

Universidade Estadual Paulista – UNESP
Instituto de Biociências de Botucatu

Tatiane Casagrande Mariguela

Análise filogenética da subfamília Callichthyinae
(Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae) com base em
seqüências de DNA nuclear e mitocondrial

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

Orientador: Prof. Dr. Claudio de Oliveira

Botucatu – SP
2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Mariguela, Tatiane Casagrande.

Análise filogenética da subfamília *Callichthyinae* (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae) com base em sequências de DNA nuclear e mitocondrial / Tatiane Casagrande Mariguela. – 2006.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2006.

Orientadora: Claudio de Oliveira

Assunto CAPES: 20202008

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

CDD 574.192

Palavras-chave: DNA mitocondrial; DNA nuclear; Filogenia; Peixes; Sistemática molecular

“No princípio Deus criou o céu e a terra. A terra, porém, estava informe e vazia, e as trevas cobriam o Abismo, mas o espírito de Deus pairava por sobre as águas. Disse Deus: “Haja luz”. E houve luz. Viu Deus que a luz era boa; e Deus separou a luz das trevas. Deus chamou a luz de “dia”, e as trevas, “noite”. Houve tarde e houve manhã: um primeiro dia.

Disse Deus: “Haja um firmamento no meio das águas, para separar umas das outras”. E assim se fez. Deus fez o firmamento que separou as águas que estão debaixo do firmamento daquelas que estão por cima do firmamento. E assim se fez. Deus chamou o firmamento “céu”. Houve tarde e houve manhã: um segundo dia.

Disse Deus: “Juntem-se num só lugar as águas que estão debaixo do céu, e apareça o elemento seco”. E assim se fez. Deus chamou o elemento seco “terra”, e o ajuntamento das águas chamou “mares”. E Deus viu que isso era bom.

Disse Deus: “Verdeje a terra com o que é verdejante, ervas que produzam sementes e árvores frutíferas que dêem suas espécies de frutos nos quais está contida a semente, por sobre a terra”. E assim se fez. A terra produziu o que é verdejante, ervas que contêm semente conforme sua espécie e árvores frutíferas com suas espécies de frutos nos quais está contida a semente. E Deus viu que isso era bom. Houve tarde e houve manhã: um terceiro dia.

Deus disse: “Haja luzeiros no firmamento dos céus para separar o dia da noite. Sirvam eles de sinais para as estações, os dias e os anos. Sejam eles no firmamento dos céus os luzeiros que iluminem a terra”. E assim se fez. Deus fez os dois grandes luzeiros: o luzeiro maior, para dominar o dia, e o luzeiro menor, para dominar a noite, e as estrelas. Deus os colocou no firmamento do céu para iluminar a terra, para que presidissem ao dia e à noite e para que separassem a luz das trevas. E Deus viu que assim era bom. E houve tarde e manhã: um quarto dia.

Deus disse: “Pululem as águas de seres animados e voem as aves por sobre a terra, debaixo do firmamento do céu”. E assim foi feito. Deus criou os grandes monstros do mar e todos os seres animados que deslizam pelas águas, de cujas diferentes espécies pululam as águas, como também todas as espécies de seres alados. E Deus viu que assim era bom. Deus os abençoou dizendo: “Sede fecundos e multiplicai-vos, enchei as águas do mar; multipliquem-se também as aves sobre a terra”. Houve tarde e manhã: um quinto dia.

Disse também Deus: “Produza a terra seres vivos de diferentes espécies: animais domésticos, animais rasteiros e animais selvagens de diferentes espécies”. E assim foi feito. E Deus fez as diferentes espécies de animais selvagens, de animais domésticos e de animais rasteiros da terra. E Deus viu que assim era bom.”

Gênese - A origem do mundo

Agradecimentos

*P*rimейramente, agradeço a Deus, por tudo... sem Ele nada disso teria acontecido. Principalmente pelo material do meu trabalho!

A minha família... não consigo dizer com palavras, está tudo guardado no meu coração...

*A*o Prof. Dr. Claudio de Oliveira por ter me demonstrado confiança em todos os momentos... pela sua orientação, incentivo e conhecimentos transmitidos. Sem ele, nada desse trabalho estaria concluído.

*A*os professores Drs. Fausto Foresti e César Martins pelo exemplo como pesquisadores, pela dedicação ao laboratório e pela amizade.

*A*os colegas do laboratório: Andréia Alves, Alex, Carlos, Claudinha, Cristiane, Daniela, Danillo, Eloísa, Fernanda, Fernando (Konrado), Gleisy, Heraldo, Lessandra, Lígia, Luciana, Luís, Márcio, Marina, Marisa, Natália, Patrícia Elda, Ricardo Paiva, Rita, Zeca, pelo incentivo e momentos de descontração, principalmente aos sábados, domingos e feriados!

*E*m especial, a Andréia Poletto (Pol) que me ajudou psicologicamente em muitos momentos... sem ela, eu não estaria mais aqui! E a Irani, por ter agüentado todo o meu stress em casa.

*U*m muito mais que especial a minha amiga Karina Morelli, que me trouxe até o laboratório e desde o primeiro dia demonstrou amizade... até o fim me ajudou em vários os momentos... que bom que você faz parte deste laboratório! Muito obrigada! Agora eu acredito que ainda exista amizade sem interesse...

*A*os meus queridos e verdadeiros amigos que conquistei na graduação: Adriano, Alininha, André Castro, André (Xexéu), Ângela, Daniele, Juliana, Karina, Marco, Ana Paula e Tatiana pelas lembranças e apoio que ainda tenho de todos. Não esqueço de vocês um só dia!

A Patrícia, que me agüentou muito durante anos... nesse momento tenho a oportunidade de agradecer por tudo!

A Aline, Érika, Flávia e Glaura, que fizeram parte da minha vida aqui, me lembrando todos os dias que amigos que conhecemos na graduação podem nos acompanhar sempre...

*A*o Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP (Botucatu), pelas condições que possibilitaram a realização deste trabalho.

A FAPESP e ao CNPq pelas bolsas concedidas.

E ao meu “Cachorro” labrador por existir! Pena eu não poder estar com ele todos os dias...

Dedicatória

Aos meus pais que me apoiaram e me apóiam sempre...

Aos meus irmãos, Viviane e Rafael, por fazerem parte da minha vida e pelas brincadeiras que tivemos que não esquecerei jamais...

Aos animais que existem hoje e existiram na Terra um dia... vivo todos os meus dias para poder devolver o lugar que é deles por direito... sei que um dia o terão de volta...

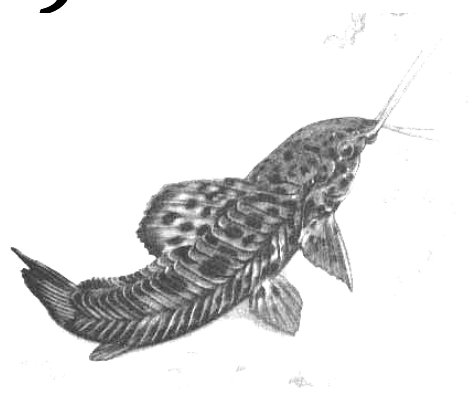
Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A Ordem Siluriformes	2
1.2. A Família Callichthyidae	4
1.3. Estudos Moleculares e Filogenia	5
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Materiais	14
3.2. Métodos	16
3.2.1. Isolamento de DNA genômico, amplificação e seqüenciamento	16
3.2.1.1. Extração de DNA com Fenol	16
3.2.1.2. Extração de DNA com Tampão de Extração	17
3.2.2. Amplificação e Seqüenciamento	18
3.2.3. Alinhamento das seqüências e análises filogenéticas	21
4. RESULTADOS	23
4.1. Análise das seqüências dos genes	23
4.1.1. Gene 12S rRNA	23
4.1.2. Análise das seqüências do gene nuclear Siah	30
4.1.3. Análise das seqüências combinadas dos genes 12S mitocondrial e Siah nuclear	35
4.1.4. Análise das seqüências consenso dos gêneros para os genes 12S mitocondrial e Siah nuclear analisados em conjunto	40
4.1.5. Análise das seqüências combinadas dos genes mitocondriais 12S, 16S e ND4	43
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

Resumo

A família Callichthyidae apresenta cerca de 177 espécies distribuídas na região Neotropical e está dividida em duas subfamílias: Callichthyinae e Corydoradinae. Os peixes dessa família apresentam uma notável radiação evolutiva associada a muitos eventos de rearranjos cromossômicos, inclusive com exemplos de poliploidia. A subfamília Callichthyinae compreende os gêneros *Callichthys*, *Dianema*, *Hoplosternum*, *Megalechis* e *Lepthoplosternum*. As relações entre os cinco gêneros representantes de Callichthyinae foram estudadas com base em caracteres morfológicos e moleculares e, atualmente, duas hipóteses bastante conflitantes são disponíveis sobre suas relações. Com o objetivo de testar as hipóteses sobre as relações entre os gêneros e espécies da subfamília Callichthyinae e propor uma nova hipótese de consenso para o grupo, foram seqüenciados os genes mitocondriais 12S rRNA, 16S rRNA e ND4 e o gene nuclear Siah. Ainda que as diferentes filogenias obtidas pelos métodos de Neighbor-Joining, Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança não tenham sido todas congruentes, foi confirmada a posição basal de *Dianema* em relação aos demais da subfamília discordando dos dados morfológicos existentes. Os dados sugerem uma possível relação mais estreita de parentesco entre *Dianema* e *Hoplosternum*. Exemplares de *Hoplosternum* encontrados na Venezuela diferem das amostras encontradas no Brasil, indicando a possível existência de novas espécies nesse gênero. A espécie *Megalechis picta* encontrada na Venezuela difere dos demais exemplares encontrados no Brasil, podendo sugerir a ocorrência de uma nova espécie na bacia do rio Orinoco. As espécies *Megalechis picta* e *Lepthoplosternum pectorale* formam um grupo monofilético e este é grupo irmão da espécie *M. thoracata*. Nas espécies do gênero *Lepthoplosternum*, *L. tordilho* é basal em relação às outras espécies de *Lepthoplosternum* e *Megalechis*; contudo esses gêneros devem ser testados com dados adicionais. Novas análises, com um número maior de espécies e também com genes com diferentes taxas de evolução, deverão ser realizadas a fim de esclarecer as relações ainda não resolvidas nesta subfamília.

Introdução



1. INTRODUÇÃO

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

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

A ictiofauna Neotropical de água-doce é bastante rica, incluindo, 71 famílias e 4.475 espécies reconhecidamente válidas, segundo o mais recente levantamento (Reis *et al.*, 2003). Além disso, uma estimativa feita por estes autores sugeriu a existência de 6.000 espécies nos rios e lagos da região Neotropical, sendo que a estimativa disponível sobre a quantidade de peixes de água doce para todo o planeta é da ordem de 13.000 espécies. Schaefer (1998), calculou, em um levantamento das tendências históricas de descrição de espécies em Characidae e Loricariidae, que podiam existir aproximadamente 8.000 espécies de peixes de água doce neotropicais o que corresponderia a 25% de todas as espécies de peixes do mundo. Este número foi discutido e aceito por Vari e Malabarba (1998) que acrescentam que toda essa diversidade de peixes de água doce neotropicais ocorre em menos de 0,003% da água doce do planeta.

A Superordem Ostariophysi é um dos maiores grupos de teleostei incluindo cerca de 25% das espécies de teleósteos e 75% da ictiofauna de água doce mundial (Fink e Fink, 1981). Espécies desse grupo estão distribuídas atualmente em cinco ordens, com um total de 63 famílias, cerca de 1.000 gêneros e 6.500 espécies (Nelson, 1994). Os Ostariophysi compreendem duas séries: Anotophysii, constituída pelos Gonorynchiformes, e Otophysi constituída pelos Cypriniformes, Characiformes, Gymnotiformes e Siluriformes (Fink e Fink, 1996). Fink e Fink (1996) propõem a seguinte classificação para os Otophysi: Cypriniphysi, que inclui a ordem Cypriniformes, Characiphysi, incluindo os Characiformes, e Siluriphysi, que inclui duas ordens, Gymnotiformes e Siluriformes.

1.1 A Ordem Siluriformes

Entre os Ostariophysi, Siluriformes é a ordem mais diversificada e amplamente distribuída, o que é refletido em sua complexidade taxonômica, atualmente incluindo cerca de 37 famílias, 416 gêneros e mais de 2.500 espécies (Teugels, 1996; de Pinna, 1998; Diogo, 2003). O número de espécies de Siluriformes neotropicais conhecidas é de 1.648 espécies, divididas em 15 famílias (Reis *et al.*, 2003). Estes números ainda devem ser significativamente incrementados devido à contínua descoberta de novos táxons e um melhor conhecimento das relações filogenéticas entre os grupos.

Representantes de Siluriformes podem ser encontrados em todos os ambientes de água doce do mundo, inclusive no Antártico. Concentram-se principalmente nas regiões tropicais e neotropicais: na América do Sul, África, sul e sudeste da Ásia (Burgess, 1989; Teugels, 1996; Ferraris, 1998; de Pinna, 1998; Arratia *et al.*, 2003). Desta forma, sua distribuição parece ser limitada pela temperatura, uma vez que a maioria das espécies habita tanto regiões tropicais quanto neotropicais e, poucas são as espécies que alcançam o extremo sul da América do Sul ou o extremo norte da América do Norte (Nelson, 1994). Embora a grande maioria dos peixes desta ordem seja encontrada em ambientes de água doce, duas famílias, Ariidae e Plotosidae possuem uma representação significativa de espécies primariamente marinhas (Burgess, 1989; de Pinna, 1998). Além disso, as famílias Pangasiidae, Aspredinidae e Auchenipteridae incluem algumas espécies estuarinas, que podem ainda, apresentar certa tolerância a ambientes marinhos (de Pinna, 1998).

A enorme diversidade ecológica e evolutiva observada nesta ordem a faz foco de muitos estudos (Burgess, 1989; Fink e Fink, 1981, 1996; de Pinna, 1998; Arratia *et al.*, 2003; Britto, 2003). Embora sua diversidade e distribuição atraiam um grande interesse, esses dois fatores provavelmente respondem pelo pequeno número de estudos sobre as relações entre os grandes grupos de Siluriformes (Britto, 2003). Segundo Diogo (2003) muitos dos estudos pré-cladísticos sobre os relacionamentos entre os Siluriformes são confusos e questionáveis, com propostas de agrupamentos dos taxa tendo por base caracteres plesiomórficos e altamente homoplásticos ou simplesmente não embasadas. Entretanto, o autor ressalta que tais trabalhos não devem ser ignorados.

Entre os Siluriformes da região Neotropical, a superfamília Loricarioidea representa o grupo natural mais numeroso e amplamente distribuído, sendo composta por seis famílias: Nematogenyidae (1 espécie), Trichomycteridae (171 espécies), Callichthyidae (177 espécies), Scoloplacidae (4 espécies), Astroblepidae (54 espécies) e Loricariidae (673 espécies) (de

Pinna, 1998; Reis *et al.*, 2003). Dentro desse grupo estão os três maiores gêneros de Siluriformes: *Hypostomus*, *Corydoras* e *Trichomycterus*, além de um grande número de espécies de interesse econômico, principalmente como espécies ornamentais.

