47901 *Rineloricaria lanceolata*

42671 *Rineloricaria lanceolata*

47911 *Rineloricaria lanceolata*

Grupo *R. lanceolata*

40

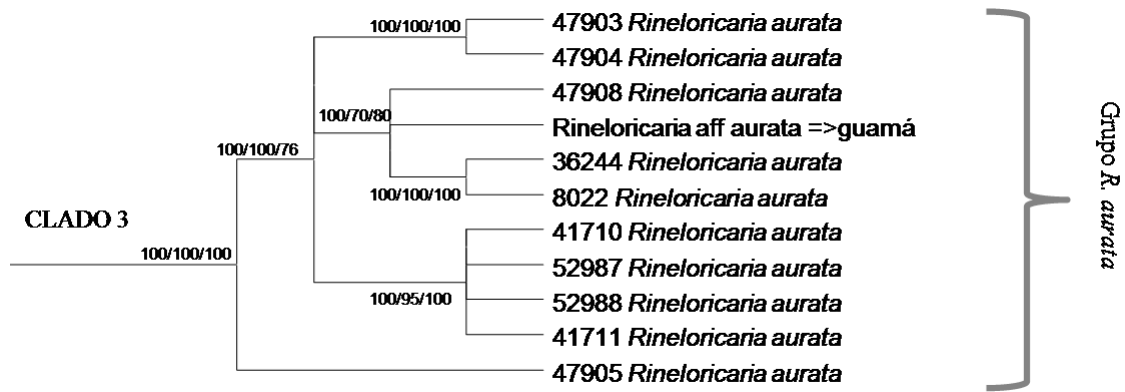


Figura 7: Relações entre espécies de *Rineloricaria* internas ao clado 3: Os números presentes nos nós são contemplados na legenda da Figura 3.

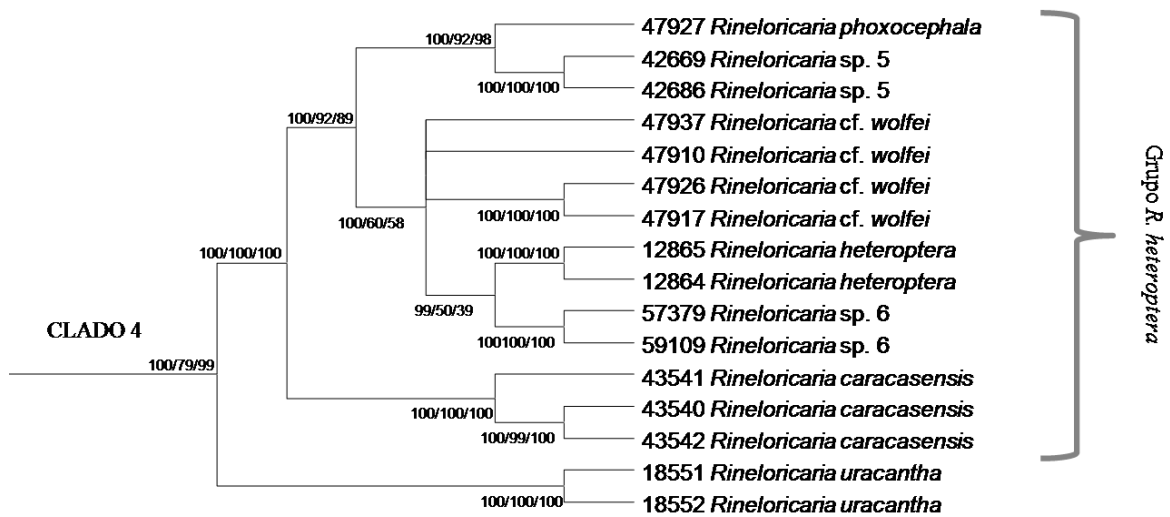


Figura 8: Relações entre espécies de *Rineloricaria* internas ao clado 4: Os números presentes nos nós são contemplados na legenda da Figura 3.

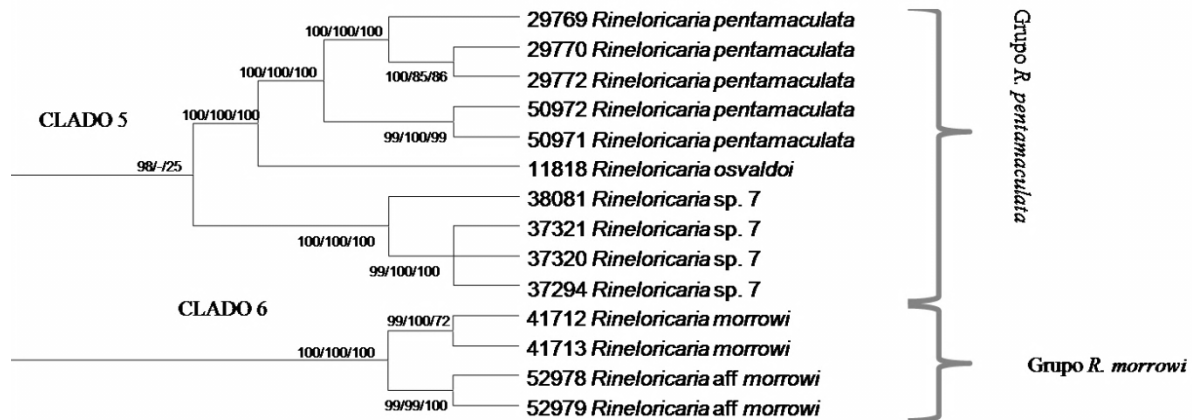


Figura 9: Relações entre espécies de *Rineloricaria* internas ao clado 5 e 6: Os números presentes nos nós são contemplados na legenda da Figura 4.

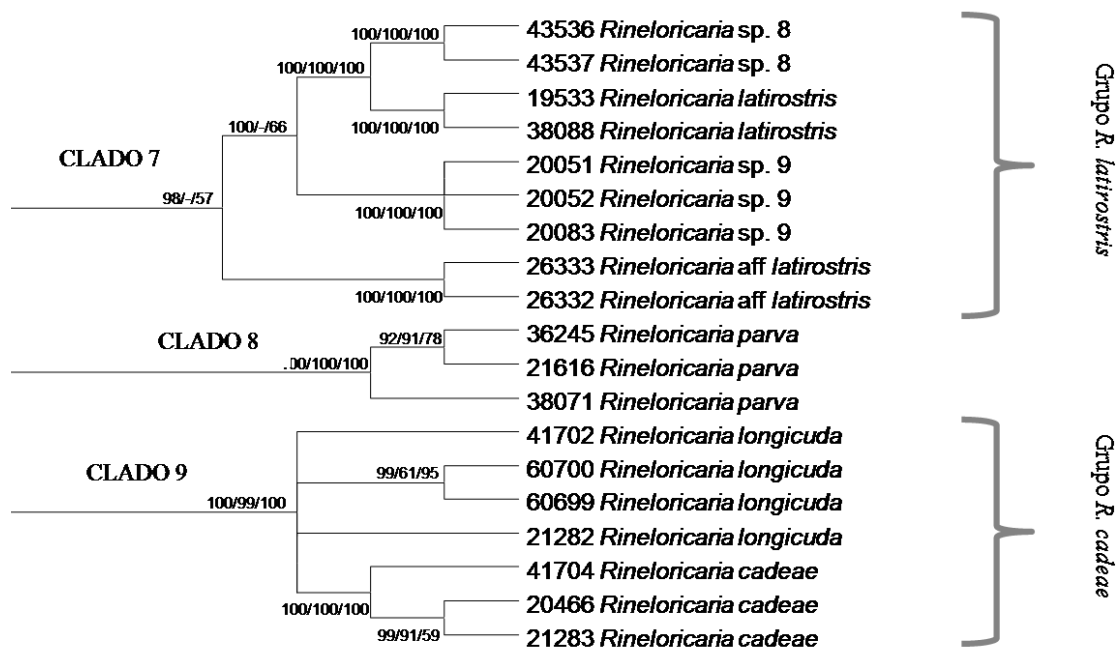


Figura 10: Relações entre espécies de *Rineloricaria* internas aos clados 7, 8 e 9: Os números presentes nos nós são contemplados na legenda da Figura 4.

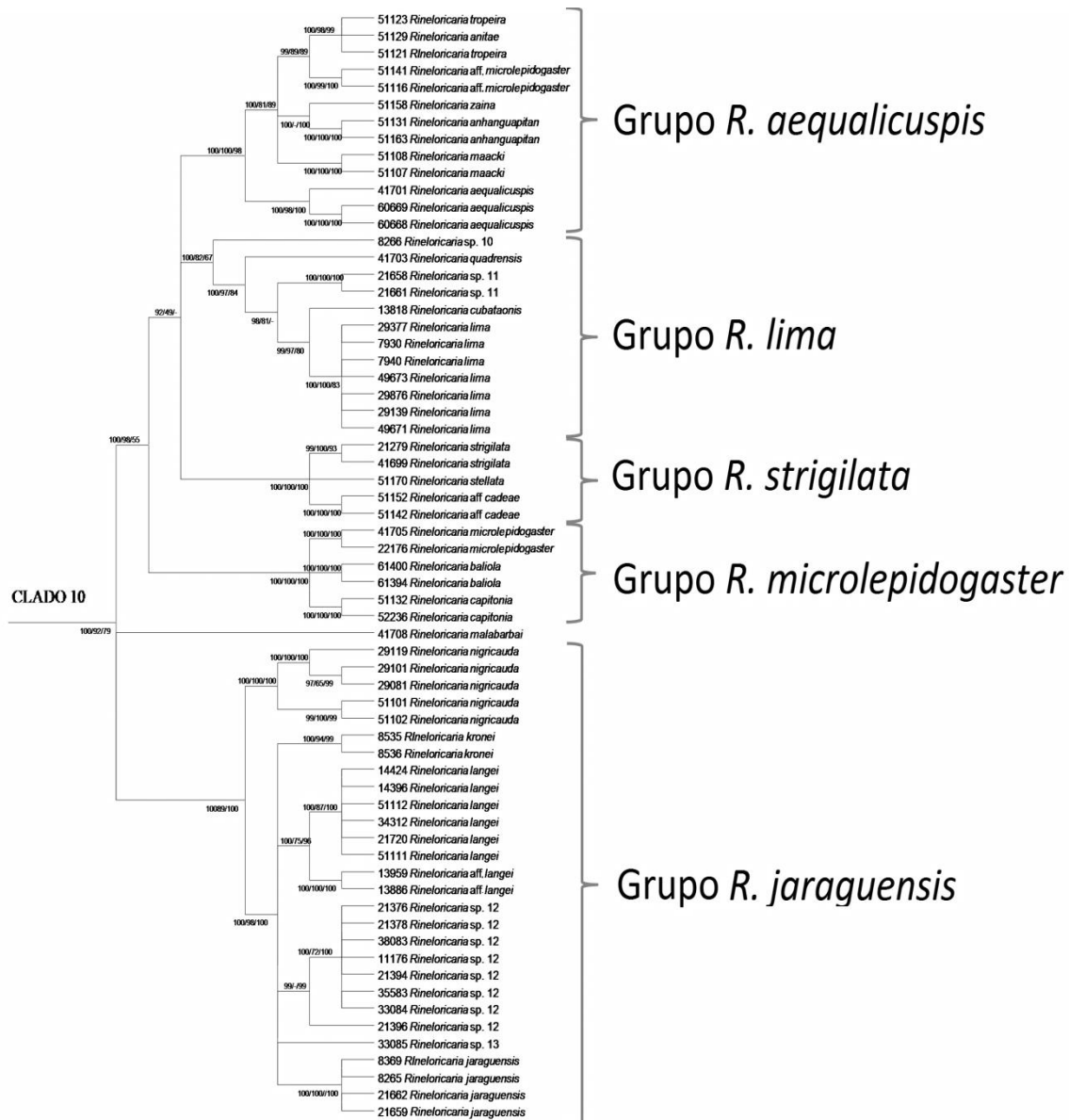


Figura 11: Relações entre espécies de *Rineloricaria* internas ao clado 10: Os números presentes nos nós são contemplados na legenda da Figura 4.

A primeira cladogênese interna do gênero separou as espécies do Clado 1 das demais espécies. O Clado 1 é composto por *Rineloricaria rupestris*, *R. hasemani* e mais seis espécies que fazem parte do grupo *R. fallax*, com constituição semelhante ao “grupo *R. formosa*” proposto em Fichberg, (2008) (Figura 6). O grupo irmão do Clado 1 é composto pelos outros nove clados principais, sendo que desses o primeiro a se divergir é o Clado 2, composto pelas espécies (ou populações) do grupo *R. lanceolata* (Figura 7). As espécies irmãos do Clado 2 possuem sua relação na base não resolvida, apresentada em forma de tricotomia. Dessa

tricotomia partem três clados importantes: o Clado 3, composto pelas espécies ou populações que compõem o grupo *R. aurata* (Figura 8), o Clado 4, composto pelas espécies *R. uracantha*, *R. caracacensis* e as espécies que compõem o Grupo *R. heteroptera*, e a terceira linhagem que parte da mesma tritomia apresenta os outros seis clados principais (Figura 9).

Nessa linhagem o Clado 5, composto por (*Rineloricaria* sp. 7 (*R. pentamaculata* e *R. osvaldoi*)), é irmão do grupo composto pelos clados 6, 7, 8, 9 e 10. Desses, o clado 6, composto pelas espécies do grupo *R. morrowi*, é irmão dos demais (Figuras 5 e 10). Dentre esses últimos o Clado 7, composto pelas espécies do grupo *R. latirostris*, é o primeiro a se divergir, seguido pelo Clado 8, composto por *R. parva* e posteriormente pelos Clados 9 e 10 (Figuras 10 a 12). Os Clados 9 e 10 reúnem as espécies pertencentes à bacia do Leste e do alto rio Iguaçu e alto rio Uruguai. Mais especificamente, o Clado 9 reúne as espécies do grupo *R. cadeae*, enquanto que o Clado 10 agrupa as demais espécies pertencentes a esse conjunto de drenagens. O Clado 10 possui sua primeira cladogênese não resolvida, tal como algumas cladogêneses mais recentes como as que ocorreram entre as populações de *R. langei* (Figura 12).

As análises de relógio molecular e de Lagrange demonstraram que *Rineloricaria* teve seu início há aproximadamente 15 milhões de anos na região do páleo Amazonas Orenoco, saindo dessa região em diferentes ocasiões e atingindo as regiões Alto Paraná e porção das terras baixas do Prata. Há aproximadamente 7 milhões de anos ocorreu uma cladogênese entre espécies de das terras baixas do Prata e complexo de bacias do Bacias do Leste, e então a partir da região das Bacias do Leste espécies de *Rineloricaria* atingiram as regiões Alto Iguaçu e Alto rio Uruguai (Figura 13).

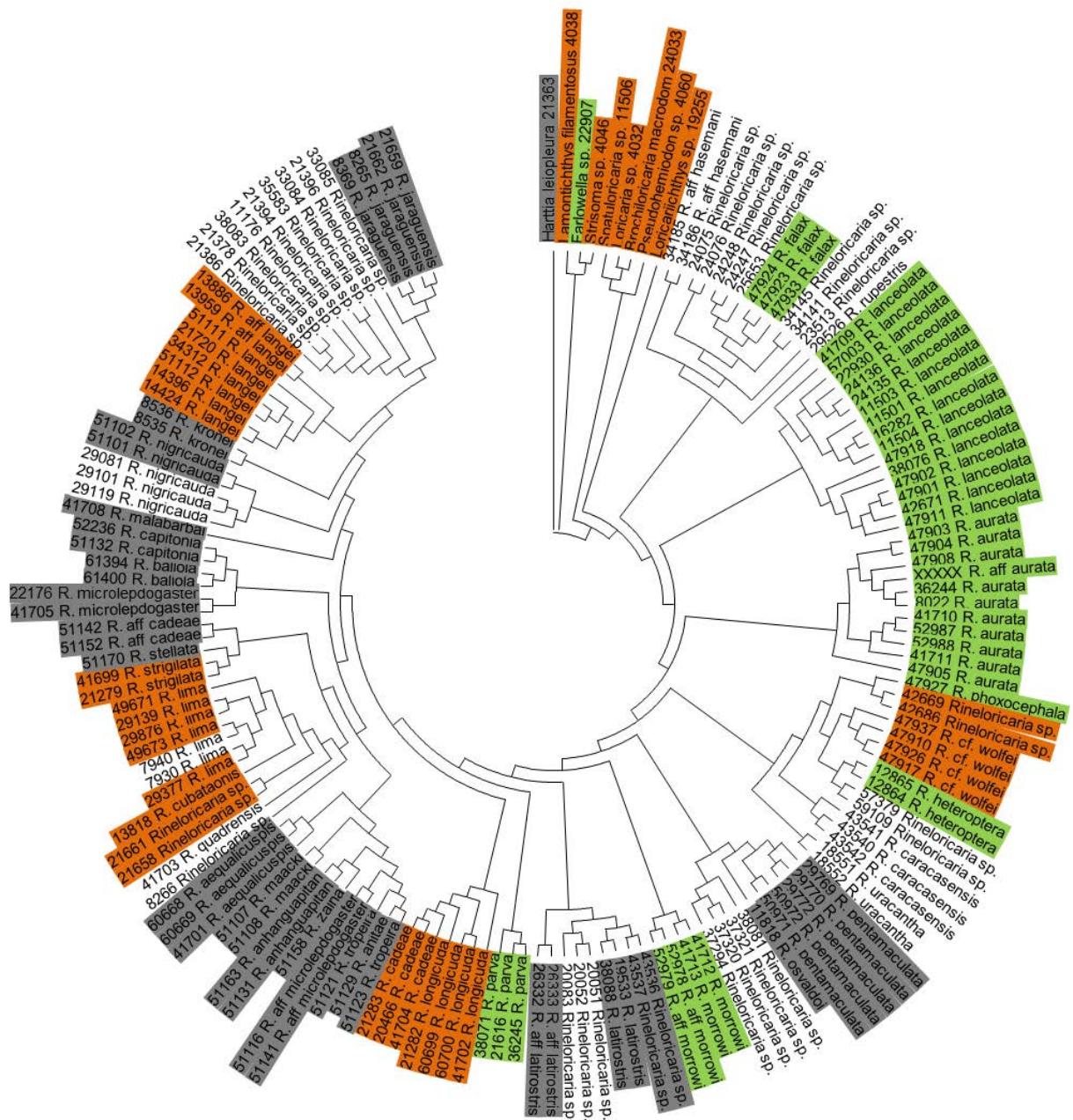


Figura 13: Arvore filogenética entre espécies de *Rineloricaria* destacando o tipo de ambiente em que as amostras foram coletadas. Cinza representa as amostras que habitam o ambiente de rocha, laranja representa as espécies que habitam os ambientes de areia e verde as espécies que habitam os ambientes de vegetação. As espécies que não estão em destaque são as que não obtivemos informação quanto ao ambiente.

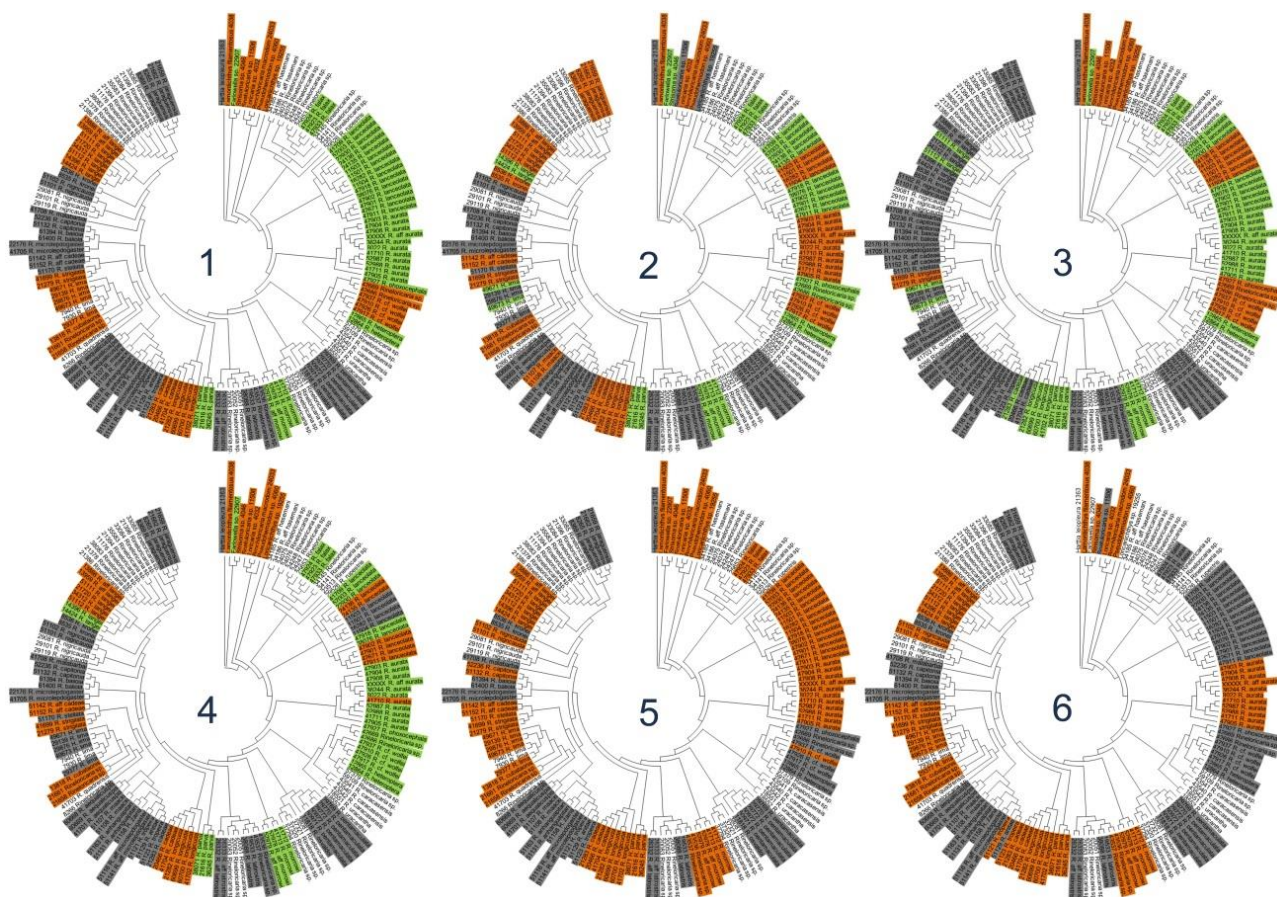


Figura 14: Árvores filogenéticas de *Rineloricaria* comparando a interrelação entre os tipos ambientes e determinadas combinações de caracteres. **Árvore 1:** cinza representa as amostras de ambiente de rocha, laranja representa as amostras de ambiente de areia e verde representa as amostras do ambiente de vegetação. **Árvore 2:** cinza representa as amostras com o Caráter 1 no estado A, laranja representa as amostras com o Caráter 1 no estado B e verde representa as amostras com o Caráter 1 no estado C. **Árvore 3:** cinza representa as amostras com o Caráter 2 no estado A, laranja representa as amostras com o Caráter 2 no estado B e verde representa as amostras com o Caráter 2 no estado C. **Árvore 4:** cinza representa as amostras com o Caráter 3 no estado A, laranja representa as amostras com o Caráter 3 no estado B e verde representa as amostras com o Caráter 3 no estado C. **Árvore 5:** cinza representa as amostras com o Caráter 4 no estado A e laranja representa as amostras com o Caráter 4 no estado B. **Árvore 6:** cinza representa as amostras com o Caráter 5 no estado A e laranja representa as amostras com o Caráter 5 no estado B. As espécies que não estão em destaque são as que não obtivemos informação quanto ao ambiente.

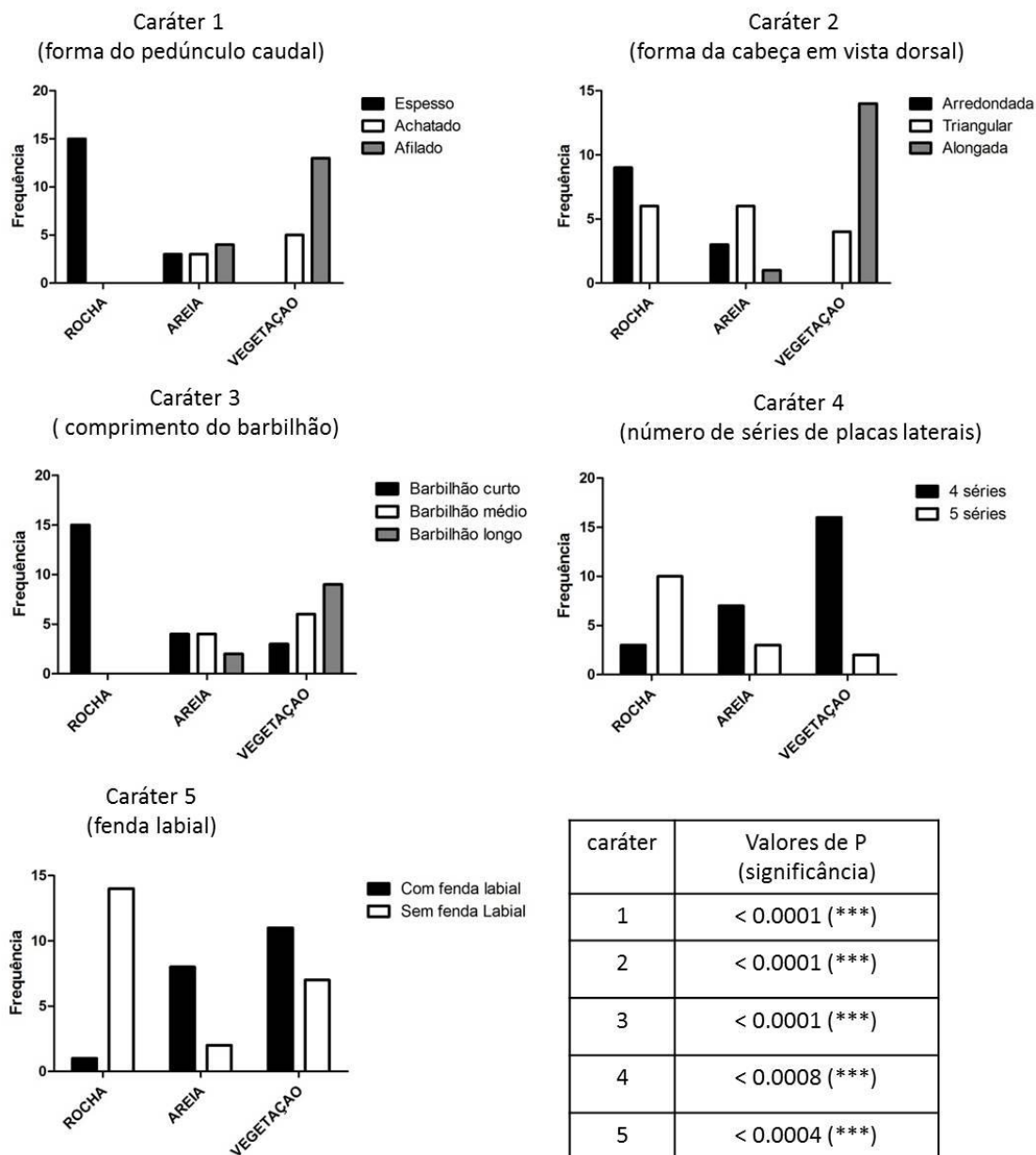


Figura 15: Gráficos das frequências de estados de cada um dos caracteres em cada tipo de ambiente com seus respectivos valores de significância.