As hipóteses de relacionamento entre as famílias constituintes de Loricarioidea proposta por de Pinna (1998) e Britto (2003) mostram que as famílias Callichthyidae, Scoloplacidae, Astroblepidae e Loricariidae divergem de Nematogenyidae e Trichomycteridae, com a formação de dois grupos, um com Nematogenyidae como grupo-irmão de Trichomycteridae e outro grupo os demais membros da superfamília, tendo Loricariidae e Astroblepidae como grupos-irmãos. Várias transformações de caracteres são conhecidas para os diferentes clados de Loricarioidea, como pode ser observado na Figura 1. Por outro lado, as filogenias apresentadas em de Pinna (1998) revelam que são relativamente poucas as hipóteses de relacionamento dentro das famílias de Loricarioidea.

1.2 A Família Callichthyidae

Segundo Gosline (1940), a família Callichthyidae era constituída por 44 espécies, divididas em oito gêneros: *Aspidoras*, *Brochis*, *Callichthys*, *Cascadura*, *Cataphractops*, *Corydoras*, *Dianema* e *Hoplosternum*. Hoedeman (1952) dividiu a família Callichthyidae nas subfamílias Corydoradinae (*Aspidoras*, *Brochis* e *Corydoras*) e Callichthyinae (demais gêneros).

Reis (1997) realizou algumas modificações na organização genérica da família Callichthyidae, sendo descritos dois novos gêneros, *Megalechis* e *Lepthoplosternum*. Neste último gênero, foram incluídas as espécies conhecidas como *Hoplosternum pectorale*, além de três novas espécies de *Lepthoplosternum*: *L. altamazonicum*, *L. beni* e *L. tordilho*. Recentemente foram incluídas mais duas espécies nesse gênero: *Lepthoplosternum stellatum* e *Lepthoplosternum ucamara* (Reis e Kaefer, 2005). *Megalechis*, por sua vez, passou a compreender as espécies conhecidas como *Hoplosternum thoracatum* e *Callichthys personatus* em Reis (1997), mas em Reis *et al.* (2005) houve uma mudança nessa classificação e a espécie antes conhecida como *Megalechis personata* passou a ser chamada de *M. thoracata* e a espécie conhecida como *Megalechis thoracata* é agora nomeada *Megalechis picta*. Reis (1997) considerou os gêneros *Cascadura* e *Cataphractops* como sinônimos de *Hoplosternum*.

A família Callichthyidae é dividida em duas subfamílias: Callichthyinae (gêneros *Callichthys*, *Dianema*, *Hoplosternum*, *Megalechis* e *Lepthoplosternum*) e Corydoradinae (gêneros *Aspidoras*, *Brochis* e *Corydoras*) (Hoedeman, 1952; Reis, 1998). Das 177 espécies válidas descritas para a família Callichthyidae, o gênero *Corydoras* representa cerca de 80% da diversidade da família (cerca de 143 spp.), o que o torna o gênero mais especioso também dentro da ordem Siluriformes (Reis, 2003).

Os Callichthyidae encontram-se distribuídos em praticamente todas as grandes drenagens da América do Sul, desde o norte da Argentina até à bacia do Rio Orinoco e também na Colômbia e Panamá (Reis, 2003). São peixes relativamente pequenos e facilmente reconhecidos pela presença de duas séries de placas ósseas longitudinais revestindo o corpo (de Pinna, 1998). Os Callichthyidae apresentam respiração aérea acessória, sendo capazes de captar o ar na superfície da água, engoli-lo e passá-lo para uma região especial no intestino, que corresponde ao órgão respiratório acessório e esse ar pode eventualmente ser expelido pelo ânus (de Pinna, 1998; Reis, 2003).

As relações filogenéticas entre os gêneros da família Callichthyidae foram recentemente estudadas por Reis (1998), que propôs o cladograma apresentado na Figura 2, no qual a família é composta por duas subfamílias: Callichthyinae e Corydoradinae, como previamente sugerido por Hoedeman (1952). Reis (1998) demonstrou ainda que todos os gêneros, com exceção de *Corydoras* eram monofiléticos.

1.3 Estudos Moleculares e Filogenia

O estudo das relações entre organismos tem recebido, nos últimos anos, um considerável impulso com o advento das técnicas de PCR (*polimerase chain reaction*) e de seqüenciamento de DNA. Vários grupos de pesquisa têm voltado sua atenção para o uso de seqüências de DNA para elucidação das relações filogenéticas entre grupos de organismos. Assim, por exemplo, no conjunto de trabalhos publicados no livro editado por Kocher e Stephien (1997) pode-se observar o amplo e versátil emprego das análises moleculares na elaboração de hipóteses de relacionamento em diversos níveis taxonômicos variando de populações locais até grandes grupos de peixes. Ainda que até o momento o número de estudos de seqüências de DNA realizados com peixes seja bastante pequeno em relação à extensão do grupo, os resultados já obtidos são promissores (Stock et al., 1991; Kocher e Stephien, 1997; Murphy et al. 1999; Inoue et al., 2001; Miya et al., 2003).

O genoma animal está distribuído em dois compartimentos celulares: o núcleo e as mitocôndrias. O genoma nuclear apresenta uma extrema complexidade organizacional e um tamanho da ordem de bilhões de pares de bases nitrogenadas enquanto o genoma mitocondrial apresenta alguns poucos genes codificados por menos de vinte mil pares de bases, por esse motivo, entre os genes mais comumente seqüenciados estão os genes mitocondriais. O tamanho do genoma mitocondrial (mtDNA) é bastante variável, apresentando valores em torno de 16 quilobases (kb) nos vertebrados até 570 kb em algumas espécies de plantas (Lewin, 1994). Estudos extensivos realizados com o genoma mitocondrial de peixes mostraram que o mesmo é constituído por cerca de 17.000 pares de base, sendo que nesse genoma encontram-se os genes 12S e 16S do rRNA, 22 genes de tRNA, as subunidades I, II e III do citocromo *c*, a subunidade 6 da ATPase, o citocromo *b* e genes para seis subunidades da NADH (Miya et al., 2003). Os únicos casos em que o genoma mitocondrial apresentou uma ordem diferente da usual para os peixes, foram observados entre representantes de algumas famílias de Anguilliformes (Inoue et al., 2001).

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

O número de estudos publicados que usam genes nucleares em estudos filogenéticos ainda é pequeno em relação ao número daqueles que utilizam genes mitocondriais. Contudo, diversos trabalhos foram publicados nos últimos anos mostrando a utilidade desses genes em estudos de diversos grupos de vertebrados como entre os peixes (Ortí e Meyer, 1996; Ortí, 1997; Lovejoy e Collete, 2001; Lavoué et al., 2003; Near et al., 2004; Holcroft, 2005; Calcagnotto et al., 2005), anfíbios (San Mauro et al., 2004), répteis (Slowinski e Lawson, 2002; Spinks et al., 2004), aves (Chubb, 2004; Griffiths et al., 2004; Cibois e Cracraft, 2004) e mamíferos (Misawa e Janke, 2003; Teeling et al., 2003; Delsuc et al., 2003; Steiner et al., 2005). No estudo de Lavoué et al. (2003), uma filogenia para os peixes elétricos da superfamília Mormyroidea foi construída com base em dados dos genes nucleares Rag2 e S7 e dos genes mitocondriais citocromo *b*, 12S e 16S rRNA. Os resultados obtidos foram

bastante resolutivos na determinação dos padrões de relacionamento dentro da superfamília e foram bastante úteis na interpretação da evolução do sistema de eletrócitos nesses animais. Os autores concluem que os genes utilizados por eles podem ser bastante úteis em estudos sistemáticos ao nível de subfamília em peixes teleósteos.

A possibilidade de utilização de seqüências de DNA para construção de filogenias torna possível não só uma melhor interpretação da história evolutiva das espécies em si, como também permite a análise simultânea dos padrões evolutivos seguidos por outros caracteres, que por sua vez apresentam menor possibilidade de interpretação filogenética. Um exemplo desse tipo de utilização de dados de DNA está no trabalho de Alves-Gomes et al. (1995), onde a filogenia dos peixes da ordem Gymnotiformes foi reconstruída, tendo como base dados de mtDNA (parte das subunidades 12S e 16S do rRNA), assim como dados de morfologia e eletrofisiologia. No trabalho citado, os dados moleculares serviram para elaboração de uma nova hipótese filogenética, que se mostrou mais congruente com a possível evolução morfológica e fisiológica dos peixes desse grupo, permitindo inclusive aos autores a proposição da criação de uma nova família para essa ordem. Murphy e Collier (1997) apresentaram uma filogenia, com base em fragmentos do citocromo *b*, e dos genes para 12S rRNA e 16S rRNA, para as famílias Aplocheiloidei (África) e Rivulidae (América do Sul), que compreende várias espécies conhecidas como “peixes anuais”. A distribuição de espécies anuais nessa filogenia sugere que o anualismo surgiu no início da diferenciação desse grupo e parece ter sido perdido várias vezes nos gêneros que atualmente habitam ambientes aquáticos permanentes (Murphy e Collier, 1997).

A elaboração de filogenias moleculares permite também testar hipóteses de relacionamento construídas com base em outros caracteres como os caracteres morfológicos. Assim, por exemplo, com base em dados de DNA (parte da seqüência do citocromo *b*), uma filogenia molecular foi elaborada para os peixes do gênero *Gambusia* (Lydeard et al., 1995). A comparação dessa filogenia com outra baseada em dados morfológicos mostrou que elas eram incongruentes, o que levou os autores a propor uma terceira filogenia abrangendo os dados morfológicos e moleculares. Por outro lado, a comparação da filogenia resultante com filogenias elaboradas para dois outros gêneros de peixes, que apresentam praticamente os mesmos padrões de distribuição geográfica, permitiu identificar várias incongruências quanto aos cladogramas de área obtidos. Assim, os autores concluíram que há a necessidade de construção de várias hipóteses filogenéticas, baseadas em diferentes conjuntos de caracteres, antes de se procurar interpretar a história evolutiva de um táxon ou de uma região.

Recentemente as relações entre os gêneros da família Callichthyidae foram estudadas por Shimabukuro-Dias *et al.* (2004), utilizando seqüências de DNA mitocondrial (seqüências parciais dos genes 12S rRNA, 16S rRNA, ND4 e tRNA^{Ser} e a seqüência completa do gene tRNA^{His}), num total de aproximadamente 1.600 pares de base para 28 espécies. As filogenias obtidas confirmaram o monofiletismo da família Callichthyidae e das subfamílias Callichthyinae e Corydoradinae (Figura 3). Por outro lado, as relações entre os gêneros constituintes de cada subfamília foram bastante diferentes daquelas apresentadas por Reis (1998). Particularmente para a subfamília Callichthyinae, os estudos moleculares sugeriram um padrão de relação bastante diferente entre os gêneros (com alto suporte estatístico). Assim, o gênero *Callichthys* que era considerado o mais primitivo para a subfamília (Gosline, 1940; Hoedeman, 1952; Ribeiro, 1959; Reis, 1998), aparece como grupo irmão de *Leptoplosternum* e *Megalechis*. Já o gênero *Dianema*, que na hipótese apresentada por Reis (1998) apareceu como um dos gêneros mais derivados foi identificado como o grupo mais primitivo nas análises moleculares. O estudo conjunto de dados morfológicos e moleculares, pesando-os igualmente, não alterou significativamente a filogenia obtida apenas com dados moleculares; por outro lado uma filogenia similar à proposta por Reis (1998) foi obtida somente quando os dados morfológicos receberam pesos 10 vezes superiores aos dados moleculares (Shimabukuro *et al.*, 2004).

Considerando que a filogenia molecular da subfamília Callichthyinae é bastante divergente da filogenia obtida com dados morfológicos, a obtenção de novos dados moleculares, incluindo seqüências de genes nucleares e mitocondriais, pode ser de grande valia para um melhor entendimento das relações entre os representantes dessa subfamília, assim como para um melhor entendimento dos mecanismos de evolução dos genes mitocondriais e nucleares.

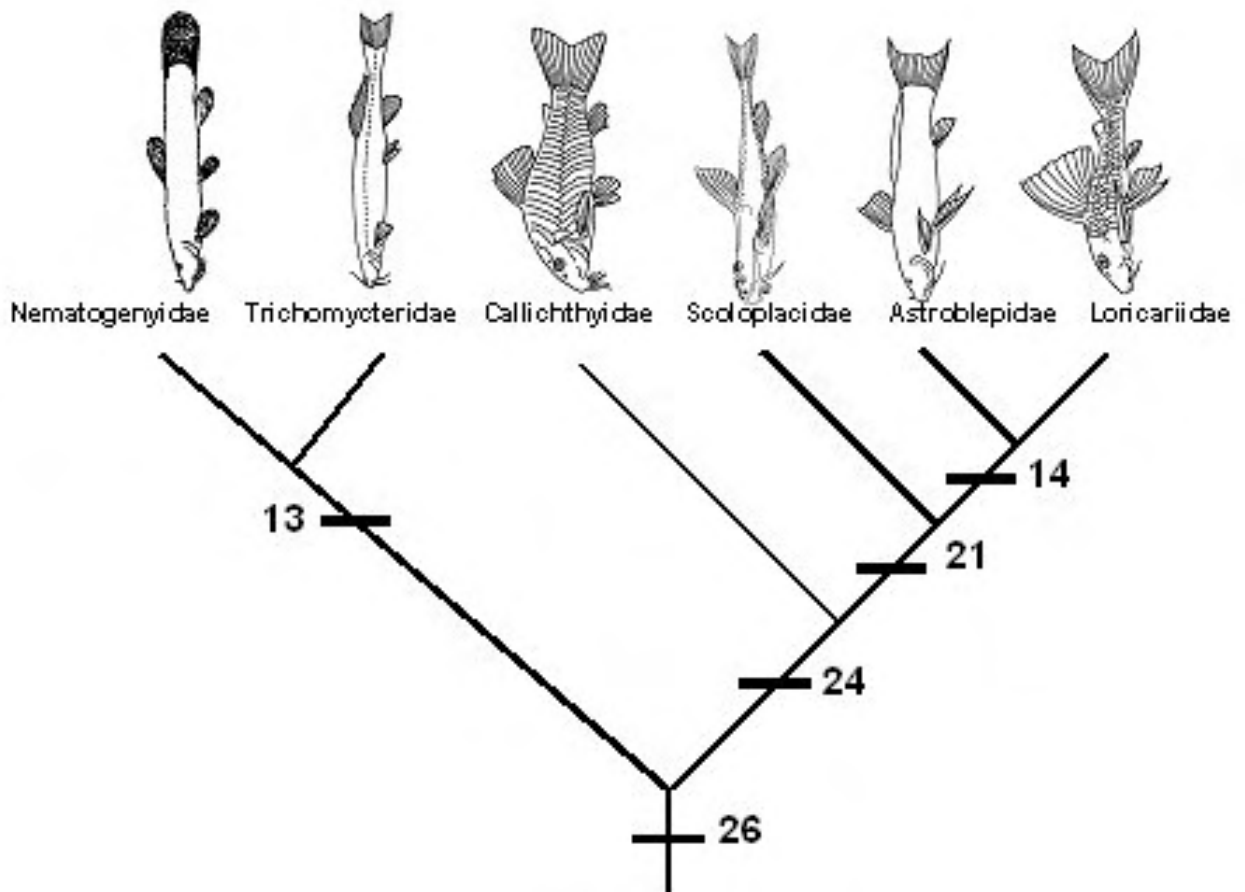


Figura 1. Cladograma mostrando as relações entre as famílias de Loricarioidea. Os retângulos pretos mostram o número de transformações de caracteres suportando cada ramo, segundo Britto (2003).