Ao sobrepor os dados ambientais à topologia obtida percebemos que as amostras não se organizam em grupos monofiléticos de espécies de areia, de vegetação e de rocha (Figura 14). Além disso, podemos notar que os caracteres destacados anteriormente apresentam elevado grau de homoplasia (Figura 15). Ao realizar o teste de qui-quadrado, observamos que os três tipos de ambientes se diferem significativamente quanto à frequência dos estados de cada caráter (Figura 16).

Como dito anteriormente, além das análises filogenéticas, foram realizadas também análises morfológicas em três diferentes populações de *Rineloricaria lanceolata* e como resultado dessa análise de variáveis canônicas, foram discriminados os morfótipos das três populações de *R. lanceolata* analisada, sendo que o gráfico resultante dessa análise está presente na Figura 17.

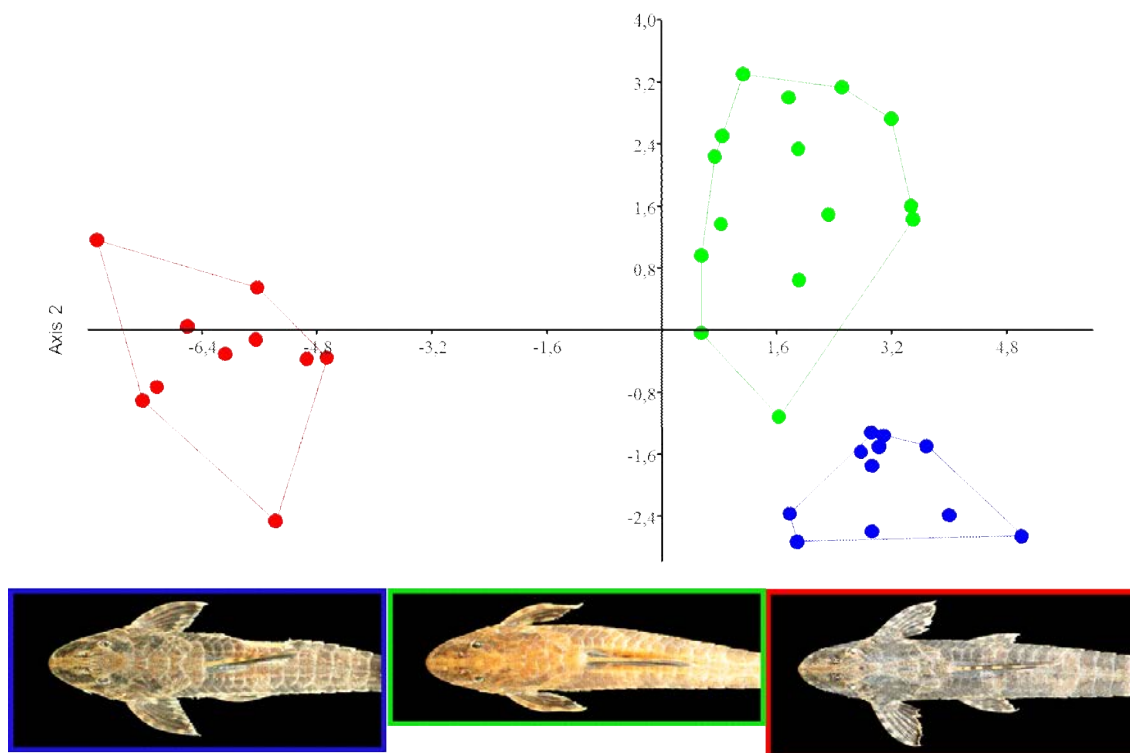


Figura 16: Análise de variáveis canônicas entre três populações de *Rineloricaria lanceolata*. **Azul** representa população do rio Sepetuba/Paraguai-MT, **verde** representa a população do rio Araguaia/Amazonas-MT e **vermelho** representa a população do rio Madeira/Amazonas-RO.

DISCUSSÃO

Sistemática e taxonomia de *Rineloricaria*

Rineloricaria possui uma história taxonômica longa e controversa. Esse grupo foi descrito juntamente com *Hemiloricaria* por Bleeker (1862), tendo como espécie tipo *Rineloricaria lima*. Esses dois gêneros eram separados principalmente devido ao padrão de dimorfismo sexual, onde os machos maduros de *Hemiloricaria* não possuiriam odontódeos desenvolvidos na região lateral do focinho, enquanto que os de *Rineloricaria* possuiriam.

A aceitação de *Hemiloricaria* sempre foi discutida, sendo que Eigenmann e Eigenmann (1890) consideraram *H. cacerensis* (espécie tipo de *Hemiloricaria*) como espécie duvidosa e não a incluíram na lista de espécies de bagres sulamericanos. Após isso, o nome caiu em desuso até que Isbrücker e Nijssen (1976) colocaram *Hemiloricaria* formalmente como sinônimo júnior de *Rineloricaria*. Em Isbrücker *et al.* (2001), foi proposta a separação de *Rineloricaria* em quatro gênero distintos, *Leliella*, *Fonchiiloricaria*, *Hemiloricaria* e *Rineloricaria*. Essa divisão foi em parte reconhecida por alguns autores subsequentes (Ferraris, 2007; Rodriguez e Reis, 2008; Rodriguez e Miquelarena, 2008), enquanto outros não assumiram essa classificação por acharem os caracteres propostos por Isbrücker *et al.* (2001) insuficientes para separar o grupo em quatro gêneros distintos (Covain e Fisch-Muller, 2007; Fichberg, 2008; Vera-Alcaráz *et al.*, 2012). É na classificação adotada por Covain e Fisch-Muller (2007), Fichberg (2008), Vera-Alcaráz *et al.* (2012) que baseamos nossas discussões.

Dentre os grupos mencionados, “*Leliella*” é o que menos possui aceitação da comunidade científica, sendo que nos trabalhos subsequentes à descrição esse grupo sempre foi tratado como sinônimo júnior de *Rineloricaria*. “*Leliella*” é um grupamento monotípico composto por *R. heteroptera* e é diagnosticado principalmente por um conjunto de caracteres

de dimorfismo sexual. Em *R. heteroptera* os machos adultos em época reprodutiva desenvolvem odontódeos finos e longos na lateral da cabeça e além disso na região pré-dorsal está localizado um conjunto de odontódeos perpendiculares em relação ao dorso do animal (Isbrücker e Nijssen, 1976). Embora tenha sido usado como diagnose de “*Leliella*”, um padrão de dimorfismo com essas mesmas características também pode ser observado na espécie *Rineloricaria* sp. 7, porém essas duas espécies pertencem a linhagens distintas.

Embora “*Leliella*” seja pouco aceito na comunidade científica, outros nomes frequentemente são utilizados. O gênero “*Fonchiiichthys*”, por exemplo, é tido como um nome válido em alguns trabalhos mais recentes como em Ferraris (2007). Esse grupo é composto por *Rineloricaria uracantha* e *R. rupestris* e segundo Isbrücker *et al.* (2001) o grupo possui como diagnose os raios indivisos na nadadeira caudal prolongados em forma de filamentos e além disso, nesse grupo tal como em *Rineloricaria* senso Isbrücker (2001), os machos maduros não possuem odontódeos bem desenvolvidos na região pré-dorsal. Essa combinação de caracteres também pode ser observada em *R. parva*, *R. morrowi*, *R. caracacensis* e *R. aff morrowi*, pertencentes a linhagens distintas. Além disso, o próprio grupo “*Fonchiiichthys*” apresentou-se não monofilético, demonstrando que, de fato, “*Fonchiiichthys*” deva ser tratado como sinônimo júnior de *Rineloricaria*. Aparentemente a combinação de caracteres que diagnosticam “*Fonchiiichthys*” surgiu paralelamente em quatro momentos diferentes na história evolutiva de *Rineloricaria*, possivelmente devido a pressões de convergências adaptativas.

Após a redescritção de “*Hemiloricaria*” por Isbrücker *et al.* (2001), o grupo foi rediagnosticado e novamente reconhecido como válido. Nesse trabalho, foram usados para diagnosticar o grupo a forma mais afilada do corpo juntamente com a presença de odontódeos na região pré-dorsal. Em Ferrarias (2007) 25 espécies foram alocadas em “*Hemiloricaria*”,

enquanto que *Rineloricaria* era constituída por 22 espécies. Ao analisar a topologia percebe-se que o grupo *Rineloricaria* (*sensu* Isbrücker, 2001) juntamente com *R. parva* (tida como representante de “*Hemiloricaria*” por Isbrücker, 2001 e Ferraris, 2007) é derivado de “*Hemiloricaria*”, constatando assim que os caracteres que diagnosticam “*Hemiloricaria*” são plesiomórficos. Dessa forma, tal como “*Leliella*” e “*Fonchiichthys*”, “*Hemiloricaria*” deve ser tratada como sinônimo júnior de *Rineloricaria*.

Outros grupos fenéticos também já foram descritos internamente a *Rineloricaria*. Um exemplo disso são os grupos de rocha e de areia propostos em Rodriguez e Reis, (2008). Ingenito *et al.* (2008), discutindo acerca dos caracteres apontados em Rodriguez e Reis (2008), argumenta que embora esses grupamentos sejam fenéticos, os caracteres que definem esses grupos devam se tratar de sinais filogenéticos. Nossos resultados apontam o oposto, demonstrando que tais grupos não são monofiléticos e que os caracteres que definem esses “grupos” se tratam de homoplasias.

Fichberg (2008), com base em caracteres morfológicos, realizaram a primeira análise filogenética com ênfase em *Rineloricaria*, onde foram constatadas as primeiras evidências de grupos monofiléticos internos ao gênero. Segundo os mesmos autores, as espécies do “grupo *R. formosa*” compartilham entre si uma mancha arredondada escura na região pré-dorsal que os distingue das congêneres. Embora nesse trabalho alguns agrupamentos tenham sido resgatados, as relações filogenéticas entre a maioria das espécies de *Rineloricaria* permaneceu pouco esclarecida.

Uma das principais contribuições de nossas análises é a identificação de grupamentos internos em *Rineloricaria*. Alguns desses grupos possuem caracteres de morfologia externa que auxiliam em sua identificação, enquanto outros possuem grande correspondência quanto à distribuição. Dentre os grupos obtidos destacam-se: *R. fallax*, *R. lanceolata*, *R. aurata*, *R. heteroptera*, *R. pentamaculata*, *R. morrowi*, *R. latirostris*, *R. cadeae*, *R. microlepidogaster*,

R. aequalicuspis, *R. strigilata*, *R. lima* e *R. jaraguensis* (Figuras 6 a 12).

O Grupo *Rineloricaria fallax* é composto por *R. fallax* e outras quatro espécies provavelmente ainda não descritas (Figura 6). Os machos maduros dessas espécies, compartilham o desenvolvimento de odontódeos rodeando a placa supraoccipital assim como uma mancha bastante evidente na região pré-dorsal, que pode ocupar diferentes posições nessa região, desde a região supraoccipital até a base da nadadeira dorsal. A diferença de posição que essa mancha ocupa permite que as espécies sejam diferenciadas. *R. fallax* é a única espécie das quais analisamos que foi apontada como pertencente ao “grupo *R. formosa*” em Fichberg (2008). Entretanto, como as características que definem o grupo *R. fallax* e o “grupos *R. formosa*” (Fichberg, 2008) são os mesmos, acreditamos que esses dois grupos na verdade constituem apenas um único grupo taxonômico.

O Grupo *Rineloricaria lanceolata* (Figura 7) é um grupo de ampla distribuição, ocupando as bacias do Amazonas e Paraguai. Os espécimes desses grupos estavam sempre associados à vegetação das margens de rios de diferentes portes, geralmente com correntezas moderadas ou fortes. Todas as amostras desse grupo compartilham as características diagnósticas da espécie *R. lanceolata*, como a faixa longitudinal escura paralela aos raios indivisos em todas as nadadeiras e a faixa marrom escura com odontódeos desde o focinho até a base da nadadeira dorsal. Vera-Alcaraz *et al.* (2012) ao realizar a revisão de *R. lanceolata* da bacia do Paraguai constatou que esta se trata de uma só espécie com uma grande variância morfométrica intraespecífica.

Em nossas análises foi constatada que entre as amostras dos rios Madeira, Paraguai e Araguaia existem grandes discrepâncias morfológicas (Figura 15) e genéticas (máximo de 8 % de divergência para o COI). Essa diferença genética é maior do que a existente entre outras espécies válidas, como por exemplo, as espécies do grupo *Rineloricaria microlepidogaster*,

que possuem para o gene COI em média 1% de divergência genética entre si. É possível que uma análise filogeográfica associada às análises citogenéticas e morfológicas revele que na verdade esse grupo se trata de um complexo de espécies.

O Grupo *Rineloricaria aurata* (Figura 8) é composto por diferentes populações de *R. aurata*, possuindo grande distribuição pelas bacias do Paraguai e pelas drenagens sul do Amazonas. Embora muito difíceis de distinguir morfológicamente, essas populações possuem acentuada diferenciação genética (máximo de 4% para o gene COI), diferenciação essa maior que a encontrada entre espécies distintas.

O Grupo *Rineloricaria heteroptera* (Figura 9) é composto por *R. wolfei*, *R. phoxocephala*, *Rineloricaria* sp. 5, *Rineloricaria* sp. 6 e *R. heteroptera*. Embora essas espécies sejam bastante distintas entre si, elas ainda possuem alguns caracteres em comum, como por exemplo o filamento no raio superior da nadadeira caudal e algumas semelhanças quanto ao padrão de colorido. As espécies do grupo *R. heteroptera* possuem a coloração de fundo clara, variando entre cinza-claro e castanho-claro. A lateral do focinho possui uma mancha cinza escura e as bordas dos poros dos canais látero-sensorial possuem pigmentação preta tanto nos poros da cabeça quanto nos da linha lateral. Por outro lado, a coloração das nadadeiras é variada dentro do grupo: *Rineloricaria* sp. 5, *Rineloricaria* sp. 6, *R. wolfei* e *R. phoxocephala* possuem a nadadeira caudal com duas manchas, uma na base e outra na extremidade dos raios da nadadeira, enquanto *R. heteroptera* possui uma mancha escura paralela aos raios indivisos da nadadeira caudal. O padrão de colorido da nadadeira dorsal também é diferente entre essas espécies: *R. heteroptera* possui uma mancha paralela ao espinho da dorsal enquanto as demais espécies do grupo possuem a nadadeira dorsal rajada.

O Grupo *Rineloricaria pentamaculata* é composto por *R. pentamaculata*, *R. osvaldoi* e por *Rineloricaria* sp. 7 e embora essas espécies sejam bastante distintas do ponto de vista

morfológico e genético, elas compartilham algumas características. Pode-se destacar a presença de cinco séries de placas laterais, cinco barras transversais escuras no dorso, abdômen totalmente coberto por placas diminutas não organizadas em séries regulares e cabeça do tipo arredondada.

Foram analisadas amostras de duas populações de *Rineloricaria pentamaculata* provenientes de drenagens distintas (Bacia do rio Iguaçu e Bacia do alto rio Paraná) e nessa análise observou-se que embora essas populações estejam isoladas geograficamente elas possuem grande similaridade genética, o que pode indicar um evento vicariante recente entre as duas populações.

O Grupo *Rineloricaria morrowi* é composto por duas espécies, *R. morrowi* e *Rineloricaria* aff. *morrowi* (Figura 10). Essas duas espécies possuem em comum os dois raios indivisos da nadadeira caudal prolongados em filamentos longos, possuindo também o abdômen coberto por cinco ou mais séries irregulares de placas. Esse prolongamento dos raios aparece em outras espécies do gênero, como *R. parva*, *R. rupestris*, *R. uracantha* e *R. caracacensis*, porém nessas a cobertura do abdômen é constituída por três séries de placas regulares.

O Grupo *Rineloricaria latirostris* é composto por quatro espécies: *R. latirostris*, *Rineloricaria* sp. 8, *Rineloricaria* sp. 9 e *R. aff. latirostris* (Figura 11). Essas espécies têm em comum cinco séries de placas laterais e placas pequenas cobrindo irregularmente o abdômen, com exceção de *Rineloricaria* sp. 8, que possui o abdômen parcialmente coberto por três a cinco séries de placas. *R. aff. latirostris* e *R. latirostis* juntamente com *R. pentamaculata* ocupam a região do alto Paraná, sendo que *Rineloricaria* sp. 9 é uma espécie Amazônica e *Rineloricaria* sp. 8 é uma espécie do rio São Francisco. Essas espécies possuem a área nua na ponta do focinho bastante reduzida, não atingindo o primeiro poro do canal sensorial. No

padrão geral de colorido essas espécies possuem sete barras castanho-escuras no dorso. As nadadeiras dorsal e anal possuem coloração rajada, com exceção da *Rineloricaria* sp 8, que possui essa nadadeira hialina com a extremidade preta. Essas espécies possuem apenas o raio superior da nadadeira caudal prolongado em um pequeno filamento.

O Grupo *Rineloricaria cadeae* é composto por *R. cadeae* e *R. longicauda* (Figura 11), e ambas as espécies estão distribuídas no sistema da Lagoa dos Patos-RS. Essas duas espécies são muito parecidas entre si, apresentando de três a cinco séries regulares de placas cobrindo totalmente o abdômen, quatro séries de placas laterais e coloração de fundo castanho claro com faixas castanho acinzentadas no dorso. Segundo Rodriguez e Reis (2008), essas espécies só são distintas morfologicamente por diferenças morfométricas sutis. Por outro lado, elas são bastante distintas do ponto de vista genético, apresentando aproximadamente 3 % de divergência média para o COI.

O Grupo *Rineloricaria strigilata* é composto por *R. strigilata*, *R. stellata* e *R. cf. cadeae* (Figura 12). Embora *R. cf. cadeae* seja muito parecida com *R. cadeae*, elas são geneticamente muito distintas, sendo que a única diferença morfológica que foi possível identificar entre essas duas espécies foi a ausência da fenda na lateral da boca (caráter 5, estado 1) em *R. cf. cadeae*, enquanto *R. cadeae* possui tal estrutura. Todas as espécies desse grupo compartilham uma região nua no focinho, que se estende além da abertura do primeiro poro do canal sensorial, além da existência de três a cinco séries de placas abdominais e quatro séries de placas laterais.

O Grupo *Rineloricaria jaraguensis* (Figura 12), composto por *R. jaraguensis*, *R. nigricauda*, *R. langei* e *R. kronei*, é um grupo muito diverso morfologicamente. Essas espécies compartilham a presença de 3 a 5 séries regulares de placas cobrindo totalmente o abdômen, sendo que *R. langei* e *R. nigricauda* possuem quatro séries de placas laterais

enquanto *R. kronei* e *R. jaraguensis* possuem cinco séries. Essas espécies são ocupantes do alto rio Iguaçu e das drenagens litorâneas dos estados do Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Paraná.

Quando *Rineloricaria langei* foi descrita, apenas amostras do alto rio Iguaçu foram analisadas. Nós tivemos a oportunidade de analisar exemplares dessa espécie que ocupavam as drenagens litorâneas dos estados do Paraná e de São Paulo, além de exemplares da localidade-tipo. As amostras que obtivemos na localidade-tipo possuem em média 10 cm de comprimento padrão, machos com odontódeos pouco desenvolvidos na lateral da cabeça e ausência de filamento no raio superior da nadadeira caudal. Essa combinação de caracteres confere com as apresentadas no trabalho de descrição da espécie, entretanto, ao analisar populações das outras localidades, percebemos que esses caracteres possuem variações. Obtivemos amostras com comprimento padrão de até 20 cm, com odontódes bem desenvolvidos na lateral da cabeça e moderadamente desenvolvido na parte superior da cabeça e região pré-dorsal. Além disso, obtivemos amostras de outras localidades que apresentavam o filamento no raio superior da nadadeira caudal, porém embora essas amostras possuam essa variação morfológica, elas são extremamente semelhantes geneticamente, sendo indistinguíveis pelos marcadores por nós utilizados. Esses fatos nos apontam para a necessidade de uma redescrição de *R. langei*, incluindo populações de outras localidades.

O Grupo *Rineloricaria microlepidogaster* (Figura 12) é composto por *R. microlepidogaster*, *R. baliola* e *R. capitonia*. Essas espécies compartilham uma grande quantidade de placas abdominais sem a formação de séries regulares, além de possuírem 5 séries de placas laterais. A divergência genética entre as espécies desse grupo é muito pequena, menor inclusive que a encontrada entre populações distintas de *Rineloricaria lanceolata*. Isso nos sugere que os eventos de especiação internos a esse grupo sejam bastante

recentes.

O Grupo *Rineloricaria lima* (Figura 12) possui como integrantes *Rineloricaria* sp. 10, *R. quadrensis*, *R. cubataonis* e *R. lima*. Todas elas possuem de 3 a 5 séries de placas abdominais, porém com quatro séries de placas laterais. Esse grupo é irmão de *Rineloricaria* sp. 11, que possui cinco séries de placas laterais, que demonstra o quão instável é esse tipo de caráter. A atribuição do nome *R. lima* a essas amostras foi baseada na localidade. Utilizamos como localidade para *R. lima* aquelas destacadas em Rosa *et al.* (2011).

Finalmente, o Grupo *Rineloricaria aequalicuspis* (Figura 12), composto por *R. aequalicuspis*, *R. anhangapitan*, *R. zaina*, *R. tropeira*, *R. maackii* e *R. anitae* possui o abdômen coberto ou parcialmente coberto por 3 a 5 séries regulares de placas e cinco séries de placas laterais. Esse grupo foi o único onde não encontramos um monofiletismo recíproco entre duas espécies de *Rineloricaria*. Nesse caso, *R. anitae* e *R. tropeira* não puderam ser distinguidas por não apresentarem divergências genéticas para os marcadores utilizados.

Ainda dentro do Grupo *Rineloricaria aequalicuspis*, as espécies *R. zaina* e *R. anitae* possuem tanto a região abdominal quanto a região da cintura escapular coberta por placas, enquanto as espécies *R. tropeira* e *R. aequalicuspis* possuem a região abdominal parcialmente coberta por placas e região da cintura escapular nua e as espécies *R. maackii* e *R. anhangapitan* possuem o abdômen coberto por placas e a região da cintura escapular nua. Além disso, essa combinação de padrões de coberturas da região abdominal não definem grupamentos monofiléticos internos ao grupo *R. aequalicuspis*. Isso demonstra, mais uma vez, que esse tipo de caráter é muito variável em *Rineloricaria*.

Muitos dos caracteres de *Rineloricaria* possuem grandes variações interespecíficas, como é o caso da ausência/presença dos filamentos nos raios indivisos da nadadeira caudal e ausência/presença da quinta série de placas laterais. Outros caracteres possuem grandes

variações intraespecíficas, muitas vezes relacionadas ao estágio de vida ou ao ambiente, como é o caso da variação quanto à cobertura de placas abdominais. Também existem caracteres que variam de acordo com o sexo, como é o caso do padrão de odontódeos dos machos maduros. Por outro lado, quando a amostragem de espécies é aumentada, pode-se perceber alguns padrões dentro de cada tipo de caráter mencionado.

Um bom exemplo disso são os padrões de dimorfismo sexual presentes em *Rineloricaria*, tendo sido descritos três tipos básicos de padrões de dimorfismo. O padrão de odontódeos presente em *R. heteroptera* e *Rineloricaria* sp. 7 é caracterizado por longos e finos odontódeos na lateral da cabeça, além de odontódeos curtos, perpendiculares e com a base coberta por pele na região pré dorsal. O padrão de odontódeos presente em algumas espécies de Terras Baixas, por sua vez, é caracterizado pelos odontódeos curtos na lateral da cabeça e odontódeos longos e inclinados na região pré-dorsal. Já a maioria das espécies de Terras Altas possui desenvolvimento de odontódeos na lateral da cabeça e nos espinhos das nadadeiras peitorais, não estando presentes os odontódeos desenvolvidos na região pré-dorsal. Esse terceiro padrão apresenta algumas variações quanto ao desenvolvimento de odontódeos, sendo que algumas espécies como *R. cf. langei* e *R. jaraguensis* apresentam um pequeno desenvolvimento de odontódeos na região pré-dorsal e nos raios das nadadeiras peitorais.

Pudemos identificar um quarto padrão de desenvolvimento de odontódeos em machos maduros em *Rineloricaria nigricauda* da bacia do Paraíba do Sul. Os exemplares machos sexualmente maduros apresentavam odontódeos bem desenvolvidos em quase todas as placas do corpo, com exceção das placas posicionadas na região ventral. Esse padrão extremo de dimorfismo é semelhante ao encontrado em espécies de *Harttia* (por exemplo, *Harttia leiopleura*) e em espécies de *Hartiella* (por exemplo, *Hartiella pilosa*).