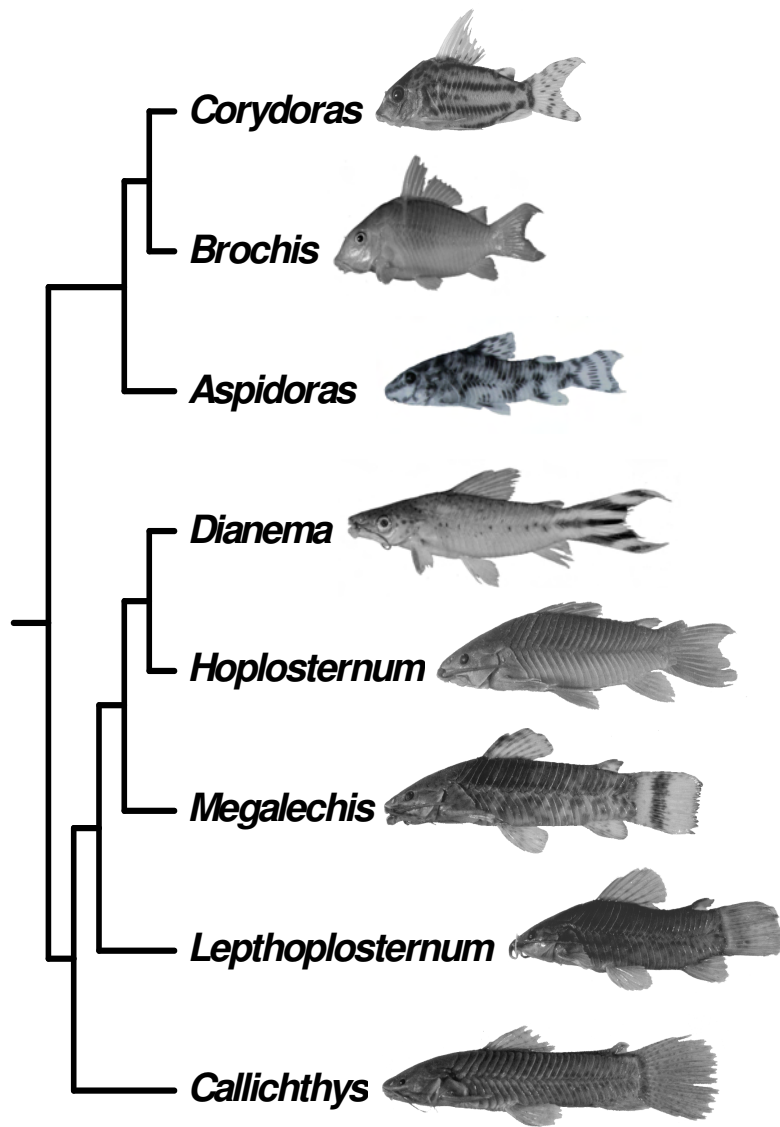


Figura 2. Relações filogenéticas entre os gêneros de Callichthyidae segundo Reis (1998).

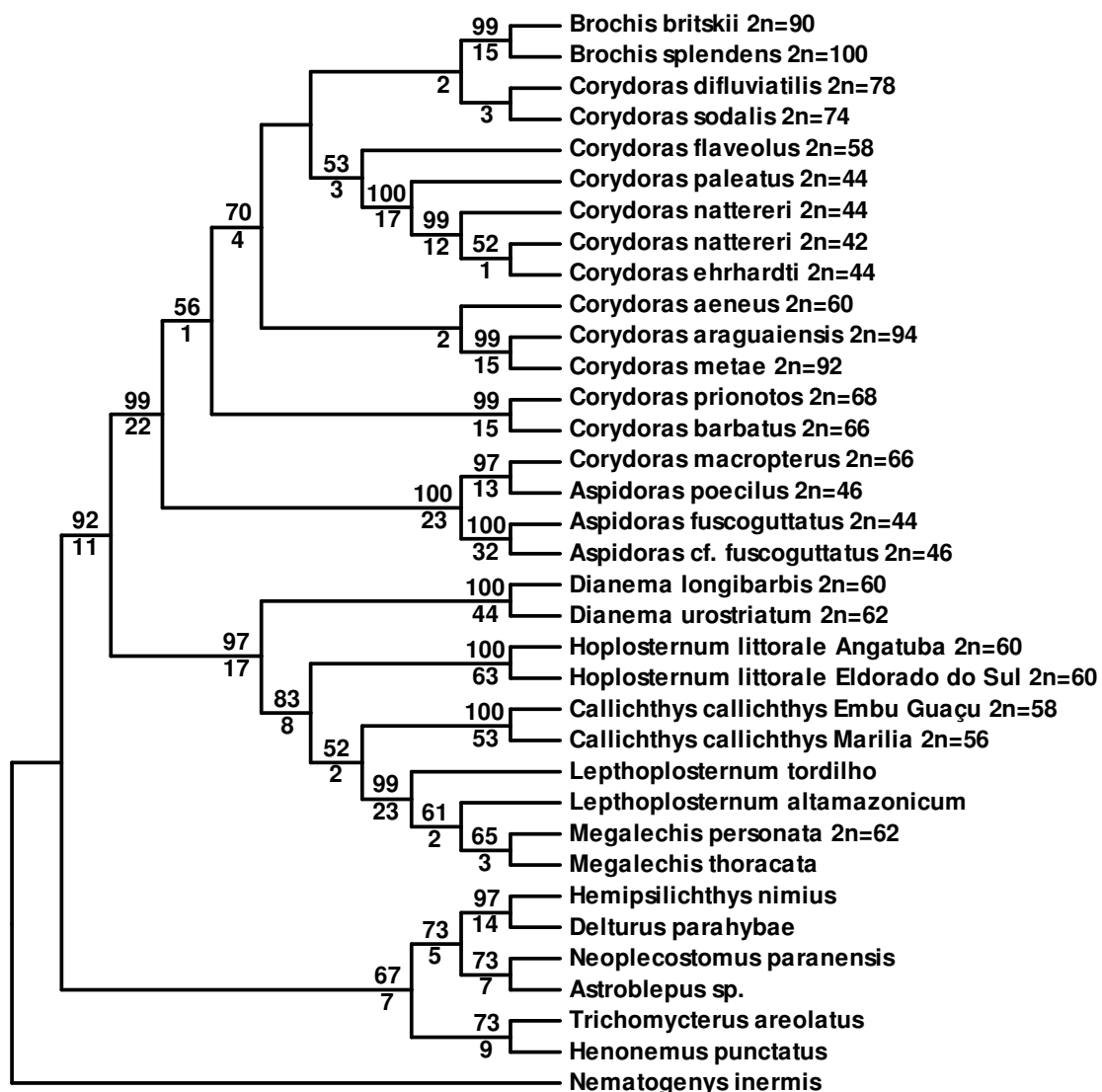


Figura 3. Árvore de consenso para a família Callichthyidae apresentada por Shimabukuro-Dias et al. (2004). A árvore foi produzida com o método de Máxima Parcimônia, considerando os *gaps* com dados ausentes e uma proporção entre transições e transversões de 1:1 (TL = 2984, CI = 0.3934, HI = 0.6066, RI = 0.5653). Os números acima dos ramos são valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas. Valores inferiores a 50% não foram mostrados. Os números abaixo dos ramos representam os valores do índice de Bremer.

Objetivos



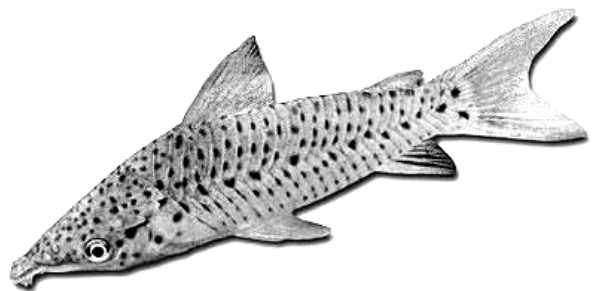
2. OBJETIVOS

O presente projeto está inserido em um amplo estudo das relações dentro e entre os membros da superfamília Loricarioidea. Como objetivos específicos do presente projeto tivemos:

- 1- Seqüenciar segmentos do genoma mitocondrial e nuclear de exemplares de todos os gêneros de Callichthyinae e de grupos externos significativos (principalmente das famílias Trichomycteridae e Nematogenyidae).
- 2- Obter dados para elaborar e testar hipóteses de relacionamento entre espécies e gêneros dessa subfamília.

Materiais e

Métodos



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

As coletas dos exemplares da subfamília Callichthyinae foram realizadas em diversas localidades do país e também em uma localidade na Venezuela. Os exemplares foram capturados em lagoas e rios ou adquiridos em lojas de peixes ornamentais, no caso do gênero *Dianema*.

As espécies *Copionodon pecten* (Trichomycteridae) e *Nematogenys inermis* (Nematogenyidae) foram utilizados como grupo externo.

Os peixes foram identificados e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia de Peixes (LBP), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

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

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

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

Gênero/Espécie	Número de Catálogo (LBP)	Localidade	Latitude/Longitude
	557	Rio Purus/AM	-
<i>Dianema longibarbis</i>			
	558	Rio PurusAM	-
<i>Dianema urostriatum</i>			
	569	Afluente do Rio Guaíba Eldorado do Sul/RS	S 30°02,820' W 51°22,347
<i>Hoplosternum littorale</i>			
	466	Represa de Jurumirim Rio Paranapanema - Itatinga/SP	S 19°34,630' W 57°01,123'
<i>Hoplosternum littorale</i>			
	2183	Laguna de Castelleros, Rio Orinoco Caicara del Orinoco/Bolívar/Venezuela	N 07°30'50,9'' W 66°09'19,8''
<i>Hoplosternum littorale</i>			
	2374	Lagoa Feia, Rio Paraíba do Sul Campos dos Goytacazes/RJ	S 22°00' W 41°20'
<i>Hoplosternum littorale</i>			
	238	Igarapé do Almoço Rio Branco/AC	S 10°02' W 67°52'
<i>Hoplosternum littorale</i>			
	2201	Laguna de Castelleros, Rio Orinoco Caicara del Orinoco/Bolívar/Venezuela	N 07°30'50,9'' W 66°09'19,8''
<i>Megalechis picta</i>			
	526	Alto Rio Negro, AM	-
<i>Megalechis picta</i>			
	552	Rio Purus, AM	-
<i>Megalechis picta</i>			
	239	Igarapé do Almoço Rio Branco/AC	S 10°02' W 67°52'
<i>Megalechis thoracata</i>			
	3214	Lagoa Temporária do Rio Itiquira Itiquira/MT	S 17°28'13" W 55°14'46,7"
<i>Megalechis thoracata</i>			
	2843	Córrego da Batata, Colômbia/SP	S 20°14'10,2" W 48°40'42,0"
<i>Megalechis thoracata</i>			
	593	Rio Platina de Baixo/Rio Miranda Corumbá/MS	-
<i>Callichthys callichthys</i>			
<i>Callichthys callichthys</i>	622	Ribeirão do Convento Pindamonhangaba/SP	S 22°47' W 45°27'
<i>Callichthys callichthys</i>	2577	Afluente do Rio Aduelas – Macaé/RJ	S 22°14'7,0" W 41°51'44,6"
<i>Callichthys callichthys</i>			
<i>Callichthys callichthys</i>	848	Embu Guaçu, SP	S 23°55,594' W 46°53,336'
<i>Callichthys callichthys</i>	683	Região de Rombado/Rio Pirai Poconé/MT	S 16°25,680' W 56°25,143'
<i>Callichthys callichthys</i>	1008	Represa de Jurumirim Rio Paranapanema - Itatinga/SP	S 23°20' W 48°34'
<i>Callichthys callichthys</i>	1030	Riacho na estrada para Salesópolis/Bacia do Rio Paraíba do Sul – Santa Branca/SP	S 23°25,386' W 45°52,989'
<i>Callichthys callichthys</i>	1208	Afluente do Igarapé do Mindu/Rio Negro – Manaus/AM	S 03°04' W 59°59'
<i>Callichthys callichthys</i>	2364	Rio São Pedro – Glicério/RJ	S 22°13'45,0" W 42°07'38,0"
<i>Callichthys callichthys</i>			
	1554	Lagoa Temporária do Rio Itiquira Itiquira/MT	S 17°28'13" W 55°14'46,7"
<i>Megalechis thoracata</i>			
	2844	Córrego da Batata, Colômbia/SP	S 20°14'10,2" W 48°40'42,0"
<i>Lepthoplosternum pectorale</i>			
	1554	Lagoa Temporária do Rio Itiquira Itiquira/MT	S 17°28'13" W 55°14'46,7"
<i>Lepthoplosternum pectorale</i>			
	1002	Águas de la Gloria – Concepción/Chile	S 36°50,304' W 72°55,642'
<i>Nematogenys inermis</i>			
	1963	Rio Piabas, Mucugê, BA	S 12°57'02,2" W 41°16'37,1"
<i>Copionodon pecten</i>			

3.2. Métodos

3.2.1. Isolamento de DNA genômico, amplificação e seqüenciamento

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

3.2.1.1. Extração de DNA com Fenol

Foi utilizada uma técnica baseada em Sambrook e Russel (2001) que consiste em:

1. Fragmentar o tecido em cadinho de porcelana com macerador em nitrogênio líquido;
2. Adicionar 500µL de solução de digestão (80,0µl de NaCl 5M, 20,0µl de Tris HCl 2M, 200,0µl EDTA 0,5M, 200,0µl de SDS 10%, 40,0µl de Proteinase K (10mg/ml) e 3420,0µl de água ultrapura) e incubar a 50°C por 4 horas;
3. Lavar com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) pH=8,0, dobrando o volume;
4. Homogeneizar por 15 minutos;
5. Centrifugar por 15 minutos a 14000 rpm.
6. Quando necessário, para uma maior pureza, repetir os dois itens anteriores;
7. Retirar o sobrenadante e transferir para um outro tubo limpo;
8. Precipitar com 1/10 do volume de NaCl 5M mais dois volumes de etanol 100% (gelado);
9. Centrifugar por 30 minutos a 14000 rpm e descartar o sobrenadante;
10. Adicionar 1000µl de etanol 70% (gelado) e centrifugar por 15 minutos a 14000 rpm;
11. Descartar o sobrenadante;
12. Deixar secar a 37°C “overnight”;
13. Eluir em 300µl de TE;
14. Adicionar 1,5µl de RNase (10mg/ml) em cada amostra e incubar a 37°C por uma hora, seguido de uma nova incubação a 65°C durante 10 minutos.

As amostras são preservadas em tampão TE até a amplificação.

3.2.1.2. Extração de DNA com Tampão de Extração

Tampão de extração – 1 Litro – Conservar em geladeira.