Nossos resultados demonstram o quão importante é uma análise filogenética

independente para o melhor entendimento da evolução de determinados tipos de caracteres, além de mostrar que determinados estados de caráter aparecem várias vezes na história evolutiva de *Rineloricaria* e que esses caracteres, por serem tão variados, podem representar problemas quando utilizados em diagnoses de espécies, tal como em análises filogenéticas. Com isso, pudemos confirmar *Rineloricaria* como um grupamento monofilético que abrange alguns dos grupamentos fenéticos propostos por Isbrücker *et al.* (2001)

Estudos preliminares de ecomorfologia em *Rineloricaria*.

A Ecomorfologia é a área da ciência que estuda a relação entre a forma ou estruturas de determinados organismos com o tipo de habitat ou nicho que esse organismo ocupa (Motta *et al.*, 1995; Peres-Neto, 1999) e essa linha de pesquisa tem sido alvo de vários trabalhos em muitos grupos de peixes (Delariva e Agostinho, 2001). Alexander (1964), utilizando de argumentos empíricos, traçou paralelos entre várias estruturas presentes nos siluriformes com a função que essas características possuíam no estilo de vida desses peixes. Essas observações, tais como outras subsequentes, auxiliaram no entendimento sobre o hábito de vida de alguns grupos de peixes, além de fornecerem dados consistentes que norteiam trabalhos tanto do ponto de vista evolutivo quanto de conservação.

Nesse sentido iniciamos um estudo ecomorfológico, buscando entender em que condições ambientais determinados estados de caracteres presentes em *Rineloricaria* podem representar maiores valores adaptativos para seus portadores. Nesse estudo, a reconstrução filogenética funcionou como base para a proposição de nossas hipóteses ecomorfológicas e nos permitiu traçar paralelos com outros grupos de Loricariidae.

Todos os integrantes da família Loricariidae possuem em comum a alta interação com o leito do corpo d'água que ocupam. As espécies desse grupo são espécies bentônicas e se alimentam a partir do forrageio no leito do rio (Casatti e Castro, 2006). De um modo geral,

essa família possui uma dieta bastante variada, sendo que algumas espécies se alimentam principalmente de material de vegetação enquanto outras se alimentam de invertebrados presentes no substrato (Armbruster, 1998). O tipo de alimentação está diretamente ligado a padrões morfológicos distintos dentro da família, por exemplo, espécies que se alimentam de vegetação possuem proporcionalmente maior comprimento intestinal do que aquelas que se alimentam de invertebrados (Armbruster, 1998).

Os peixes da família Loricariidae possuem natação intermitente, o que confere a eles grande economia energética quando comparado com outros grupos de peixes com natação contínua (Blake, 2004). Existem duas características morfológicas importantes que propiciam a esses peixes explorarem esse tipo de natação intermitente: a forma geral do corpo e a boca em posição ventral. As espécies desse grupo possuem o corpo convexo na parte superior (que fica em contato direto com o fluxo de água) e plano na parte inferior (que fica em contato com o substrato), sendo que essa combinação cria uma pressão hidrodinâmica que viabiliza a fixação do peixe no substrato, possibilitando assim uma economia energética (Alexander, 1964; Blake, 2004). Além disso, os Loricariidae possuem a boca em posição ventral, sendo que os lábios funcionam como “ventosas” e também auxiliam na fixação do animal ao substrato (Alexander, 1964).

De forma mais particular, em Rodriguez e Reis (2008) foi observado que as espécies de *Rineloricaria* que ocupavam ambiente de rocha nas drenagens da Lagoa dos Patos, eram distintas das que ocupavam o ambiente de areia. As espécies do então chamado grupo da rocha possuem uma coloração de fundo geralmente marrom-escuro ou cinza-escuro, além de faixas transversais mais escuras no dorso, o abdômen quase completamente nu (caráter esse com grandes variações, incluindo ampla variação intraespecífica), cabeça larga (geralmente maior que a largura do tronco), focinho arredondado, área nua na frente do focinho ovalada e

não atingindo o poro anterior do ramo infraorbital do canal sensorial, cinco séries de placas laterais (a série média dorsal curta e limitada à área da base da nadadeira dorsal), *spinelet* da nadadeira dorsal presente.

Por outro lado, as espécies do grupo areia possuem a coloração de fundo marrom-clara ou amarelada, geralmente com as faixas do dorso também bastantes claras ou até mesmo ausentes, abdômen completamente coberto com placas organizadas de três a cinco séries regulares entre as placas látero-abdominais, cabeça estreita (geralmente mais estreita ou igual à largura do tronco), focinho pontiagudo, área nua na ponta do focinho alongado, ultrapassando o poro anterior do ramo infraorbital do canal sensorial, quatro série de placas laterais com a série de média dorsal ausente, *spinelet* da nadadeira dorsal ausente (Rodriguez e Reis, 2008).

Entretanto, Rodriguez e Reis (2008) analisaram espécies restritas ao sistema da Lagoa dos Patos, abrangendo muito pouco a diversidade total de espécies de *Rineloricaria*. Como mencionado anteriormente, *Rineloricaria* possui uma grande distribuição desde o Panamá até a Argentina, e sobretudo é um grupo que ocupa uma grande diversidade de habitats. Essa diversidade de habitats vem sendo apontada em quase todos os artigos mais recentes de descrição e revisão de espécies. Nesses trabalhos, a caracterização dos habitats levam em consideração principalmente a velocidade do fluxo de água e o tipo de substratos (Ingenito *et al.*, 2008; Fichberg e Chamon, 2002).

Ingenito *et al.* (2008) ao descrever *Rineloricaria maacki* e *R. langei* também traça um paralelo entre o padrão morfológico e o ambiente. Esse trabalho contradiz o proposto por Rodriguez e Reis (2008), dizendo que essa relação entre ambiente e os caracteres mencionados não é válida para *R. maacki*, que embora ocupe um ambiente de areia, possui características de espécie do grupo de rocha. Ingenito *et al.* (2008) argumenta que esses

padrões morfológicos podem estar mais atrelados a parentesco filogenético do que a convergência adaptativa.

Quando realizamos coletas em busca de amostra de *Rineloricaria maacki* de fato pudemos notar que a localidade-tipo se trata de um ambiente de areia, contudo notamos que a localidade dos parátipos é um ambiente de rocha. Rodriguez e Reis (2008) ao descrever os grupos dizem que essas espécies ocupam “preferencialmente” determinados tipos de ambiente e não exclusivamente tais ambientes, o que corrobora com o que observamos em nossas coletas.

Para a realização do presente estudo muitos esforços de captura foram realizados abrangendo grande parte da distribuição do gênero e também grande parte dos ambientes que *Rineloricaria* ocupa. Durante essas expedições foram tomadas notas acerca do tipo de ambiente onde as espécies de *Rineloricaria* eram mais frequentemente capturadas, levando-se em consideração principalmente o tipo de substrato onde os peixes foram coletados e a velocidade aproximada da correnteza. Buscamos sobrepor esses dados morfológicos com a reconstrução filogenética, a fim de testar a hipótese de que esse conjunto de caracteres traz consigo grande sinal filogenético ou se são fruto de convergência adaptativa. Para tanto, a partir do aumento da amostragem, dividimos os habitats ocupados por *Rineloricaria* em três categorias: ambiente de rocha, ambiente de areia e ambiente de vegetação (Figura 14).

Os ambientes de rocha são ambientes onde a velocidade do fluxo da água é alta e o leito é coberto por rochas de diferentes tamanhos. As espécies de *Rineloricaria* que habitavam esse tipo de ambiente eram encontradas sob ou sobre essas rochas. Os ambientes de areia são ambientes com o substrato variando em granulometria de cascalho a argila; as espécies de *Rineloricaria* desse tipo de ambiente ficam encostadas no fundo, algumas vezes parcialmente enterradas. Por fim, nos ambientes de vegetação o substrato em que as *Rineloricaria* ficam

aderidas varia bastante, sendo esse substrato composto por vegetações submersas, como troncos, gravetos, raízes ou folhas, constituindo o mais heterogêneo dos ambientes destacados.

Como já colocado, foi avaliada a frequência de determinados estados de cinco caracteres em cada tipo de ambiente, sendo: caráter 1= formato do pedúnculo caudal (A = truncado, B = achatado, C = afilado); caráter 2 = formato da ponta do focinho (A = arredondado, B = triangular, C = alongado); caráter 3 = comprimento do barbilhão (A = curto, não atinge a borda do lábio, B = médio, atinge, mas não ultrapassa a borda do lábio, C = longo, ultrapassando a borda do lábio); caráter 4 = número de séries de placas laterais (A = quatro séries, B = cinco séries); caráter 5 = fenda na lateral do lábio (A= profunda, B= rasa).

Ao sobrepor os estados de caráter com os tipos de ambiente, nota-se uma predominância de certos estados de caráter em determinadas condições ambientais (Figura 15). Através do método de qui-quadrado, observamos que cada tipo de ambiente possui sua identidade quando se avalia a frequência de determinados estados de caracteres em cada tipo de ambiente (Figura 16).

Ainda através dessa análise pode-se observar que no ambiente de rocha existiam apenas espécies de *Rineloricaria* com pedúnculo caudal espesso (caráter 1 A), enquanto que em geral as espécies de vegetação possuem o pedúnculo caudal afilado e no ambiente de areia são encontradas os três estados do caráter 1 (Figura 2, 15 e 16).

De acordo com Covain e Fisch-Muller (2007), espécies com pedúnculo caudal mais espesso em geral são espécies de hábitos reofílicos, ou que enfrentam correntezas fortes; as que possuem pedúnculo caudal mais achatado provavelmente possuem maior facilidade de se enterrarem na areia e espécies de vegetação geralmente possuem o pedúnculo caudal mais achatado, podendo se camuflar com maior facilidade em ambientes de gravetos e galhos

submersos, além de poderem se deslocar com mais facilidade nesse tipo de ambiente repleto de obstáculos. Esses dados estão de acordo com o observado em nossos estudos.

Quanto ao caráter 2, as espécies de rocha e de areia possuem a cabeça preferencialmente arredondada ou triangular (caráter 2 A e B), enquanto as espécies de vegetação possuem a cabeça geralmente mais alongada (caráter 2 C) (Figuras 2, 15 e 16). Segundo Blake (2004) a forma da cabeça está associada à resistência na água e é possível que esses padrões de cabeça encontrados nas *Rineloricaria* de rocha e de areia confirmem a elas melhor hidrodinâmica, possibilitando assim maior economia de energia, enquanto as espécies de vegetação estariam protegidas da correnteza imersas entre a vegetação submersa.

O comprimento do barbilhão (caráter 3) é uma caso um tanto diferente. Segundo Alexander (1964) de um modo geral o barbilhão é um órgão sensorial que os peixes utilizam para encontrar alimento ao forragear o substrato. Ainda de acordo com o mesmo autor os barbilhões mais curtos são utilizados por animais que se alimentam de pequenos itens do substrato. Já por sua vez, os barbilhões mais alongados são muitas vezes relacionados ao papel secundário de percepção espacial, evitando obstáculos. As *Rineloricaria* de rocha possuem barbilhões curtos (caráter 3 A), as de areia possuem barbilhões geralmente médios (caráter 3 B) enquanto que as de vegetação são as que possuem geralmente o barbilhão mais alongado (Figuras 3, 15 e 16), o que pode indicar que de fato esses peixes utilizam os barbilhões também para a percepção espacial em um ambiente repleto de obstáculos como o de vegetação.

Quase todas as espécies de *Rineloricaria* de rocha possuem 4 séries de placas laterais (caráter 4 A), enquanto as espécies de vegetação e de areia não possuem uma predominância acentuada de nenhum dos estados desse caráter.

Por fim, quando avaliamos a presença de padrões de estados do caráter 5 associados ao

tipo de meio, percebemos que as espécies de rocha e vegetação tendem a possuir fenda profunda no lábio (caráter 5 A) enquanto que as espécies de areia tendem a não possuir essa fenda (caráter 5 B) (Figuras 3, 15 e 16). Segundo Alexander (1964), os loricariídeos ao se fixarem utilizam a fenda do lábio como canal para entrada de água na cavidade oral, mantendo assim o fluxo de água nas brânquias, o que possibilita a respiração até quando o peixe está utilizando a boca como ventosa. As espécies de substrato consolidado (rocha ou vegetação) devem utilizar essa estrutura para manter o fluxo de água nas brânquias enquanto utilizam a boca como ventosa, o que permite a economia de energia. Já em ambiente não consolidado, como o de areia, a fenda não teria tanta utilidade, pois a boca como ventosa não seria eficiente em ambientes desse tipo.

Quando extrapolamos a observação desses padrões morfológicos observados em *Rineloricaria* para os demais gêneros de Loricariinae, podemos perceber que a relação entre esse conjunto de caracteres e o hábitat também é mantida. Os gêneros *Harttia*, *Ixinandria*, *Harttiella* e *Fonchiiloricaria* são outros gêneros de Loricariinae que ocupam ambientes do tipo rocha. Esses gêneros, tal como as espécies de *Rineloricaria* do ambiente de rocha, possuem pedúnculo caudal robusto, ponta do focinho arredondado, barbilhão curto, cinco séries de placas laterais e a fenda labial profunda, quando presente (Oyakawa, 1993; Rodriguez *et al.*, 2008b; Covain e Fisch-Muller, 2007; Covain *et al.*, 2012; Rodriguez *et al.*, 2012).

Gêneros como *Limatulichthys*, *Loricariichthys*, *Sturisoma*, *Planiloricaria*, *Paraloricaria*, *Loricaria*, *Spatuloricaria*, *Furcodontichthys*, *Crossoloricaria*, *Aposturisoma*, *Apistoloricaria*, *Hemiodontichthys* e *Lamontichthys*, que são gêneros tradicionalmente encontrados em ambientes de areia, também possuem as combinações de caracteres presentes entre as espécies de “*Rineloricaria* de areia”, como pedúnculo caudal achatado, ponta do focinho com formato variável, barbilhão médio ou grande, quatro séries de placas laterais e

fenda labial rasa (Covain e Fisch-Muller, 2007; Fichberg, 2008), características também observadas no presente estudo.

Outro gênero de Loricariinae que ocupa preferencialmente vegetação é o gênero *Farlowella*. Assim como nas *Rineloricaria* do grupo de vegetação, *Farlowella* possui o pedúnculo caudal e o corpo de uma forma geral bastante afilado. Possuem também a cabeça alongada e variação quanto ao número de séries de placas. Por outro lado não possuem o barbilhão alongado, tampouco uma fenda labial evidente. É possível que para esses caracteres estruturas análogas ou diferentes estratégias forneçam às *Farlowella* elevado valores adaptativos em ambientes de vegetação. Tanto *Farlowella* quanto *Harttia* não possuem a fenda labial evidente, entretanto, as espécies desses gêneros possuem uma expansão lateral da cavidade oral que quase atinge a borda do lábio, o que pode servir como análogo à fenda labial (Figura 3-D).

Esse tipo de convergência múltipla de caracteres também já foi notado em espécies do gênero *Astyanax* da América Central (Ornelas-García, 2008). Nesse gênero determinados caracteres surgiram em conjunto sempre relacionados ao ambiente cavernícola ou lacustre. Esses autores interpretaram que tais características são fruto de convergência não apenas de um determinado caráter, mas sim um conjunto grande de caracteres.

O fato de esses estados de caracteres estarem presentes em grupos distintos e associados ao tipo de habitat nos demonstra, mais uma vez, que se trata de convergência adaptativa e não um caso de resquícios de ancestralidade imediata comum. Os surgimentos independentes dos padrões morfológicos em diferentes linhagens de *Rineloricaria* dão indício de uma pré-disposição do gênero a adquirir essas características morfológicas, podendo ser um exemplo de homologia subliminar tal como descrito em Hall (2003).

A utilização desses tipos de caracteres convergente na reconstrução filogenética pode acarretar não somente no aumento do ruído das análises, como também pode forçar

grupamentos errôneos, interpretando como sinapomorfias caracteres fenotípicos fortemente selecionados em determinadas condições ambientais.

Biogeografia de *Rineloricaria*.

A partir da técnica de relógio molecular e da análise de Lagrange, pudemos não somente hipotetizar uma data para os principais eventos cladogenéticos ocorridos em *Rineloricaria*, como também inferir parte da jornada que levou o gênero a atual distribuição. Antes de adentrarmos nesse histórico é necessário entender com mais detalhes parte da geomorfologia da região Neotropical, além de conhecer os processos tectônicos pelos quais essa região passou em épocas mais recentes. Como mencionado anteriormente, essa região atualmente é dividida em Transandina e Cisandina e por sua vez a região Cisandina pode ser subdividida em Terras Altas e Terras Baixas. Do ponto de vista geológico as Terras Baixas são compostas basicamente por rochas sedimentares, enquanto que as Terras Altas são divididas em dois escudos cristalinos muito antigos, com mais de 700 milhões de anos: Escudo Brasileiro e Escudo das Guianas. Nesse trabalho analisamos espécies das Terras Baixas e Altas, mais precisamente do Escudo Cristalino Brasileiro. Para melhor entendimento da discussão, separamos as espécies em dois conjuntos: espécies de Terras Baixas, compreendendo as espécies ocupantes das regiões biogeográficas Amazônica, Orinoco Transandina (AOT), bacia do Paraguai, baixo Paraná e baixo Uruguai (PRT) e espécies de Terras Altas que são as ocupantes das regiões biogeográficas Alto Paraná (APR), bacias litorâneas (BLT), Alto Uruguai (AUG), Alto Iguaçu (AIG) e bacia do São Francisco (BFR).

O início da história do gênero se dá entre 17 e 14 milhões de anos atrás (Figura 13), em um período onde a estrutura das bacias hidrográficas da região Neotropical era muito diferente. Nesse período os Andes ainda não possuíam sua atual conformação, principalmente

em sua porção norte (Lundberg, 1998; Albert *et al.*, 2006; Schaefer, 2011). As cladogêneses mais antigas de *Rineloricaria* (entre 14,5 e 8,5 milhões de anos) ocorreram entre as espécies que ocupam as Terras Baixas, mais precisamente entre as espécies ocupantes da região biogeográfica AOT. As demais espécies do gênero são derivadas das espécies ocupantes dessa região, o que sugere que AOT se trata do centro de origem e dispersão do gênero *Rineloricaria* (Figura 13).

Nesse período as regiões biogeográficas AOT e PRT já eram separadas pelo *Chapare Buttes* (Lundberg, 1998) e a hidrografia da região AOT era basicamente constituída pela bacia do páleo-Amazonas-Orinoco. Essa era uma enorme bacia hidrográfica que desaguava provavelmente no mar do Caribe (Lundberg, 1998) e onde drenagens do oeste Amazônico (limitadas pelos Andes a oeste e arco Purus a leste) juntamente com as drenagens do rio Orinoco drenavam juntas para o chamado Lago Pebas, constituindo assim o sistema Pebas. A porção mais ao norte desse lago tinha conexão com o mar caribenho. O Lago Pebas era um enorme lago que perdurou entre 20 e 11 milhões de anos e cobria uma área de aproximadamente um milhão de quilômetros quadrados (Lundberg, 1998; Winemiller e Willis, 2011).

Alguns eventos de incursões marinhas se sucederam no sistema Pebas nesse período (Lundberg, 1998; Winemiller e Willis, 2011; Albert e Reis, 2011). Nesses eventos, devido a um aumento relativo do nível do mar (Lovejoy *et al.*, 2006; Bloom e Lovejoy, 2011), a água salgada adentrava no sistema Pebas causando extinções e também promovendo eventos vicariantes entre espécies de água doce (Albert *et al.*, 2006; Bloom e Lovejoy, 2011). Esses eventos vicariantes se davam pelo isolamento da ictiofauna de água doce nas drenagens mais altas do sistema Pebas, então tomado por água salgada do oceano. Este pode ter sido um dos motivos do início das diversificações ocorridas em *Rineloricaria*.

Com o passar do tempo e com a evolução da geografia do noroeste da América do Sul o gênero *Rineloricaria* seguiu se diversificando e há cerca de 12 milhões de anos, quando a cordilheira oeste (CO) dos Andes soergueu, *Rineloricaria* já possuía no mínimo 4 linhagens distintas: clado 1, clado 2 clado 3 e uma quarta linhagem composta pelos demais clados da filogenia (Figura 13). Esse soerguimento foi responsável por muitos processos cladogenéticos que ocorreram em muitos grupos de peixes Cis-Transandinos (Albert *et al.*, 2006).

Foram analisadas duas espécies Transandinas, *Rineloricaria uracantha* e *R. rupestris*. *R. uracantha* é uma espécie distribuída no Panamá e noroeste da Colômbia, sempre a oeste da CO. Portanto o soerguimento dos Andes deve marcar o mínimo de tempo em que ocorreu a primeira cladogênese do clado 3. Por outro lado, embora *R. rupestris* seja considerada uma espécie Transandina, ela não possui a mesma distribuição que *R. uracantha*. *R. rupestris* é distribuída pelas drenagens do Lago Maracaibo.

A ictiofauna do atual Lago Maracaibo é proveniente dos rios Magdalena e Orinoco (Albert *et al.*, 2006; Perez e Taphorn, 1993). A ictiofauna compartilhada entre o rio Orinoco e o Lago Maracaibo se deve à conexão que existia entre as duas drenagens, que só foi quebrada com o soerguimento do Merida Andes, há aproximadamente 8 milhões de anos (Albert *et al.*, 2006). Por outro lado, a separação entre a ictiofauna do rio Magdalena e Lago Maracaibo é datada em aproximadamente 4 milhões de anos (Albert *et al.*, 2006). Em Albert *et al.* (2006) e Perez e Taphorn (1993) foi constatada que a maioria da fauna atualmente presente no Lago Maracaibo provem dessa mistura com o rio Magdalena. Ainda segundo Albert *et al.* (2006), eventos de incursões marinhas ocorridas entre o soerguimento do Merida Andes e a mistura com o Magdalena teriam sido responsáveis por extinções de grande parte da ictiofauna do Lago Maracaibo proveniente do rio Orinoco.

Uma hipótese que explicaria a mistura entre peixes do rio Magdalena e Lago

Maracaibo foi proposta por Perez e Taphorn (1993). Nessa hipótese, por um determinado tempo o rio Magdalena teria seu fluxo bifurcado em dois leitos, um dos ramos drenando para noroeste em direção à foz do Rio Cauca, enquanto o outro drenaria para o nordeste em direção ao Lago Maracaibo. Essa bifurcação só teria sido interrompida com a elevação da Serra Périja, ocorrida entre 53 e 3 milhões de anos atrás (Kellogg, 1984), definindo assim os leitos atuais do rio Magdalena e do sistema do Lago Maracaibo. Outro modelo que poderia explicar esse padrão de relacionamento entre a ictiofauna das duas bacias é o de capturas de cabeceiras entre as bacias do Lago Maracaibo e rio Magdalena, sendo inclusive a elevação da Serra Périja uma possível causadora de tais rearranjos hidrográficos.

Nossas análises indicam que *Rineloricaria. rupestris* se separou das espécies Cisandinas pertencentes ao clado 1 há aproximadamente 11,7 milhões de anos. Essa data coincide com a elevação da CL e sugere que *R. rupestris*, tal como a maioria dos peixes presentes no Lago Maracaibo, deva ser proveniente da mistura com o rio Magdalena. Essa datação também indica que *R. rupestris* não foi separada das espécies Cisandinas pelo soerguimento do Merida Andes (8 Ma). Mesmo quando levamos em consideração a variância do relógio segundo Crisp *et al.* (2011), a hipótese de separação pelo soerguimento do Merida Andes é descartada.

Enquanto o soerguimento dos Andes causava diretamente grandes mudanças hidrográficas do lado Transandino, alguns dos seus reflexos eram responsáveis por mudanças ocorridas nas paleo-drenagens da região Cisandina. Além desse tectonismo, grandes depósitos sedimentares na calha do paleo-Amazonas-Orinoco erguiam a porção oeste da bacia e somado às ações erosivas contribuíam para encobrir o Arco Purus (Lundberg, 1998) propiciando assim a mudança do leito do Amazonas. A consolidação das atuais drenagens do Amazonas e Orinoco teve seu desfecho com o surgimento do Arco Vaupes entre 10 e 8 milhões de anos

(Lundberg, 1998; Winemiller e Willis 2011).

Em Hubert *et al.* (2007) o aparecimento do Arco Vaupes foi apontado como um promotor de vicariância entre os peixes do Amazonas e do Orinoco. Esse evento pode ser o responsável pela cladogênese que ocorreu entre *Rineloricaria caracacensis* (do Orinoco) e as demais espécies do Clado 1 (do Amazonas). De fato essa cladogênese é datada em nove milhões de anos, o que condiz com o surgimento do arco Vaupes (Figura 13).

Há cerca de 8 milhões de anos atrás começam a aparecer as primeiras linhagens de *Rineloricaria* ocupantes da bacia do Prata, mais especificamente da região biogeográfica 2 (PRT) mencionada anteriormente. Montoya-Burgos (2003) e Torrico *et al.* (2009) encontraram um padrão semelhante para os gêneros *Hypostomus* e *Pseudoplatystoma*, respectivamente. Segundo esses trabalhos uma grande quantidade de capturas de cabeceiras que teriam ocorrido entre 11,8 a 10 milhões de anos seriam as responsáveis por esse trânsito de faunas do Amazonas para o Paraguai. Esses autores apontam como responsável por essas capturas a mudança da localização das fronteiras entre a bacia Amazônica e do Prata, que ocorreu de 11,8 a 10 Ma (Lundberg, 1998)

Lundberg (1998), ao descrever esse evento, cita que o sentido da mistura ictiofaunística teria ocorrido do sul para o norte, que é o sentido contrário do encontrado por Montoya-Burgos (2003), Torrico *et al.* (2009) e também o verificado no presente estudo.

Embora a primeira etapa de trânsito de espécies de *Rineloricaria* entre as bacias do Amazonas e Prata tenha ocorrido há aproximadamente 8 milhões de anos, nossos dados demonstram que esse fluxo persistiu até menos de um milhão de anos atrás. Isso pode ser notado tanto no grupo *R. lanceolata* quanto no grupo *R. aurata* (Figura 13).