30mM Tris-HCl

10mM EDTA

1% SDS

1. Colocar, em um tubo de 1,5ml, 290µl de tampão de extração, 10µl de Proteinase K (10mg/ml) e um pequeno pedaço de tecido.
2. Deixar em banho-maria ou estufa a 55°C por 2 a 3 horas.
3. Acrescentar 100µl de solução de NaCl 5M e misturar bem invertendo o tubo vagarosamente.
4. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Remover o 300µl de sobrenadante e transferir para um novo tubo de 1,5ml.
6. Adicionar 600µl de etanol 100% gelado.
7. Deixar no ultrafreezer (-80°C) por 20 minutos.
8. Centrifugar a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C.
9. Remover o sobrenadante.
10. Adicionar 1ml de etanol 70% (temperatura ambiente).
11. Centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C.
12. Remover o sobrenadante.
13. Secar bem (pode deixar em estufa a 37°C por até 30 minutos).
14. Adicionar 200µl de água ultrapura autoclavada. Deixar em uma superfície ou na geladeira por pelo menos 24 horas para hidratação.
15. Aliquotar o DNA e guardar cerca de 150µl no freezer (-20°C – solução estoque) e o restante na geladeira (4°C – solução de trabalho).

3.2.2. Amplificação e Seqüenciamento

Para amplificar as regiões do DNA mitocondrial e nuclear estudadas foram realizadas reações de PCR com um volume final de 25,0µl, contendo: 19,9µl de água destilada estéril, 0,5µl de dNTP (8mM), 2,5 µl de 10X “PCR Buffer” (Invitrogen), 0,5µl de cada primer (10µM), 0,1µl de *Taq DNA polimerase* (Invitrogen) e 1,0µl de DNA molde. Os primers utilizados estão listados na Tabela 2.

Tabela 2: Relação dos *primers* utilizados para amplificação de parte dos genes mitocondriais e nuclear.

Gene	Identificação dos Primers	Seqüência dos primers	Referência
12S rRNA	L941-PHE	5'- AAA TCA AAG CAT AAC ACT GAA GAT G -3'	Presente trabalho
	H2010-VAL	5'- CCA ATT TGC ATG GAT GTC TTC TCG G -3'	
Siah	T3b	5'- ATT AAC CCT CAC TAA AGT CGA GTG CCC CGT GTG YTT YGA YTA -3'	Calcagnotto et al. (2005)
	T7b	5'- AAT ACG ACT CAC TAT AGG AAG TGG AAG CCG AAG CAG SWY TGC ATC AT -3'	
ND4	L11935	5'- CCA AAA GCA CAC GTA GAA GC -3'	Shimabukuro-Dias <i>et al.</i> (2004)
	H12857	5'- ACC AAG AGT TTT GGT TCC TA -3'	
16S rRNA	16Sa-L	5'- ACG CCT GTT TAT CAA AAA CAT - 3'	Palumbi <i>et al.</i> (1991)
	16Sb-H	5'- CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T - 3'	

As reações de PCR seguiram as seguintes condições gerais: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 42-65°C por 60 segundos para anelamento dos primers, 68°C por 120 segundos, estendendo a cadeia e para finalizar, um ciclo a 72°C por 300 segundos. A reação de PCR foi realizada em um termociclador MJ Research, INC, modelo PTC-100™ Programmable Thermal Controller.

Os produtos foram aplicados em um gel de agarose 1,0%, corados com brometo de etídio (0,5µl/ml) e visualizados em um transluminador de luz ultravioleta, verificando a qualidade e tamanho dos fragmentos amplificados. Os géis de agarose foram fotografados e digitalizados pelo programa da Kodak “Electrophoresis Documentation and Analysis System 120”. Os produtos da reação de PCR foram purificados usando o kit Amershan Biosciences, GFX™ PCR Gel Band Purification, usando o seguinte protocolo:

- Cortar as bandas, pesar e colocar cada uma delas em um eppendorf;
- Picotar as bandas dentro do tubo com uma pinça;
- Adicionar 10µl de CAPTURE BUFFER para cada 10mg de gel (no mínimo 300µl quando for direto do líquido e vai para o passo f);
- Misturar no vórtex e incubar a 60°C até que a agarose dissolva completamente (de 5 a 15 minutos, mexendo sempre);
- Durante a incubação, separe uma coluna GFX para cada tubo coletor;
- Depois de completamente dissolvida a agarose, centrifugar (microcentrifuga) brevemente para coletar a amostra no fundo do tubo;
- Transferir a amostra para a coluna GFX, incubar a temperatura ambiente por

um minuto;

- h) Centrifugar por um minuto a 16.000rpm;
- i) Descartar o material que passou pelo tubo (líquido), colocar a coluna GFX novamente no tubo de coleta (mesmo tubo);
- j) Adicionar 500µl de WASH BUFFER (já com etanol) à coluna e centrifugar por um minuto a 16.000rpm;
- k) Descartar o tubo coletor e transferir a coluna GFX para um eppendorf de 1,5ml limpo, esperar cinco minutos a temperatura ambiente (secar em volta da coluna para eliminar resíduos de álcool);
- l) Aplicar 35µl de água ultrapura para eluir, diretamente no topo da coluna;
- m) Incubar por cinco minutos a temperatura ambiente;
- n) Centrifugar por um minuto a 16.000rpm para recolher o DNA purificado.

A quantificação foi verificada através da comparação do produto de PCR em gel de agarose 1,0% com o do *ladder* “Low DNA Mass” que possui peso molecular conhecido.

Os produtos purificados foram utilizados como molde para as reações de seqüenciamento (com volume final de 9,0µl) usando 2,0µl de Dynamic Terminator (Amersham Biosciences), junto com 2,0µl de um dos *primers* na concentração de 3,0µM (3:1) e 1,0-5,0µl (50-200ng) do DNA purificado, sendo a reação completada com água se for menos de 5,0µl de DNA. Para esta reação foram utilizados os mesmos *primers*, *forward* separadamente do *reverse*, usados nas reações de amplificação. As condições da PCR de seqüenciamento foram: um ciclo inicial a 95°C por 120 segundos, seguido de 25 ciclos a 95°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 120 segundos.

Depois da PCR de seqüenciamento, as amostras foram purificadas com 2,0µl de acetato de sódio (4,5mM) mais 80,0µl de etanol 95%, adicionados aos produtos de PCR e misturados com ajuda de um vórtex. Seguido de uma centrifugação a 16.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 400µl de etanol 70% foi adicionado a cada amostra. Em seguida novamente centrifugado por 10 minutos a 16.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o material foi mantido em estufa a 37°C por uma hora, protegido da luz. Antes da aplicação da amostra para corrida, o DNA foi dissolvido em uma solução contendo formamida e *blue dextran* (5:2).

Os produtos purificados foram aplicados em um gel de poliacrilamida 4,5% e seqüenciados em um seqüenciador automático Applied Perking-Elmer ABI PRISM 377 DNA Sequencer.

3.2.3. Alinhamento das seqüências e análises filogenéticas

As seqüências obtidas para cada espécie, duas *forward* e duas *reverse* para os genes 12S rRNA e apenas duas *forward* para o gene Siah1, foram inicialmente analisadas com o programa BIOEDIT (Hall, 1999), e uma seqüência consenso, para cada espécie, foi gerada. Foram obtidas seqüências adicionais, do trabalho de Shimabukuro-Dias *et al.* (2004), das seguintes espécies: *Nematogenys inermis* (Nematogenyidae), *Henonemus punctatus* e *Trichomycterus areolatus* (Trichomycteridae), *Astroblepus sp.* (Astroblepidae), *Neoplecostomus paranaensis*, *Delturus parahybae* e *Hemipsilichthys sp.* (Loricariidae), *Lepthoplosternum tordilho*, *L. altamazonicum*, *Megalechis picta*, *M. thoracata*, *Callichthys callichthys*, *Dianema longibarbis*, *D. urostriatum*, *Hoplosternum litoralle* (Callichthyidae). Posteriormente, as seqüências de todas as espécies foram alinhadas com o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) como implementado no programa DAMBE versão 4.0.65 (Xia e Xie, 2001), sendo o alinhamento checado e corrigido manualmente. A possível saturação de substituições de nucleotídeos foi avaliada pelo programa DAMBE versão 4.0.65 (Xia e Xie, 2001) plotando-se o número absoluto de transições (Ti) e transversões (Tv) contra os valores de distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980). O programa Modeltest 3.06 (Posada e Crandall, 1998) foi utilizado para selecionar o modelo evolutivo que melhor se ajustava aos dados obtidos.

As análises filogenéticas baseadas pelo método de Neighbor-Joining (NJ) foram realizadas com o programa MEGA versão 3.0 (Kumar *et al.*, 2004). As análises baseadas no método de máxima parcimônia (MP) foram realizadas com o programa PAUP* versão 4.0b10 (Swofford, 2002) com buscas heurísticas usando-se a adição aleatória de seqüências e o algoritmo “tree bisection and reconnection” (TBR). Em todas as análises o método empregado para otimização dos estados de caráter foi o ACCTRAN (Accelerated Transformation). Sítios com dificuldade de alinhamento foram excluídos das análises. As árvores de MP foram obtidas incluindo ou excluindo os *gaps*, colocando os *gaps* como quinta base e considerando as proporções Ti/Tv 1:1 e 1:2. A reamostragem pelo método de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) foi aplicada para avaliar o suporte para os nós individuais, usando-se 1000 réplicas com 100000 adições aleatórias e o método de rearranjo de ramos TBR.

As relações filogenéticas baseadas em máxima verossimilhança (ML) foram estimadas usando-se o programa PAUP* versão 4.0b10 (Swofford, 2002) e também o programa MetaPIGA 1.0.2b (Lemmon e Milinkovitch, 2002a). O programa MetaPIGA implementa uma busca heurística, o algoritmo de análise genética de metapopulações, envolvendo várias

populações de árvores que são forçadas a cooperar na busca pela melhor árvore (Lemmon e Milinkovitch, 2002b). As análises foram realizadas com as opções padrão, usando-se o modelo de substituição nucleotídica de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY85) (Hasegawa *et al.*, 1985) e 1000 réplicas. As árvores de consenso foram produzidas com o programa TreeExplorer implementado no programa MEGA 3.0 (Kumar *et al.*, 2004). Nas análises filogenéticas dos dados moleculares foram seguidas as recomendações de Swofford et al. (1996) e Nei e Kumar (2000).

Resultados



4. RESULTADOS

Foram seqüenciados os genes mitocondriais ND4, o 12S e 16S da subunidade do DNA ribossômico e o gene nuclear Siah. O tamanho final das seqüências variou de 347 a 1623 pares de bases.

As transições/transversões (Ti/Tv) foram plotadas versus a distância genética segundo o modelo de Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) para cada gene individualmente, e também para os dados totais, considerando como relações lineares, aquelas que possuíam o coeficiente de correlação linear (r) maior que 0.75, indicando que não houve saturação dos nucleotídeos.

As seqüências dos genes 12S, 16S, ND4 e Siah (isolados ou combinados) foram analisadas sob uma variedade de modelos, dos mais simples (todos os caracteres escolhidos pesados igualmente) aos mais complexos (utilizando apenas caracteres mais conservados e diferentes esquemas de pesos de transições e transversões). Em alguns casos, regiões com dificuldade de alinhamento foram excluídas das análises. As análises filogenéticas resultaram em uma série de cladogramas que exprimem hipóteses de relacionamentos entre membros constituintes de Callichthyinae analisados até o momento.

4.1. Análise das seqüências dos genes

4.1.1. Gene 12S rRNA

Foram obtidas seqüências do gene mitocondrial 12S rRNA de 19 exemplares dos cinco gêneros representantes da subfamília Callichthyinae. O tamanho das seqüências do gene 12S rRNA variou de 806 pb em *Lepthoplosternum pectorale* a 960 pb em *Callichthys callichthys*, com um valor médio de 932 pb. Após o procedimento de alinhamento e correção manual, o alinhamento das seqüências resultou em uma matriz com 1006 caracteres dos quais 486 foram conservados, 499 foram variáveis e 320 foram filogeneticamente informativos. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 1,2. A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 32,8% de adenina (A), 24,8% de citosina (C), 21,0% de guanina (G) e 21,5% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de $d = 0,214 \pm 0,013$, segundo o modelo de Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Uma análise gráfica da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) indica que não há saturação nestes nucleotídeos (Figura 4).

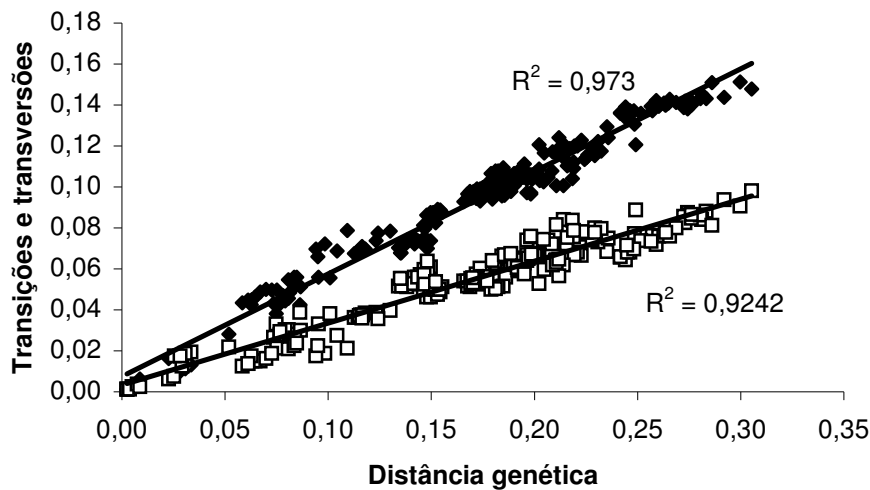


Figura 4. Gráfico mostrando a frequência observada de transições (Ti) e transversões (Tv) em relação à distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros para o gene 12S rRNA. As transições correspondem aos quadrados cheios e as transversões aos quadrados vazios.

4.1.1.2. Análise filogenética realizada pelo método de Neighbor-Joining (NJ)

As análises foram feitas considerando todos os animais cujas seqüências foram obtidas (19 espécies), todos os dados obtidos (1006 pb) e considerando os gaps como dados ausentes. A árvore de consenso obtida está representada na Figura 5. *Nematogenys inermis* foi considerado como grupo externo em todas as análises e foi utilizada a opção “Pairwise Deletion”.

Nessa análise, os valores de suporte para quase todos os nós internos foram maiores que 50%, concordando com os dados moleculares encontrados na literatura, mas discordando dos dados morfológicos existentes até o momento. A filogenia obtida nessa análise foi muito similar a filogenia construída pelo método de Mínima Evolução (ME).