Os grupos *Rineloricaria aurata* e *R. lanceolata* são amplamente distribuídos pelas drenagens amazônicas e da região biogeográfica PRT. A relação entre as amostras de diferentes localidades nos mostrou um complexo padrão biogeográfico dentro de cada grupo;

cada grupo apresenta um parafiletismo recíproco entre as amostras amazônicas e de PRT. Além disso, dentro de cada um dos dois grupos, as cladogêneses mais antigas ocorreram dentro da bacia Amazônica (Figura 13), o que dá indício de que cada um desses grupos tenha se originado na região Amazônica e que posteriormente tiveram acesso à região PRT. Por outro lado, como em cada um dos grupos as espécies não se organizam monofileticamente em subgrupo amazônico/subgrupo PRT, conclui-se que a mistura de faunas entre as duas regiões ocorreu mais de uma vez no tempo e/ou no espaço, sendo que a mais recente que pudemos observar ocorreu entre espécies do grupo *R. aurata* há aproximadamente 0,5 milhão de anos.

Quando observamos a região de fronteiras entre as duas bacias podemos notar uma proximidade muito grande entre as cabeceiras do rio Paraguai e as dos rios Tapajós, Xingu, Tocantins, Madeira e Purus, o que facilitaria capturas de cabeceiras entre as duas regiões (Carvalho e Albert, 2011). Nessa região de fronteiras já foram detectados muitos casos de mistura ictiofaunística em diferentes níveis taxonômicos e provavelmente em diferentes tempos (Carvalho e Albert, 2011)

Capturas de cabeceiras são eventos onde parte de uma drenagem muda seu curso para uma drenagem adjacente, provocando, na maioria das vezes, tanto vicariância quanto geodispersão (Bloom e Lovejoy, 2011). Lima e Ribeiro (2011) discutem sobre as duas possíveis causas de captura de cabeceira, sendo uma delas diretamente relacionada ao tectonismo, onde um determinado riacho pode desviar bruscamente seu leito devido à reestruturação da crosta. De fato, essa parte da região de fronteira entre a bacia amazônica e do Paraguai está situada em cima do delineamento transbrasileiro, que é um aglomerado de falhas tectônicas que cortam grande parte do território brasileiro no sentido sudoeste-nordeste. Essa região da plataforma brasileira passou por intensa movimentação acompanhada de soerguimentos epirogenéticos que permitiram a reativação dessas falhas antigas (Ross, 1991), o que pode ter propiciado capturas de cabeceiras entre as duas bacias.

Uma segunda causa para capturas de cabeceiras entre esses dois sistemas podem ser devido aos megaleques aluviais. Nesses megaleques, característicos de regiões de planícies, com o passar do tempo e com o avanço de processos erosivos e consequentes sedimentações nos leitos, algumas drenagens deslocam suas calhas lateralmente, o que muitas vezes pode promover comunicação entre drenagens de planícies adjacentes (Carvalho e Albert, 2011). Como consequência do soerguimento dos Andes existe uma abaixamento dos territórios adjacentes à cordilheira, o que cria o sistema de planícies das bacias ante-país. Segundo Carvalho e Albert (2011) existem registros de sistemas de megaleques nas regiões de planícies, adjacentes aos Andes, que delimitam as fronteiras entre as drenagens do Amazonas e do Paraguai. É possível que esses megaleques tenham promovido capturas entre essas bacias, o que pode ter propiciado que espécies amazônicas tivessem acesso às drenagens do Paraguai.

Como é possível notar na Figura 13, *Rineloricaria* teve por várias vezes linhagens capturadas da bacia do Amazonas para a bacia do Paraguai, o que provavelmente tenha ocorrido devido à somatória de eventos geológicos presentes na região, que além de promoverem capturas no sentido Amazonas-Paraguai, foram responsáveis pelo avanço da planície do Paraguai em direção ao planalto brasileiro nos últimos 65 milhões de anos. Como esse avanço da bacia do Paraguai rumo ao norte foi gradual, ele pode ter proporcionado muitas capturas de rios das drenagens sul do Amazonas também de forma gradual. Isso explicaria as diferentes datações que separam linhagens de *Rineloricaria* do Paraguai e Amazonas.

Outros eventos de cladogênese envolveram espécies da bacia do Amazonas e de bacias adjacentes. Porém, nesse caso, a mistura não envolve espécies do rio Paraguai e sim espécies da região do alto Paraná (APR). Uma dessas cladogêneses ocorreu entre a espécie *R. osvaldoi* (bacia do Tocantins-Araguaia) e *R. pentamaculata* (bacia do alto Paraná).

Montoya-Burgos (2003) encontrou um padrão de relacionamento parecido e atribuiu como possível causador de tal mistura a mudança de fronteiras entre a bacia do Amazonas e Paraguai (Lundberg, 1998). Contudo, esse evento tal como descrito em Lundberg (1998) ocorreu bem mais a leste, na região do arco Michicola, próximo aos Andes.

Vários autores relatam capturas de cabeceiras entre a bacia do Paraná e a do Tocantins (Montoya-Burgos, 2003; Hubert *et al.*, 2007; Torrico *et al.*, 2009), sendo em alguns casos documentadas misturas recentes em uma região conhecida como Águas Emendadas. Nessa região, cabeceiras das bacias do São Francisco, Tocantins e Paraná são muito próximas e proporcionam a troca ictiofaunística (Torico *et al.*, 2009; Lima e Caires, 2011). Esse tipo de evento regional parece ser a explicação mais provável para a cladogênese entre *Rineloricaria osvaldoi* e *R. pentamaculata*, que ocorreu há aproximadamente 5,3 milhões de anos.

No grupo *Rineloricaria latirostris* algo semelhante ocorreu há 7,5 milhões de anos, quando houve uma cladogênese entre espécies da bacia amazônica e alto Paraná, e do alto Paraná com São Francisco. Essa mistura pode ter acontecido por meio de capturas de cabeceiras nessa região de Águas Emendadas. Nossos dados indicam também um possível evento de extinção ou falha amostral dentro desse grupo.

Quando observarmos a topologia podemos notar que *Rineloricaria parva*, exclusiva da região PRT, é irmã de um grande grupo de espécies ocupantes das regiões do BLT, AUR, AIG e BSF (Figura 13). Menezes *et al.* (2008) encontraram uma relação semelhante entre as espécies de Glandulocaudinae e hipotetizaram que a distribuição das espécies do grupo entre as bacias do Leste, alto Paraná, alto Iguaçu e Paraguai se deve a diferentes eventos de captura de cabeceiras. Nessa hipótese capturas de cabeceiras teriam propiciado que espécies de *Mimagoniates* fossem capturadas do alto Paraná para o Paraguai e enquanto isso na Serra do Mar, outras capturas de cabeceira aconteciam e capturavam espécies de *Mimagoniates* do alto Paraná para a Bacia do Leste e dessa para o alto Iguaçu. Contudo, nossos resultados sugerem

uma rota alternativa para *Rineloricaria*: em nossos resultados o ancestral *R. parva* (região PRT e das espécies de Terras Altas (exceto as espécies da região APR) era ocupante da região PRT, e a partir dessa região passou a ocupar a região BLT, sendo que mais tarde, em diferentes ocasiões, espécies de BLT também foram capturadas para as regiões AUG e AIG. Toda essa trajetória teve seu início há 8,5 milhões de anos, com a cladogênese que dá origem a todo esse grupo a partir de linhagens da região AOT. Essa cladogênese provavelmente foi propiciada por capturas de cabeceiras entre a bacia Amazônica e bacia do Paraguai, tal como discutido anteriormente. Outro passo importante acontece em torno de 7 milhões de anos, quando uma linhagem ocupante da região BLT se deriva do ancestral da região PRT (Figura 13).

A fronteira entre essas duas regiões é a região da foz do rio da Prata. Então provavelmente foi por ali que ocorreu a ocupação da região BLT pelas espécies de *Rineloricaria*. Duas causas podem ter propiciado a ocupação da região BLT por essas espécies: a primeira delas pode ser por capturas de cabeceiras entre drenagens ao norte da foz do rio da Prata e rios litorâneos do sul da BLT e a outra causa pode ser devido à flutuações do nível do mar.

Segundo Menezes *et al.* (2008) espécies que ocorrem em planícies litorâneas tem a possibilidade de dispersão entre bacias adjacentes durante períodos de baixo nível do mar. Segundo Haq *et al.* (1987) o nível do mar sofreu grandes oscilações durante os últimos 10 milhões de anos. É possível que em um período de baixo nível do mar o ancestral das espécies da região BLT tenha tido acesso à essa região e a elevação do nível do mar que ocorreu há 7 milhões de anos (Haq *et al.*, 1997) pode ter sido o evento vicariante que separou essas duas linhagens. Nossas datações condizem com essa sequência de eventos (Figura 13).

Os últimos 2,5 milhões de anos apresentam um grande número de cladogêneses entre as espécies do grupo do leste. Menezes *et al.* (2008) apontam a possibilidade da oscilação do

nível do mar entre os períodos de glaciação e interglaciação ter sido responsável por muitas das cladogêneses ocorridas entre espécies de peixes dessa região. Essa epistasia devido a variações climáticas também podem explicar as cladogêneses de *Rineloricaria* da região BLT. É evidente que ciclos de abaixamento e elevação do nível do mar, sejam eles por mudanças geológicas ou climáticas, não devam ser explicações isoladas para justificar todas as cladogêneses entre espécies litorâneas de *Rineloricaria*. Provavelmente esse tipo de evento epistático auxiliou na diversificação de espécies de *Rineloricaria* da região BLT.

Por outro lado, no mesmo intervalo de tempo, outras cladogêneses separaram espécies da região BLT de espécies da região AUR e AIG. Esse mesmo tipo de relação também foi retratada em Menezes *et al.* (2008) e segundo Ribeiro (2006) a fronteira entre essas regiões sofreu muitas capturas de cabeceiras devido a reativações de falhas presentes na Serra do Mar (divisor de águas entre essas regiões). Podemos notar também que as espécies de *Rineloricaria* da região AIG são oriundas de três regiões distintas: APR, AUR e AIG (Figura 13). Muitas das cabeceiras do rio Iguaçu estão presentes na região da formação geológica do Arco de Ponta Grossa, região essa que sofreu grandes rearranjos tectônicos (Ribeiro, 2006), o que pode ter causado essas grande taxa de mistura ictiofaunística.

Embora nosso trabalho tenha demonstrado a rota mais provável pelas quais *Rineloricaria* teria se dispersado pela região Neotropical, essa pode ser a explicação para a distribuição de outros grupos de peixes que compartilhem essa distribuição ampla. Com o acréscimo de trabalhos biogeográficos desses outros grupos, será possível não somente compreender os padrões biogeográficos da região Neotropical, como também datar eventos mais particulares e que ainda não possuam um conhecimento aprofundado do ponto de vista ecológico. Com isso poderemos entender não somente a história biológica dos peixes Neotropicais como também detalhar o histórico geológico do continente.

CONCLUSÕES

O presente estudo propõe uma hipótese de relações filogenéticas entre a maioria das espécies de *Rineloricaria*, com elevada sustentação estatística. Essa reconstrução filogenética permitiu tirar as seguintes conclusões específicas:

- 1) *Rineloricaria* é um grupo monofilético se considerarmos os grupos “*Leliella*” “*Hemiloricaria*” e “*Fonchiiichthys*” como sinônimos juniores.
- 2) *Rineloricaria* possui várias espécies que ainda precisam ser descritas.
- 3) *Rineloricaria lanceolata* possui elevada diferenciação genética e morfológica entre suas populações, o que indica que se trata de um complexo de espécies.
- 4) *Rineloricaria langei* possui variações morfológicas não apontadas em seus trabalhos de descrição.
- 5) *Rineloricaria* possui grupos monofiléticos de espécies com caracteres morfológicos que os definem.
- 6) Vários dos caracteres previamente utilizados para definir grupos internos a *Rineloricaria* são homoplásticos.
- 7) Alguns caracteres presente em *Rineloricaria* são fortemente influenciados por fatores ambientais, como velocidade da água e tipo de substrato. Esses tipos de caracteres podem representar problemas em reconstruções filogenéticas morfológicas.
- 8) *Rineloricaria* teve seu início entre 14 e 17 milhões de anos, na região da bacia do páleo-Amazonas-Orinoco. Posteriormente, provavelmente devido a

reativações tectônicas de falhas presentes na plataforma brasileira, espécies do gênero tiveram acesso a bacias mais ao sul como as do rio Paraguai e Alto Paraná.

9) A passagem de espécies da bacia amazônica para as bacias do sul ocorreu em várias ocasiões, demonstrando um evento gradual e relativamente contínuo de trocas ictiofaunísticas entre essas bacias hidrográficas.

10) Eventos eustáticos devem ter tido grande participação na diversificação e distribuição entre espécies ocupantes do sistema de Bacias do Leste.

11) Reativações de falhas tectônicas presentes na Serra do Mar provavelmente promoveram capturas de cabeceiras entre as bacias litorâneas e suas adjacentes do interior, possibilitando assim o acesso de espécies de *Rineloricaria* às drenagens do Alto Uruguai e Alto Iguaçu.

Referências Bibliográficas

Albert JS, Reis RE. (2011). Historical biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. Univ. of California Press, Berkeley, Los Angeles.

Alexander RMcN. (1965). Structure and function in the catfish. *J Zool.*, 148:88-152.

Armbruster JW. (2004). Phylogenetic relationships of the sucker-mouth armored catfishes (Loricariidae) with particular emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zool J Linn Soc*, 141:1-80.

Armbruster JW. (1998). Modifications of the Digestive Tract for Holding Air in Loricariid and Scoloplacid Catfishes. *Copeia*, 1998(3):663-675.

Bloom DD, Lovejoy NR. (2011). The biogeography of marine incursions in South America. In: Albert JS, Reis RE eds. Historical biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. Univ. of California Press, Berkeley, Los Angeles. 137–144.

Blake RW. (2004). Fish functional design and swimming performance. *J Fish Biol.*, 65(5):1193–1222.

Brian K, Hall BK. (2003). Descent with modification: the unity underlying homology and homoplasy as seen through an analysis of development and evolution. *Biol Rev Camb Philos Soc.*, 78(3):409-33.

Buckup PA. (2011). The Eastern Brazilian Shield. In: Albert JS, Reis RE eds. Historical biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. Univ. of California Press, Berkeley, Los Angeles. 203-210.

Carvalho TP, Albert JS. (2011): The Amazon-Paraguay Divide. In: Historical biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. Univ. of California Press, Berkeley, Los

Angeles. 191-202.

Casatti L, Castro RMC. (2006). Testing the ecomorphological hypothesis in a headwater riffles fish assemblage of the rio São Francisco, southeastern Brazil. *Neotrop. Ichthyol.*, 4(2): 203-214.

Chiachio MC, Oliveira C, Montoya-Burgos JI. (2008). Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Mol Phylogenet Evol.*, 49(2): 606-17.

Covain R, Fisch-Muller S. (2007). The genera of the Neotropical armored catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes: Loricariidae): a practical key and synopsis. *Zootaxa*, 1462: 1–40.

Covain R, Dray S, Fisch-Muller S, Montoya-Burgos JI. (2008). Assessing phylogenetic dependence of morphological traits using co-inertia prior to investigate character evolution in Loricariinae catfishes. *Mol Phylogenet Evol.*, 46(3): 986-1002.

Covain R, Fisch-Muller S, Montoya-Burgos JI, Mol JH, Bail PYL, Dray S. (2012). The Harttiini (Siluriformes, Loricariidae) from the Guianas: a multi-table approach to assess their diversity, evolution, and distribution. *Cybium*, 36(1): 115-161.

Crisp MD, Trewick SA, Cook LG. (2011). Hypothesis testing in biogeography. *Trends Ecol Evol.*, 26(2): 66-72.

Delariva RL, Agostinho AA. (2001). Relationship between morphology and diets of six neotropical Loricariids. *J Fish Biol.*, 58: 832–847.

Drummond A, Rambaut A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol.*, 8(7): 214.

Eschmeyer W. (2011). Catalog of fishes. Electronic publication in “World Wide Web”. Available at <http://www.calacademy.org/research/ichthyology/catalog>. Acessado em

16 de Janeiro de 2013.

Eigenmann CH, Eigenmann RS. (1890). A revision of the South American Nematognathi or catfishes. Occasional Papers of the California Academy of Sciences, 1: 1-508.

Edgar RC. (2004). Muscle: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics.*, 5:113.

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4): 783-791.

Ferraris CJ Jr. (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, 1418: 1-628.

Fichberg I. (2008). Relações filogenéticas das espécies do gênero *Rineloricaria* Bleeker, 1862 (Siluriformes, Loricariidae, Loricariinae). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Fichberg I, Chamon CC. (2008). *Rineloricaria osvaldoi* (Siluriformes: Loricariidae): a new species of armored catfish rio Vermelho, Araguaia basin, Brasil *Neotrop. Ichthyol.*, 6(3): 347-354.

Ghazzi MS. (2008). Nove espécies novas do gênero *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) do rio Uruguai, do sul do Brasil. *Iheringia, Sér. Zool.*, 98(1): 100-122.

Hall TA. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Series*, 41: 95-98.

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. (2001). PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleo. Electronica*, 4: 1-9.

Haq BU, Hardenbol J, Vail PR. (1987). Chronology of Fluctuating Sea Levels Since The Triassic. *Science*, 235(4793):1156-1167.

Holt BG, Lessard JP, Borregaard MK, Fritz SA, Araújo MB, Dimitrov D, Fabre PH, Graham CH, Graves GR, Jønsson KA, Nogués-Bravo D, Wang Z, Whittaker RJ, Fjeldså J, Rahbek C. (2013). An Update of Wallace's Zoogeographic Regions of the World. *Science*, 339(6115): 74-78.

Hubert N, Duponchelle F, Nuñez J, Garcia-Davila C, Paugy DE, Renno JF. (2007). Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Mol Ecol.*, 16(10): 2115-2136.

Huelsenbeck JP, Ronquist F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8):754–755.

Hulsey CD, López-Fernández H. (2011). Nuclear Central America. In: Albert JS, Reis RE, eds. Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. Univ. of California Press, Berkeley, Los Angeles. 279-292.

Ingenito LFS, Ghazzi MS, Duboc LF, Abilhoa V. (2008). Two new species of *Rineloricaria* (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Iguaçu basin, southern Brazil. *Neotrop Ichthyol.*, 6(3): 355-366.

Isbrücker IJH. (2001). Nomenklator der gttungen und Arten der Harnischwelse, familie Loricariidade Rafinesque, 1815 (Teleostei, Ostariophysi). Artenliste Taxonomie Sonderheft *Harnischewelse*, 2: 25-32.

Isbrücker IJH, Nijssen H. (1976). *Rineloricaria heteroptera*, a new species of mailed catfish from Rio Amazonas near Manaus, Brazil (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Zool Anz*, 196: 109-124.

Isbrücker IJH, Seidel I, Michels JP, Schraml E, and Werner A. (2001). Diagnose vierzehn neuer Gattungen der Familie Loricariidae Rafinesque, 1815 (Teleostei, Ostariophysi).

In: Stawikowski R (ed.). *Harnischwelse*, 2. Die Aquarien- und Terrarien Zeitschrift, Sonderheft, Eugen Ulmer, Stuttgart, Germany. 17-24.

Kellogg NJ. (1984). Cenozoic Tectonic History of the Sierra de Périja, Venezuela-Colombia, and Adjacent Basins. *Geological Society of America Memoir*, 162: 239-261.

Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.*, 16(2): 111-20.

Lima FCT, Caires RA. (2011). Peixes da Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins, bacias dos Rios Tocantins e São Francisco, com observações sobre as implicações biogeográficas das “águas emendadas” dos Rios Sapão e Galheiros. *Biota Neotrop.*, 11(1): 231-250.

Lima FCT, Ribeiro AC. (2011). Continental-Scale Tectonic Controls of Biogeography and Ecology. In: Albert JS, Reis RE, eds. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. Univ. of California Press, Berkeley, Los Angeles. 145-164.

Lovejoy NR, Albert JS, Crampton WGR. (2006). Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical fishes. *J South Am Earth Sci*, 21: 5–13.

Lundberg JG. (1998). The temporal context for diversification of Neotropical fishes. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena CAS, Lucena ZMS, eds. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edipurus, Porto Alegre, Brazil. 67-91.

Menezes NA, Ribeiro AC, Weitzman SH, Torres RA. (2008). Biogeography of Glandulocaudinae (Teleostei: Characiformes: Characidae) revisited: phylogenetic patterns, historical geology and genetic connectivity. *Zootaxa*, 1726: 33–48.

Montoya-Burgos JL (2003). Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus*

(Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Mol Ecol*, 12(7): 1855–1867.

Motta PJ, Norton SF, Luczkovich JJ. (1995). Perspectives on the ecomorphology of bony fishes. *Environ Biol Fishes*, 44: 11-20.

Nelson JS. (2006). Fishes of the world. 4th ed., John Wiley e Sons, Inc.

Ornelas-García CP, Domínguez-Domínguez O, Doadrio I. (2008). Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evol Biol*, 8: 340.

Oyakawa OT. (1993). Cinco espécies novas de *Harttia* Steindachner, 1876 da região sudeste do Brasil, e comentários sobre o gênero (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Comun. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS, Sér. Zool. Porto Alegre*, 6: 3-27.

Perez A, Taphorn D. (1993). Relaciones zoogeograficas entre las ictiofaunas de las cuencas del rio Magdalena y lago de Maracaibo. *Biollania*, 9: 95-105.

Peres-Neto PR. (1999). Alguns métodos e estudos em ecomorfologia de peixes de riacho. In: Caramaschi EP, Mazzoni R, Peres-Neto PR, eds. Ecologia de peixes de riachos. Série Oecologia Brasiliensis, vol. VI. Rio de Janeiro, PPGE-UFRJ. 209-236.

Posada D, Crandall KA. (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817–818.

Rapp Py-Daniel LH. (1997). Phylogeny of the neotropical armored catfishes of the subfamily Loricariinae (Siluriformes; Loricariidae). Ph.D. Thesis. The University of Arizona, 280pp.

Rapp Py-Daniel LH, Fernandes CC. (2005). Dimorfismo sexual em Siluriformes e Gymnotiformes (Ostariophysi) da Amazônia. *Acta Amazon*, 35(1): 97-110.

Rapp Py-Daniel LH, Fichberg I. (2008). A new species of *Rineloricaria* (Siluriformes: Loricariidae: Loricariinae) from rio Daraá, rio Negro basin, Amazon, Brazil. *Neotrop Ichthyol.*, 6(3): 339-346.

Regan CT. (1909). A monograph of the fishes of the family Loricariidae. *Trans. Zool. Soc. London*, 17: 191-350.

Reis RE, Kullander SO, Ferraris-Jr CJ. (2003). Check list of the freshwater fishes of South and Central. Porto Alegre: EDIPUCRS. 742 p.

Reis RE, Pereira EHL, Armbruster JW. (2006). Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. *Zool J Linn Soc.*, 147: 277–299.

Reis RE, Cardoso AR. (2001). Two new species of *Rineloricaria* from southern Santa Catarina and northeastern Rio Grande do Sul, Brasil (Teleostei: Loricariidae). *Ichthyol Explor Freshwaters*, 12(4): 319-332.

Ribeiro AC. (2006). Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotrop Ichthyol.*, 4: 225–246.

Rodriguez MS, Reis RE. (2008). Taxonomic Review of *Rineloricaria* (Loricardae: Loricariinae) from the Laguna dos Patos Drainage, Southern Brazil, with the Descriptions of two New Species and Recognition of Two Species Groups. *Copeia*, 2, 333-349.

Rodriguez MS, Miquelarena A. (2008). *Rineloricaria isaaci* (Loricariidae: Loricariinae), a new species of loricariid catfish from the Uruguay River basin. *J Fish Biol.*, 73: 1635–1647.

Rodriguez MS, Cramer CA, Bonatto SL, Reis RE. (2008). Taxonomy of *Ixinandria* Isbrücker & Nijssen (Loricariidae: Loricariinae) based on morphological and molecular data.

Neotrop Ichthyol., 6(3): 367-378.

Rodriguez MS, Ortega H, Covain R. (2011). Intergeneric phylogenetic relationships in catfishes of the Loricariinae (Siluriformes: Loricariidae), with the description of *Fonchiiloricaria nanodon*: a new genus and species from Peru. *J Fish Biol.*, 79(4): 875-895.

Ronquist F, Huelsenbeck JP. (2003): MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.

Rosa KO, Ziemniczak K, de Barros AV, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, Artoni RF, Vicari MR. (2011). Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. *Rev Fish Biol Fisheries.*, 22(3): 739-749.

Ross JLS. (1991). O contexto geotectônico e a morfogênese da província serrana de Mato Grosso. *Rev Inst Geo.*, 12(1-2): 21-37.

Schaefer SA. (2011). The Andes Riding the Tectonic Uplift. In: Albert JS, Reis RE, eds. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. Univ. of California Press, Berkeley, Los Angeles. 137–144.

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

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods *Mol. Biol. Evol.* 28(10):2731–2739

Torrico JP, Hubert N, Desmarais E, Duponchelle F, Nuñez Rodriguez J, Montoya-Burgos JI, Garcia Davila C, Carvajal-Vallejos FM, Grajales AA, Bonhomme F, Renno JF. (2009). Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): Biogeographic

and evolutionary implications. *Mol Phylogenet Evol.*, 51: 588–594.

Vera-Alcaraz H, Pavanelli CS, Zawadzki CH. (2012). Taxonomic revision of the *Rineloricaria* species (Siluriformes: Loricariidae) from the Paraguay River basin. *Neotrop Ichthyol.*, 10(2): 285-311.

Xia X, Xie Z. (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered.*, 92, 371-373.

Xia X, Xie Z, Salemi M, Chen L, Wang Y. (2003). An index of substitution saturation and its application. *Mol Phylogenet Evol.*, 26: 1-7.

Xia X, Lemey P. (2009). Assessing substitution saturation with DAMBE. In: Lemey P, Salemi M, Vandamme AM, eds. *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*. 2nd edition Cambridge University Press. 615-630.

Winemiller KO, Willis SC. (2011). In: Albert JS, Reis RE, eds. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. Univ. of California Press, Berkeley, Los Angeles. 225-242.