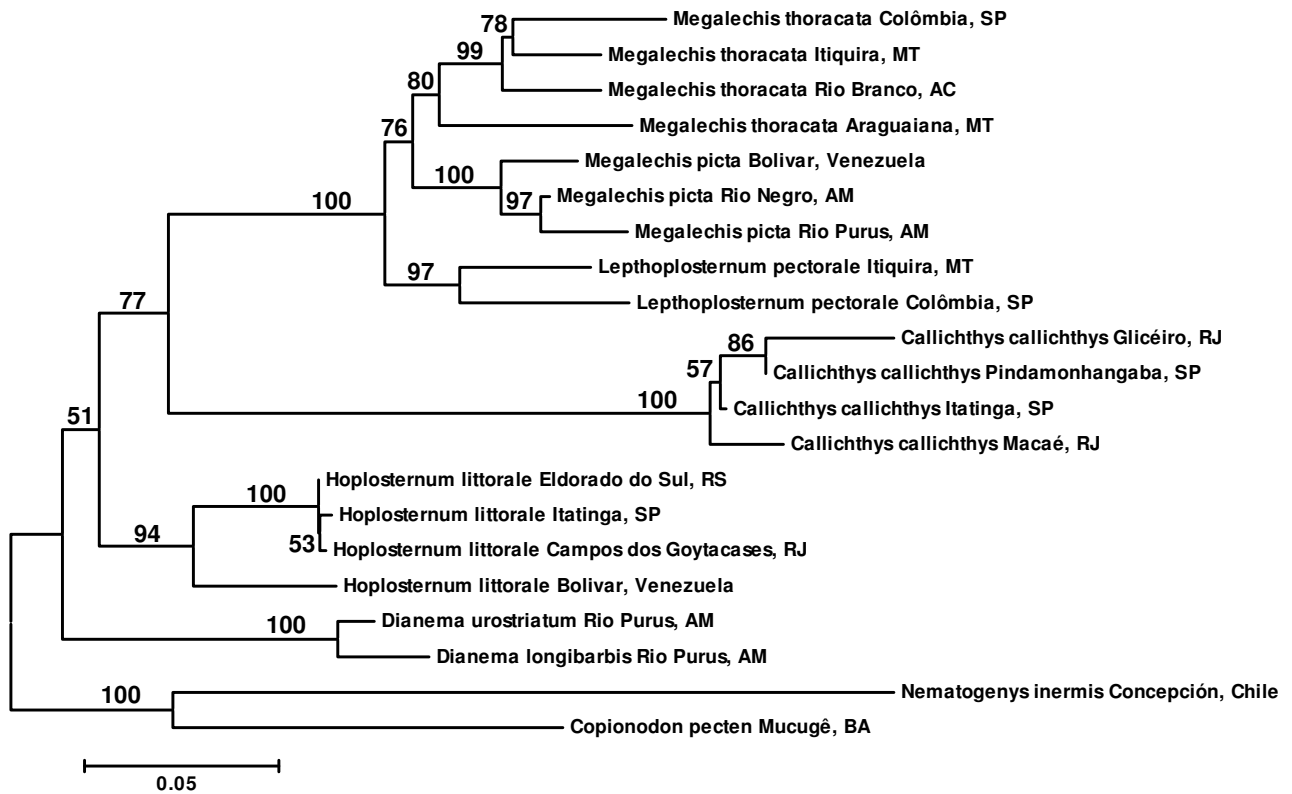


Figura 5. Árvore consenso de NJ para o gene 12S produzida quando todos os sítios (1006pb) foram usados, proporção Ti/Tv 1:1 e considerando os *gaps* como dados ausentes. Os números acima dos ramos são valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas. *Nematogenys inermis* foi usado como grupo externo.

4.1.1.3. Análise filogenética realizada pelo método de Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (ML)

Análises heurísticas, utilizando-se o método de Máxima Parcimônia, foram realizadas empregando-se todos os dados, incluindo ou excluindo os *gaps*, colocando os *gaps* como quinta base e considerando as proporções 1:1 e 1:2. As filogenias resultantes não foram muito congruentes. A árvore melhor resolvida foi àquela construída excluindo os *gaps* e considerando a proporção Ti/Tv 1:1 (Figura 6). Para esta árvore, os resultados obtidos foram: comprimento da árvore (TL) = 1046, índice de consistência (CI) = 0,6759, índice de homoplasia (HI) = 0,3241 e índice de retenção (RI) = 0,7520.

O mesmo resultado foi encontrado quando se excluíram as regiões de difícil alinhamento. A topologia obtida considerando os *gaps* como quinta base e proporção de 1:1 foi bem semelhante à melhor árvore encontrada para resolver a filogenia. Essas topologias estão, em parte, bem semelhantes à filogenia molecular existente, diferenciando-se apenas no ramo onde aparecem os gêneros *Lepthoplosternum* e *Megalechis*. Na árvore obtida, as espécies de *L. pectorale* estudadas encontram-se como espécies irmãs das espécies *Megalechis picta* da Venezuela e do Amazonas, aparecendo como grupo irmão do clado onde estão as espécies *Megalechis thoracata*.

As análises de ML realizadas com o programa PAUP* resultaram numa filogenia consenso muito similar àquela obtida nas análises de MP. O melhor modelo de análise escolhido pelo MODELTEST foi o Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993) com parâmetro Gama (TrN+G). Os valores maiores ou iguais a 50%, encontrados em 1000 réplicas pelo método de *bootstrap*, são mostrados na Figura 6. Os resultados das análises de ML com o programa MetaPIGA, resultou em uma árvore semelhante àquela encontrada pelo PAUP* (Figura 7).

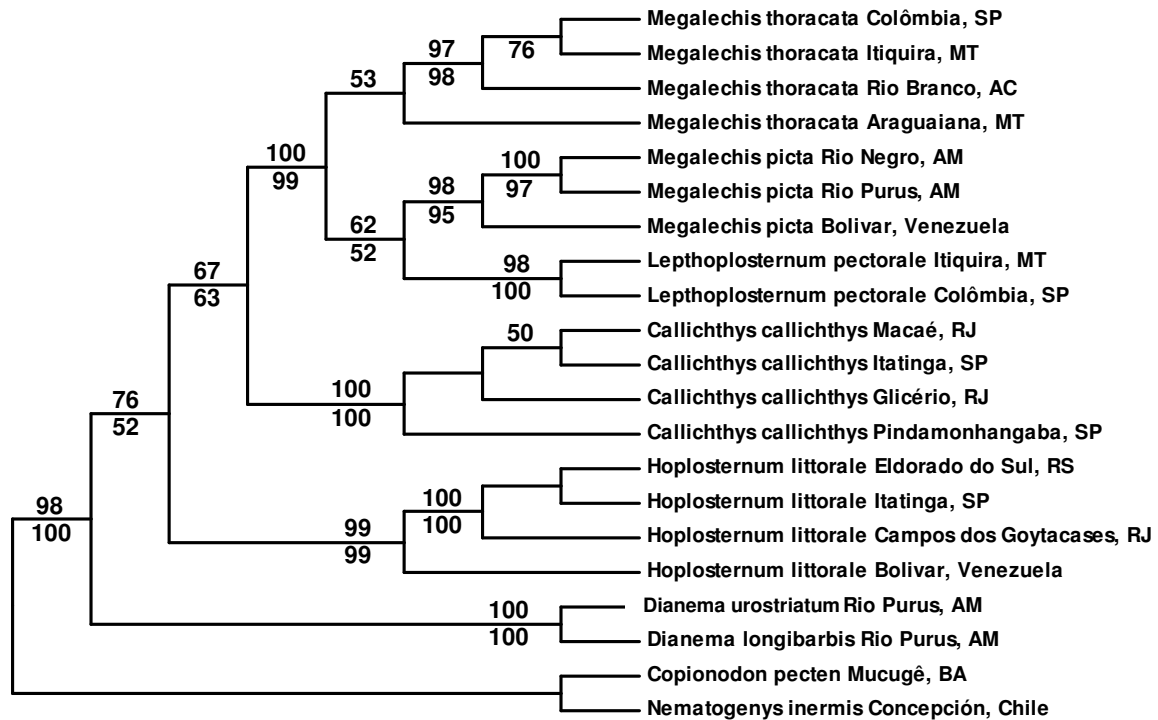


Figura 6. Árvore consenso de MP para o gene 12S produzida quando todos os sítios (1006pb) foram usados, proporção Ti/Tv 1:1 e considerando os *gaps* como dados ausentes (TL= 1046, CI= 0.6759, HI= 0.3241, RI= 0.7520). Os números acima dos ramos representam os valores de *bootstrap* obtidos após 1000 réplicas com o método de Máxima Parcimônia. Os números abaixo dos ramos correspondem aos valores obtidos após análise pelo método de Máxima Verossimilhança baseados em 100 réplicas. *Nematogenys inermis* foi considerado com grupo externo.

4.1.2. Análise das seqüências do gene nuclear Siah

O tamanho das seqüências do gene nuclear Siah variou de 347 pb em *Callichthys callichthys* a 357 pb em *Megalechis thoracata*, *Dianema longibarbis* e *Leptoplosternum pectorale* com um valor médio de 354,9 pb. Do total de nucleotídeos obtidos após o procedimento de alinhamento das seqüências (357 pb), 304 eram conservados, 53 eram variáveis e 18 eram filogeneticamente informativos. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 1,0. As seqüências obtidas para o gene Siah eram compostas em média, por 17,5% de adenina (A), 35,2% de citosina (C), 28,1% de guanina (G) e 19,2% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de $d = 0,027 \pm 0,004$, segundo o modelo de Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980). Uma análise gráfica da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros indica que há ausência de saturação nestes nucleotídeos (Figura 8).

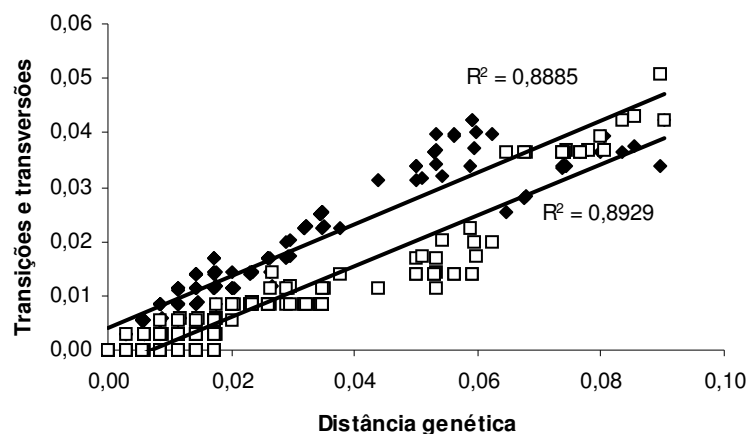


Figura 8. Gráfico mostrando a frequência observada de transições (Ti) e transversões (Tv) em relação à distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros para o gene Siah. As transições correspondem aos quadrados cheios e as transversões aos quadrados vazios.

4.1.2.1. Análise filogenética realizada pelo método de Neighbor-Joining (NJ)

As análises foram feitas considerando todos os animais cujas seqüências foram obtidas (19 espécies), todos os dados obtidos (357 pb) e considerando os gaps como dados ausentes. A árvore de consenso obtida está representada na Figura 9. *Nematogenys inermis* foi considerado como grupo externo em todas as análises. As árvores foram construídas pelo

método de Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993) com parâmetro Gama e foi utilizada a opção “Pairwise Deletion”.

Nessa análise, os valores de suporte para quase todos os nós internos foram menores que 50%, discordando dos dados moleculares encontrados na literatura e mostrando que o método de análise de Neighbor-Joining não é suficiente para a resolução da filogenia sendo necessário diferentes métodos de análise. A filogenia obtida nessa análise foi muito similar a filogenia construída pelo método de Mínima Evolução (ME).

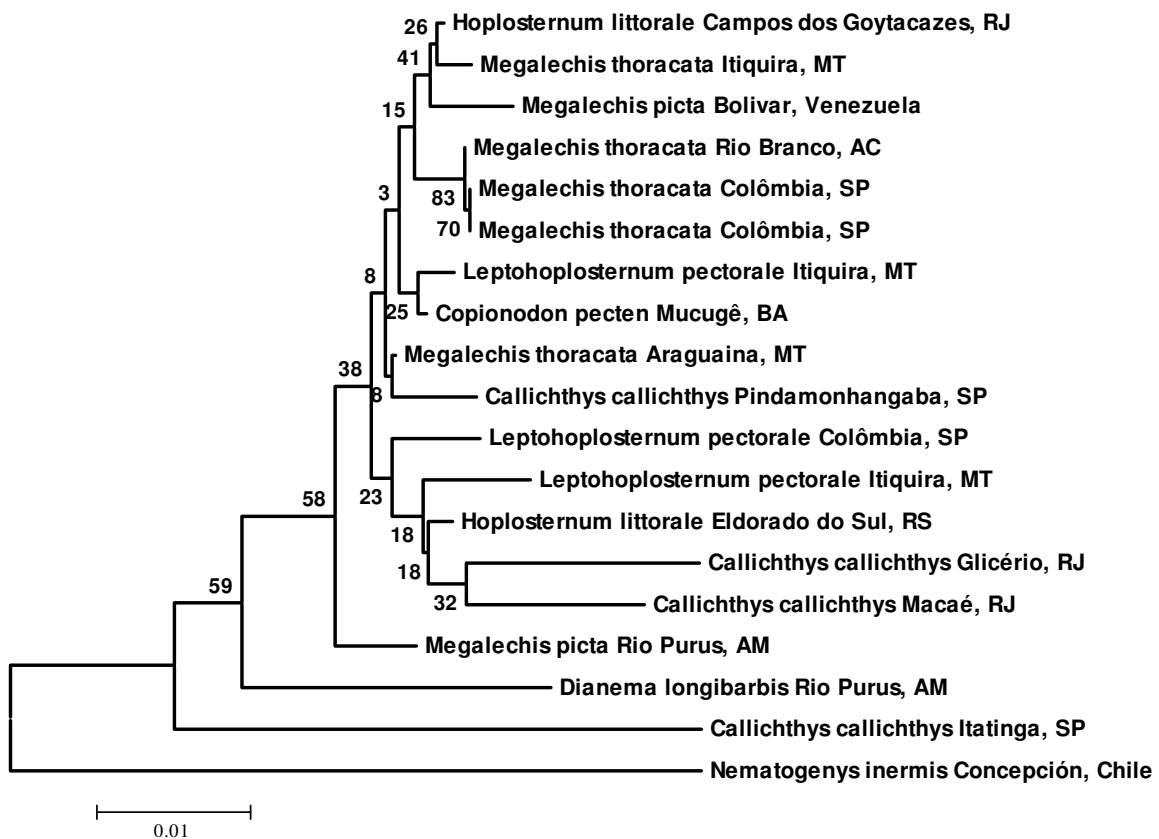


Figura 9. Árvore consenso de NJ para o gene Siah produzida quando todos os sítios (357pb) foram usados, proporção Ti/Tv 1:1 e considerando os *gaps* como dados ausentes. Os números acima dos ramos são valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas. *Nematogenys inermis* foi usado como grupo externo.

4.1.2.2. Análise filogenética realizada pelo método de Máxima Parcimônia (MP)

Análises heurísticas, utilizando-se o método de Máxima Parcimônia, foram realizadas incluindo ou excluindo os gaps e considerando as proporções 1:1 e 1:2. O número de caracteres informativos encontrados para parcimônia foi 18, onde mostra ser um número muito baixo para construir uma filogenia consistente. O melhor método de análise encontrado pelo MODELTEST para esse gene foi o HKY (Hasegawa-Kishino-Yano) (Hasegawa *et al.*, 1985). A melhor árvore encontrada foi àquela construída excluindo os *gaps* e considerando a proporção Ti/Tv 1:1 (Figura 10). Para esta árvore, os resultados obtidos foram: comprimento da árvore (TL) = 76, índice de consistência (CI) = 0,8026, índice de homoplasia (HI) = 0,1974 e índice de retenção (RI) = 0,6429.

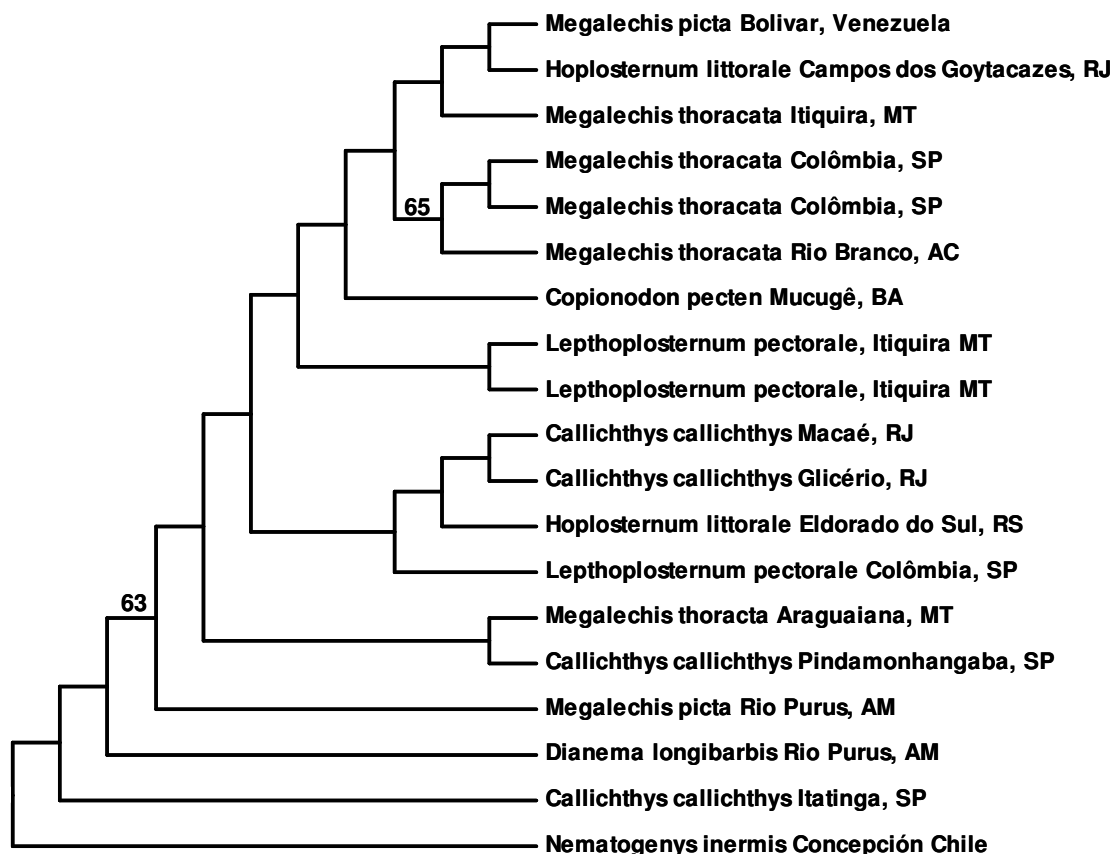


Figura 10. Árvore consenso de MP para o gene Siah produzida quando todos os sítios (357pb) foram usados, proporção Ti/Tv 1:1 e considerando os *gaps* como dados ausentes (TL= 84, CI= 0.8026, HI= 0.1974, RI= 0.6429). Os números acima dos ramos representam os valores de *bootstrap* obtidos após 1000 réplicas com o método de Máxima Parcimônia. *Nematogenys inermis* foi considerado com grupo externo.

4.1.3. Análise das seqüências combinadas dos genes 12S mitocondrial e Siah nuclear

Foram obtidas seqüências do gene mitocondrial 12S e do gene nuclear Siah de 16 exemplares dos cinco gêneros representantes da subfamília Callichthyinae, de *Nematogenys inermis* e *Copionodon pecten* como grupos externos. Não foi obtida a seqüência do gene Siah para a espécie *D. urostriatum*, porém ela foi incluída nas análises devido a sua importância para a filogenia do grupo. O tamanho das seqüências dos genes variou de 1163 pb em *Lepthoplosternum pectorale* a 1314 pb em *Dianema longibarbis*, com um valor médio de 1263,6 pb. Após o procedimento de alinhamento e correção manual, o tamanho final das seqüências era de 1363 caracteres dos quais 794 foram conservados, 548 foram variáveis e 330 foram filogeneticamente informativos. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 1,2. A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 28,7% de adenina (A), 27,6% de citosina (C), 22,9% de guanina (G) e 20,9% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de $d = 0,163 \pm 0,010$, segundo o modelo de Tamura-Nei (Tamura-Nei, 2003). Uma análise gráfica da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros indica que não há saturação nestes nucleotídeos (Figura 11).

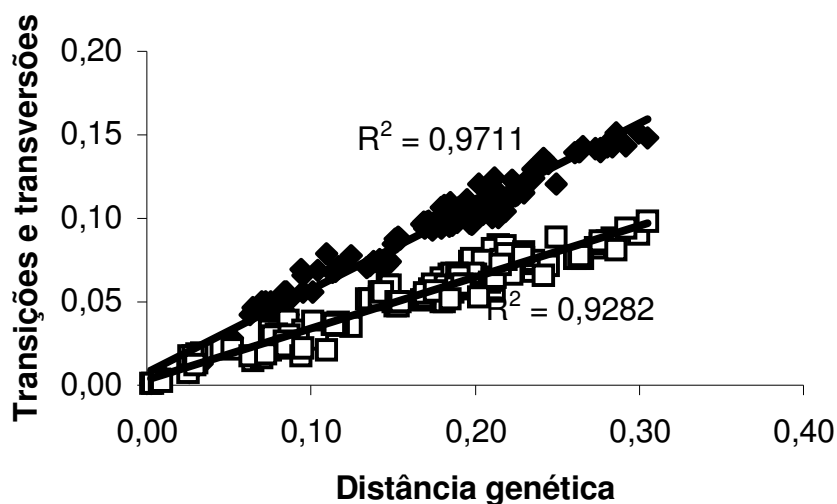


Figura 11. Gráfico mostrando a frequência observada de transições (Ti) e transversões (Tv) em relação à distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros para os genes 12S e Siah combinados. As transições correspondem aos quadrados cheios e as transversões aos quadrados vazios.

4.1.3.1. Análise filogenética realizada pelo método de Neighbor-Joining (NJ)

As análises foram feitas considerando todos os animais cujas seqüências foram obtidas (18 espécies), todos os dados obtidos (1363 pb) e considerando os gaps como dados ausentes. A árvore de consenso obtida está representada na Figura 12. *Nematogenys inermis* foi considerado como grupo externo em todas as análises. As árvores foram construídas pelo método de Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993) com parâmetro Gama e utilizou-se da opção “Pairwise Deletion”.

Nessa análise, os valores de suporte para quase todos os nós internos foram maiores que 50%, com topologia que corrobora em parte com os dados moleculares encontrados na literatura, mas discorda dos resultados obtidos pela árvore morfológica encontrada por Reis (1998).

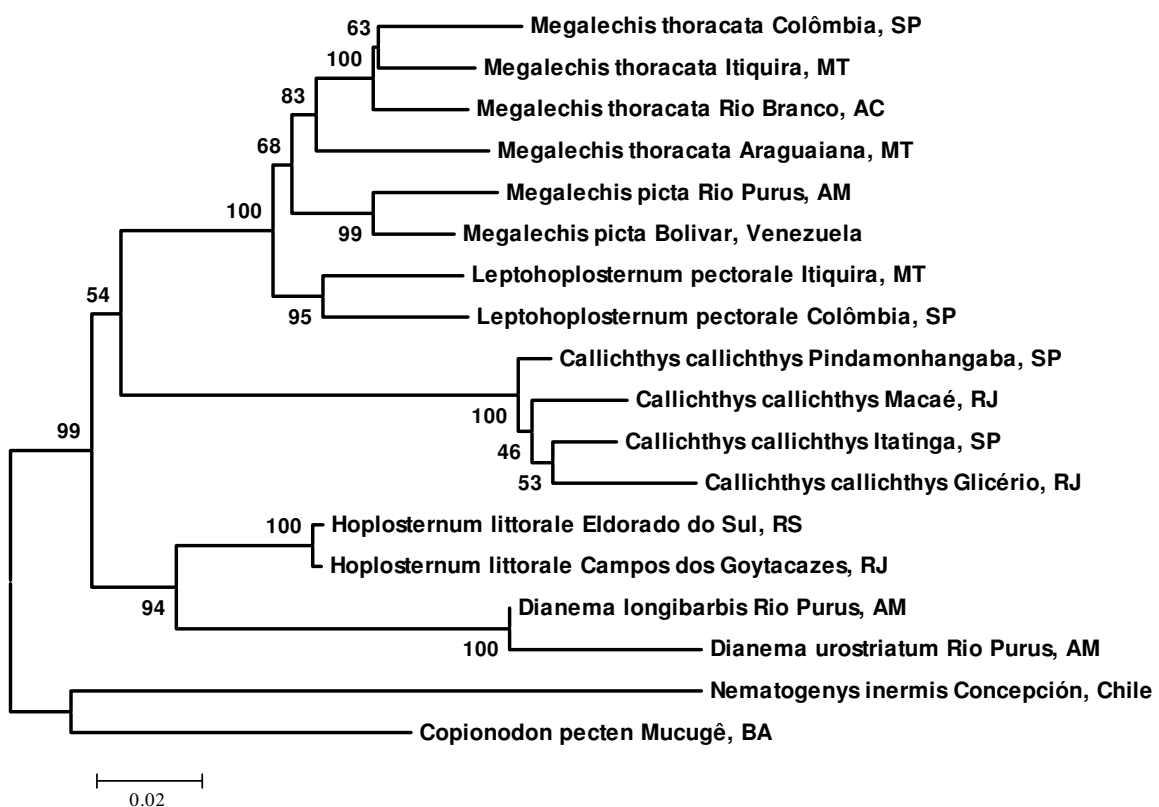


Figura 12. Árvore consenso de NJ com os genes 12S e Siah combinados produzida quando todos os sítios (1363 pb) foram usados, proporção Ti/Tv 1:1 e considerando os *gaps* como dados ausentes. Os números acima dos ramos são valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas. *Nematogenys inermis* foi usado como grupo externo.

4.1.3.2. Análise filogenética realizada pelo método de Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (ML)

Análises heurísticas, utilizando-se o método de Máxima Parcimônia, foram realizadas incluindo ou excluindo os *gaps* e considerando as proporções 1:1 e 1:2. As filogenias resultantes foram altamente congruentes. A árvore melhor resolvida foi àquela construída excluindo os *gaps* e considerando a proporção Ti/Tv 1:1 (Figura 13). Para esta árvore, os resultados obtidos foram: comprimento da árvore (TL) = 1343, índice de consistência (CI) = 0,6947, índice de homoplasia (HI) = 0,3053 e índice de retenção (RI) = 0,7042. O melhor método de análise encontrado pelo MODELTEST para esse gene foi o Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993) com parâmetro Gama (TrN+G). Os resultados das análises de ML com o programa MetaPIGA realizado com 100 réplicas e considerando a árvore de consenso resultante entre 400 árvores, resultou em uma árvore semelhante àquela encontrada pelo PAUP* (Figura 13).

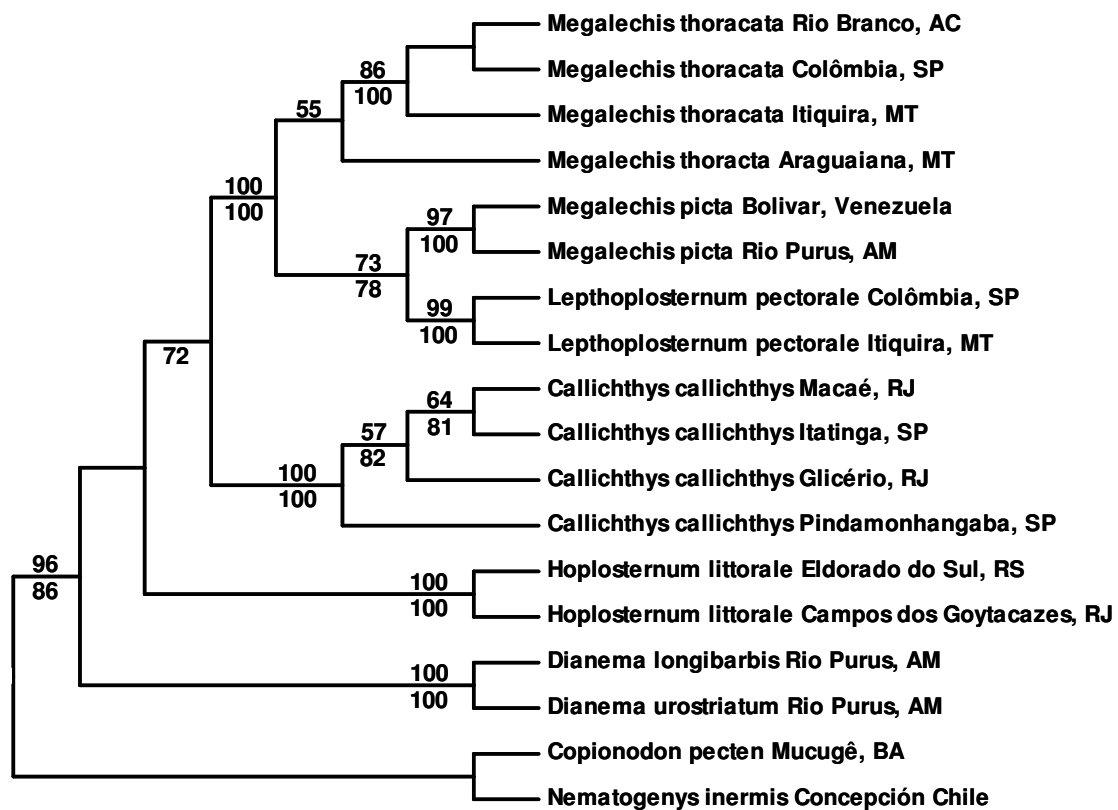


Figura 13. Árvore consenso de MP com os genes 12S e Siah combinados produzida quando todos os sítios (1363 pb) foram usados, proporção Ti/Tv 1:1 e considerando os *gaps* como dados ausentes (TL= 1343 , CI= 0.6947, HI= 0.3053, RI= 0.7042). Os números acima dos ramos representam os valores de *bootstrap* obtidos após 1000 réplicas. Os números abaixo dos ramos representam os valores de bootstrap obtidos após a análise de 400 árvores de ML produzidas através do programa MetaPIGA. *Nematogenys inermis* foi considerado com grupo externo.

4.1.4. Análise das seqüências consenso dos gêneros para os genes 12S mitocondrial e Siah nuclear analisados em conjunto

Foram obtidas seqüências do gene mitocondrial 12S e do gene nuclear Siah de seis espécies dos cinco gêneros representantes da subfamília Callichthyinae, de *Nematogenys inermis* e *Copionodon pecten* como grupo externo. O tamanho das seqüências completas dos genes variou de 1310 pb em *Lepthoplosternum pectorale* a 1316 pb em *Callichthys callichthys*, com um valor médio de 1308,3 pb. Após o procedimento de alinhamento e correção manual, o tamanho final das seqüências era de 1363 caracteres dos quais 896 foram conservados, 428 foram variáveis e 204 foram filogeneticamente informativos. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 1,2. A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 28,9% de adenina (A), 27,5% de citosina (C), 22,6% de guanina (G) e 21,0% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de $d = 0,170 \pm 0,010$, segundo o modelo de Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Uma análise gráfica da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) indica que não há saturação nestes nucleotídeos (Figura 14).

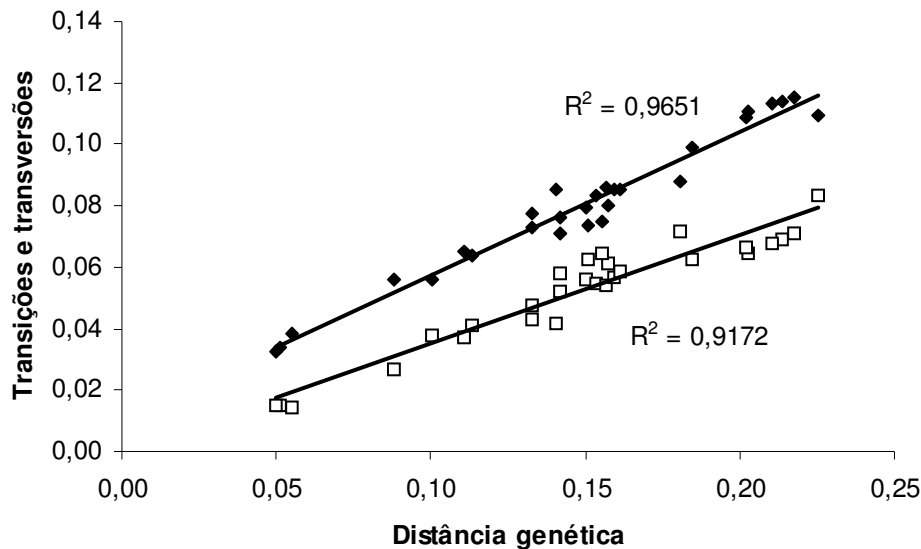


Figura 14. Gráfico mostrando a freqüência observada de transições (Ti) e transversões (Tv) em relação à distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros para o consenso entre os gêneros com os genes nuclear Siah e mitocondrial 12S analisados em conjunto. As transições correspondem aos quadrados cheios e as transversões aos quadrados vazios.

4.1.4.1. Análise filogenética realizada pelo método de Neighbor-Joining (NJ) e Mínima Evolução (ME)

As análises foram feitas considerando todos os animais cujas seqüências foram obtidas (oito espécies), todos os dados obtidos (1363 pb) e considerando os gaps como dados ausentes. A árvore de consenso obtida está representada na Figura 15. *Nematogenys inermis* foi considerado como grupo externo em todas as análises. As árvores foram construídas pelo método de Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993) com parâmetro Gama utilizando-se a opção de análise “Pairwise Deletion”.

Nessa análise, os valores de suporte para quase todos os nós internos foram maiores que 50%, com topologia que corrobora em parte com os dados moleculares encontrados na literatura, mas discorda dos resultados obtidos pela árvore morfológica encontrada por Reis (1998).

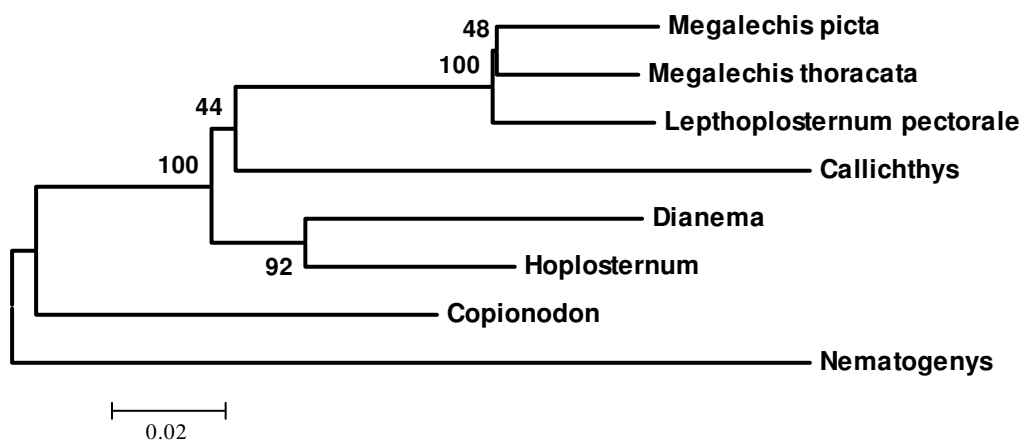


Figura 15. Árvore consenso de NJ com os genes 12S e Siah combinados (consenso dos gêneros) produzida quando todos os sítios (1363 pb) foram usados, proporção Ti/Tv 1:1 e considerando os *gaps* como dados ausentes. Os números acima dos ramos são valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas. *Nematogenys inermis* foi usado como grupo externo.

4.1.4.2. Análise filogenética realizada pelo método de Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (ML)

Análises heurísticas, utilizando-se o método de Máxima Parcimônia, foram realizadas incluindo ou excluindo os *gaps* e considerando as proporções 1:1 e 1:2. As filogenias

resultantes foram altamente congruentes. A árvore melhor resolvida foi àquela construída excluindo os *gaps* e considerando a proporção Ti/Tv 1:2 (Figura 16). Para esta árvore, os resultados obtidos foram: comprimento da árvore (TL) = 540, índice de consistência (CI) = 0,7704, HI = 0,2296 e índice de retenção (RI) = 0,5373. O melhor método de análise encontrado pelo MODELTEST para esse gene foi o Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993) com parâmetro Gama (TrN+G). A análise de Máxima Verossimilhança resultou em uma topologia idêntica à obtida pela análise de máxima parcimônia, com índices de repetição bastante altos nas 1000 pesquisas independentes.

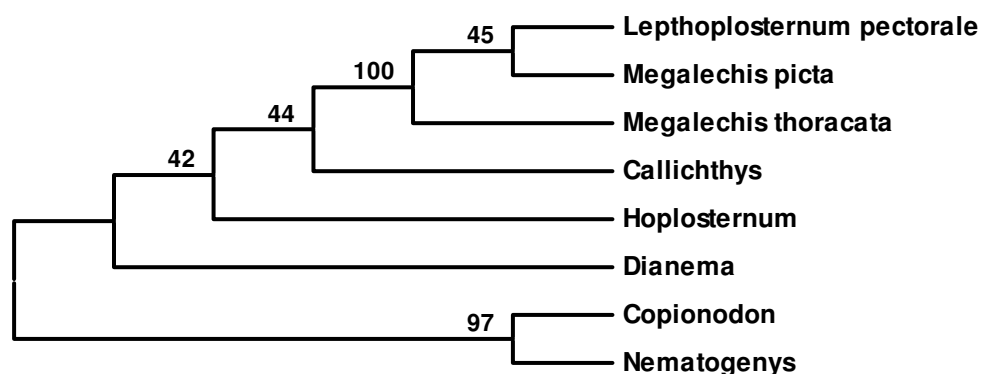


Figura 16. Árvore consenso de MP para os genes 12S e Siah combinados (consenso dos gêneros) produzida quando todos os sítios (1363 pb) foram usados, proporção Ti/Tv 1:1 e considerando os *gaps* como dados ausentes (TL= 540, CI= 0,7704, HI= 0,2296, RI= 0,5373). Os números acima dos ramos representam os valores de *bootstrap* obtidos após 1000 réplicas. *Nematogenys inermis* foi considerado com grupo externo.

4.1.5. Análise das seqüências combinadas dos genes mitocondriais 12S, 16S e ND4

Foram obtidas seqüências do gene mitocondrial 12S e 16S rRNA e ND4 de 12 exemplares dos cinco gêneros representantes da subfamília Callichthyinae e de sete espécies, de diferentes famílias, como grupo externo [*Nematogenys inermis* (Nematogenyidae), *Henonemus punctatus* e *Trichomycterus areolatus* (Trichomycteridae), *Astroblepus sp.* (Astroblepidae) e *Neoplecostomus paranaensis*, *Delturus parahybae* e *Hemipsilichthys sp.* (Loricariidae)]. O tamanho das seqüências completas do gene 12S, 16S e ND4 variou de 1230 pb em *Lepthoplosternum tordilho* a 1586 pb em *Megalechis picta*, com um valor médio de 1546,2 pb. Após o procedimento de alinhamento e correção manual, o tamanho final das

seqüências era de 1623 caracteres dos quais 831 foram conservados, 774 foram variáveis e 578 foram filogeneticamente informativos. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de 1,1. A composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 31,1% de adenina (A), 25,4% de citosina (C), 18,7% de guanina (G) e 24,8% de timina (T). A distância média entre as seqüências foi de $d = 0,243 \pm 0,012$, segundo o modelo de Tamura-Nei (Tamura-Nei, 2003). Uma análise gráfica da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) indica que não há saturação nestes nucleotídeos (Figura 17).

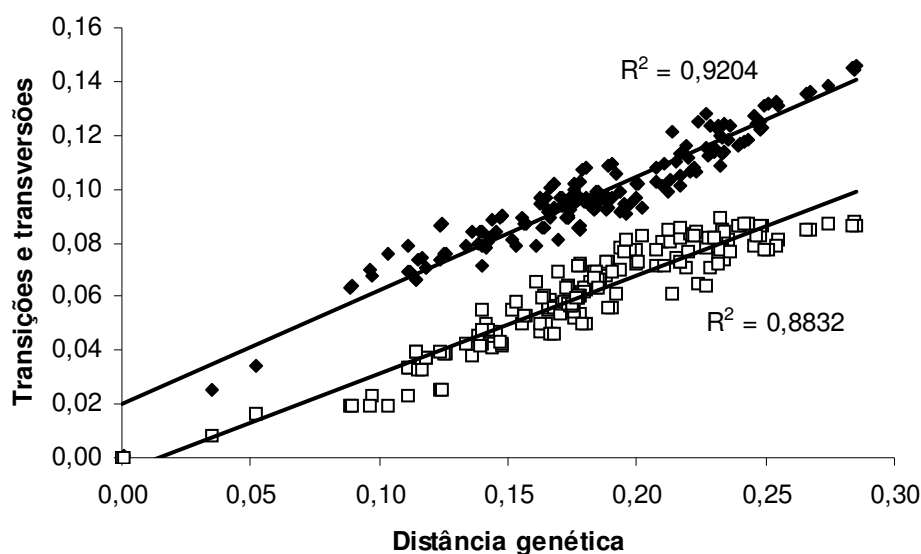


Figura 17. Gráfico mostrando a frequência observada de transições (Ti) e transversões (Tv) em relação à distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros para os genes mitocondriais 12S, 16S e ND4. As transições correspondem aos quadrados cheios e as transversões aos quadrados vazios.

4.1.5.1. Análise filogenética realizada pelo método de Neighbor-Joining (NJ) e Mínima Evolução (ME)

As análises foram feitas considerando todos os animais cujas seqüências foram obtidas (19 espécies), todos os dados obtidos (1623 pb) e considerando os gaps como dados ausentes. A árvore de consenso obtida está representada na Figura 18. *Nematogenys inermis* foi considerado como grupo externo em todas as análises. As árvores foram construídas pelo método de Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993) com parâmetro Gama e a opção “Pairwise Deletion” foi a escolhida.

Nessa análise, os valores de suporte para quase todos os nós internos foram maiores que 50%, com topologia discordante dos dados moleculares encontrados na literatura e mostrando que o método de análise de Neighbor-Joining e Mínima Evolução não são suficientes para a resolução da filogenia sendo necessários mais métodos de análise diferentes.

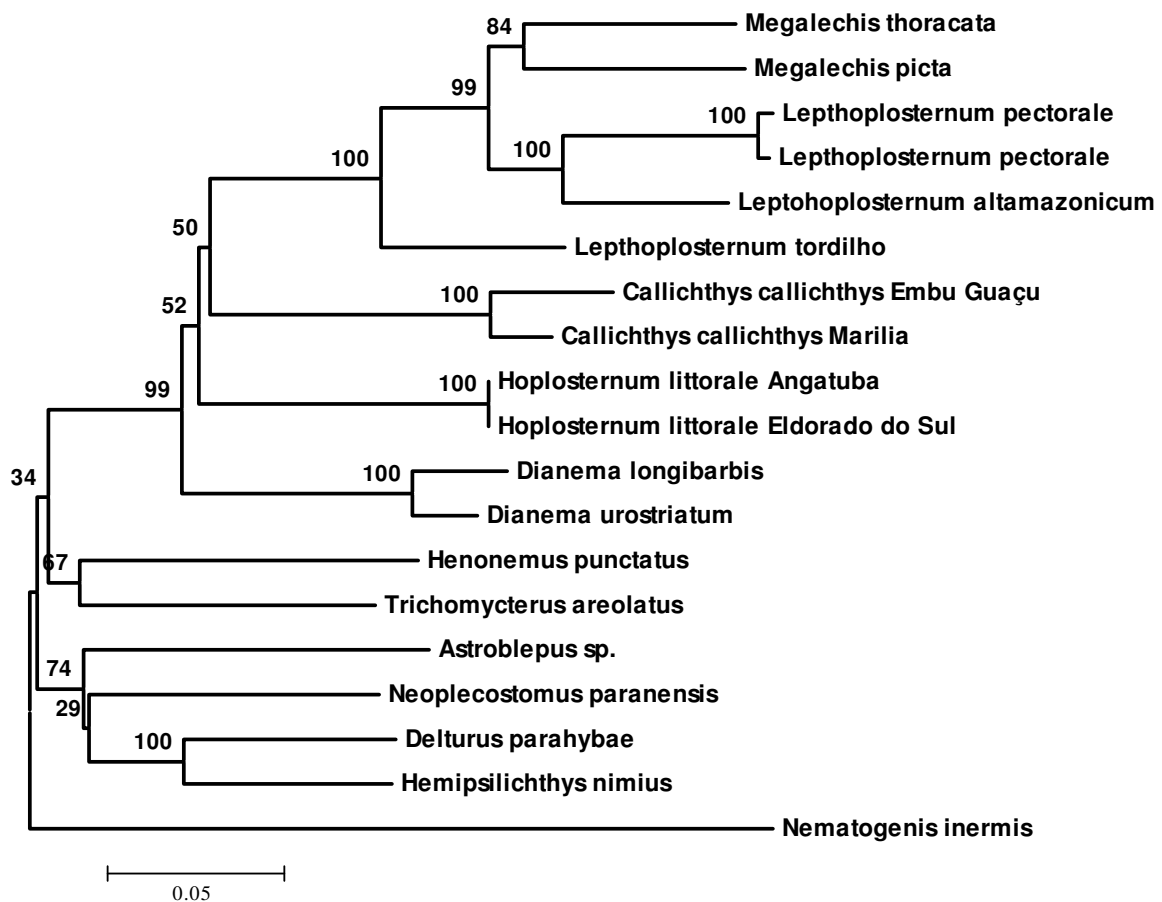


Figura 18. Árvore consenso de NJ para os genes 12S, 16S e ND4 produzida quando todos os sítios (1623 pb) foram usados, proporção Ti/Tv 1:1 e considerando os gaps como dados ausentes. Os números acima dos ramos são valores de bootstrap baseados em 1000 réplicas. *Nematogenys inermis* foi usado como grupo externo.

4.1.5.2. Análise filogenética realizada pelo método de Máxima Parcimônia (MP) e Máxima Verossimilhança (ML)

Análises heurísticas, utilizando-se o método de Máxima Parcimônia, foram realizadas incluindo ou excluindo os *gaps* e considerando as proporções 1:1 e 1:2. As filogenias resultantes foram altamente congruentes. O melhor método de análise encontrado pelo MODELTEST para esse gene foi o GTR+I+G (General Time-Reversible, Lanave et al., 1984).

A árvore melhor resolvida foi àquela construída excluindo os *gaps* e considerando a proporção Ti/Tv 1:1 (Figura 19). Para esta árvore, os resultados obtidos foram: comprimento da árvore (TL) = 2155, índice de consistência (CI) = 0,5081, índice de homoplasia (HI) = 0,4919 e índice de retenção (RI) = 0,5700. A análise de Máxima Verossimilhança resultou em uma topologia idêntica à obtida pela análise de máxima parcimônia, com índices de repetição bastante altos nas 1000 pesquisas independentes. Os resultados das análises de ML com o programa MetaPIGA realizado com 100 réplicas e considerando a árvore de consenso resultante entre 400 árvores, resultou em uma árvore semelhante àquela encontrada pelo PAUP* (Figura 20).

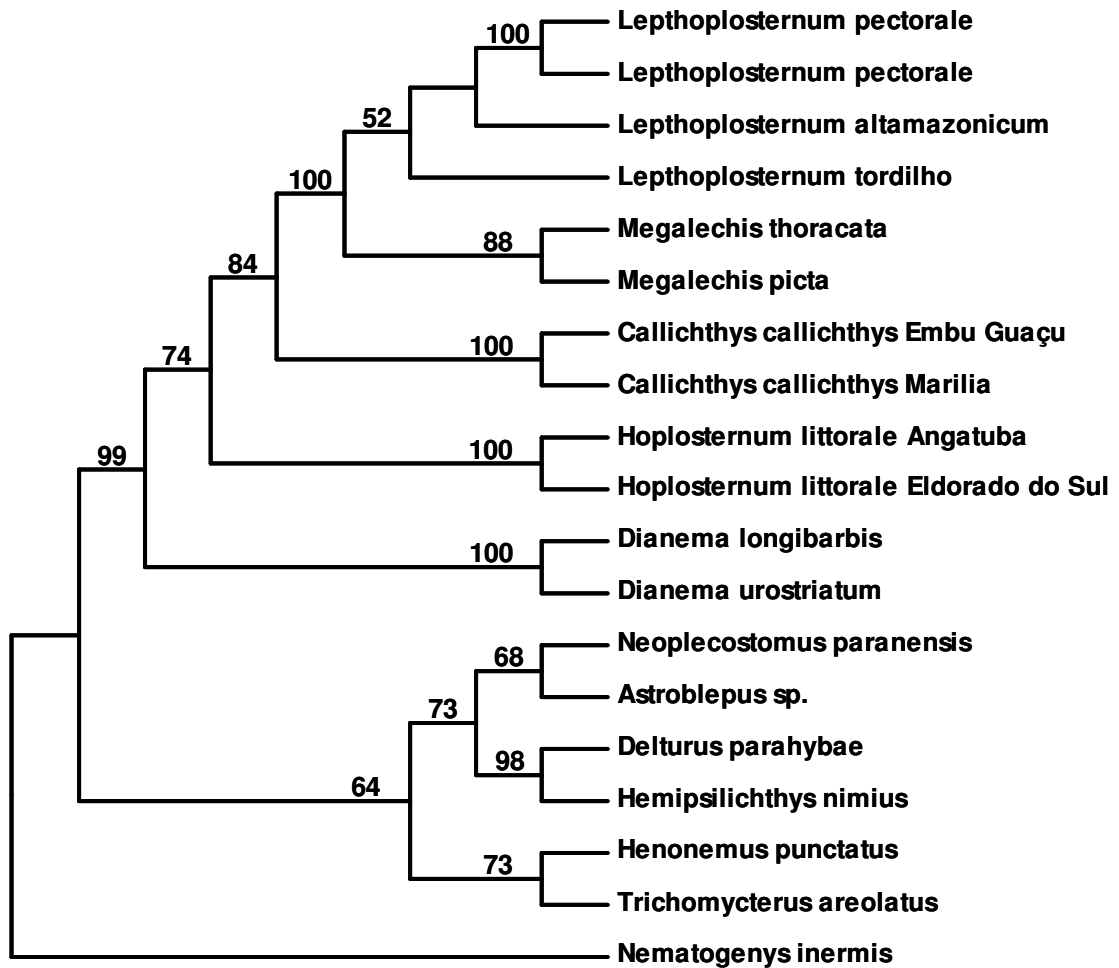


Figura 19. Árvore consenso de MP para os genes 12S, 16S e ND4 produzida quando todos os sítios (1623pb) foram usados, proporção Ti/Tv 1:1 e considerando os *gaps* como dados ausentes (TL= 2155, CI= 0.5081, HI= 0.4919, RI= 0.5700). Os números acima dos ramos representam os valores de *bootstrap* obtidos após 1000 réplicas. *Nematogenys inermis* foi considerado com grupo externo.

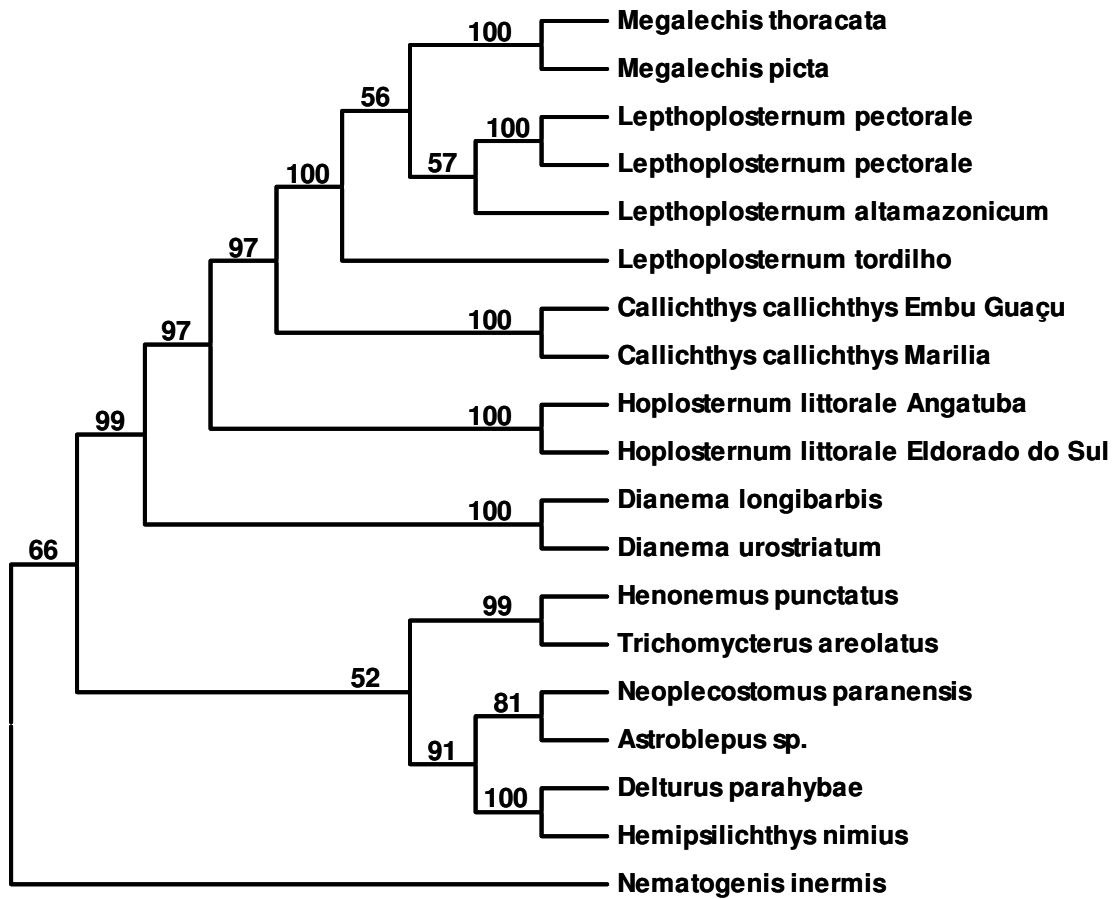


Figura 20. Árvore consenso de ML para os genes 12S, 16S e ND4 produzida por MetaPIGA. As análises foram realizadas com 100 gerações e considerando a árvore de consenso resultante entre 400 árvores. *Nematogenys inermis* foi considerado com grupo externo.

Discussão



5. DISCUSSÃO

Todas as filogenias obtidas pelos métodos de análise utilizados corroboram a hipótese de que a subfamília Callichthyinae é um grupo monofilético. Esse resultado está de acordo com a hipótese inicial proposta por Hoedeman (1952) e é corroborado pelas análises filogenéticas morfológicas conduzidas por Reis (1998) e pelas análises moleculares de Shimabukuro-Dias *et al.* (2004). Embora a monofilia da subfamília Callichthyinae tenha sido corroborada em todas as análises realizadas, as relações observadas entre as espécies desta subfamília diferem, em vários aspectos, dos dados já disponíveis na literatura, desde os morfológicos até os moleculares.

Observando a composição de pares de bases das seqüências dos genes 12S, 16S e ND4, verificou-se que esses genes mitocondriais estudados têm uma composição de bases rica em A. Essa tendência é semelhante à descrita para muitos genes mitocondriais de peixes (Alves-Gomes *et al.*, 1995), lagartos (Reeder, 1995) e serpentes (Parkinson, 1999). Por outro lado, a composição de pares de bases mostra uma tendência anti-G dos genes mitocondriais, mas não dos genes nucleares (Zhang e Hewitt, 1996), como observado em outras espécies de peixes (Murphy *et al.*, 1999; Hrbek *et al.*, 2002). Para o gene nuclear estudado Siah, a composição de pares de bases mostrou-se rica em C e anti-A, como esperado para genes nucleares.

As análises da distância média entre pares de seqüências mostram valores de $d = 0,214 \pm 0,013$ para o gene 12S, de $d = 0,027 \pm 0,004$ para o gene Siah, de $d = 0,163 \pm 0,010$ para 12S e Siah combinados, de $d = 0,243 \pm 0,012$ para os genes 12S, 16S e ND4 combinados e de $d = 0,170 \pm 0,010$ para as seqüências dos gêneros combinadas de 12S e Siah, indicando que os dados devem conter informação filogenética suficiente para o estudo das relações entre as famílias (Nei e Kumar, 2001). Além disso, os resultados das análises das transições e transversões em relação à distância genética indicam a ausência de saturação para todos os genes estudados.

Para o gene nuclear Siah, as filogenias encontradas não foram bem suportadas e as topologias não foram congruentes em nenhum método de análise, sugerindo que, nesse caso, o gene não é recomendado para resolver a filogenia em questão (Figuras 9 e 10). Considerando o pequeno número de nucleotídeos obtidos com os primers disponíveis verificou-se a necessidade de analisar outras regiões desse gene para uma melhor resolução das relações entre as espécies. Calcagnotto *et al.* (2005), também observaram que as seqüências do gene Siah foram pouco úteis na resolução das relações entre os Characiformes.

Serão necessários estudos adicionais para concluir a filogenia com esse gene ou um gene nuclear que possa explicar melhor a história evolutiva da subfamília Callichthyinae.

Na grande maioria das análises filogenéticas foi encontrada uma topologia, em partes, semelhante à obtida por Shimabukuro-Dias *et al.* (2004), que sugere que *Dianema* é o grupo irmão primitivo de todos os outros gêneros de Callichthyinae e *Hoplosternum* é o grupo irmão de *Callichthys*, *Lepthoplosternum* e *Megalechis*. As posições relativas de *Callichthys*, *Lepthoplosternum* e *Megalechis* nas filogenias produzidas no presente estudo estão de acordo com a hipótese de Reis (1998). O posicionamento de *Dianema* e *Hoplosternum* como grupo irmão primitivo de todos os outros callichthíneos vem corroborar a filogenia apresentada por Shimabukuro-Dias *et al.* (2004). O gênero *Callichthys* foi indicado como o mais primitivo por vários autores (Gosline, 1940; Hoedeman, 1952; Ribeiro, 1959) e apareceu como o clado mais primitivo no estudo filogenético conduzido por Reis (1998). Por outro lado, as espécies de *Dianema* seriam as mais diferenciadas entre os callichthíneos tanto morfologicamente quanto comportamentalmente (Reis, 1998). Do mesmo modo, do ponto de vista biogeográfico, *Dianema* não parece ser basal, pois está distribuída somente na Amazônia central, uma região extremamente nova quando comparada à idade estimada dos callichthíneos (Reis, 1998).

Nas análises pelo método de NJ dos genes 12S e Siah (espécies ou os consensos para os gêneros) combinados, *Hoplosternum* e *Dianema* aparecem como grupos irmãos formando um clado monofilético irmão dos outros gêneros da subfamília, podendo, portanto, indicar uma possível relação de parentesco maior entre esses dois gêneros do que com os outros três gêneros de Callichthyinae (Figura 12 e 19). Estudos do conteúdo de DNA nuclear mostraram que *Dianema urostriatum* tem o menor valor observado para a subfamília, $1,18 \pm 0,07$ pg de DNA/núcleo, seguido por *Hoplosternum sp.*, $1,36 \pm 0,11$, e duas amostras de *Callichthys callichthys*, $1,89 \pm 0,24$ e $1,94 \pm 0,15$ (Oliveira *et al.*, 1993). Estes dados reforçam a hipótese de Reis (1998) que *Dianema* e *Hoplosternum* são mais relacionados entre si do que com *Callichthys*. Considerando que na subfamília Corydoradinae há uma tendência para um aumento no conteúdo de DNA entre os gêneros e espécies (Oliveira *et al.*, 1993), as filogenias obtidas no presente estudo também podem sugerir a ocorrência de um aumento no conteúdo de DNA na história evolutiva dos callichthíneos. No entanto, nas análises de ML com os genes 12S e Siah combinados, *Dianema*, *Hoplosternum* e o grupo formado por *Megalechis*, *Lepthoplosternum* e *Callichthys* aparecem como uma politomia (Figura 13) mostrando que os dados não eram suficientes para completa resolução das relações entre esses grupos, utilizando essa metodologia.

Entre os exemplares do gênero *Hoplosternum* estudados, há um exemplar do Rio Orinoco (Venezuela) que, em todas as análises efetuadas apareceu separado, por um alto valor de *bootstrap*, das outras amostras obtidas de vários estados brasileiros (SP, RS e RJ), podendo indicar que essa amostra, encontrada na Venezuela, seja diferente das encontradas no Brasil, mas com a mesma origem. O gênero *Hoplosternum* é distribuído em toda a América do Sul até o norte de Buenos Aires, em ambos os lados dos Andes (Reis, 1997). Alguns autores sugeriram que o gênero *Hoplosternum* possa ter sido introduzido pelo homem em vários estados brasileiros, devido ao fato de esses animais serem muito utilizados por aquaristas e também como iscas vivas para pesca devido a uma grande resistência (Reis, 1998).

A mesma diferença acontece com o exemplar do gênero *Megalechis picta* encontrado também na Venezuela. Em todas as análises, o exemplar foi separado por um alto valor estatístico dos outros exemplares estudados, que possuem procedência da bacia Amazônica. Essa diferença genética também pode representar a ocorrência de uma nova espécie para a bacia do rio Orinoco.

As relações encontradas entre os exemplares de *Megalechis thoracata* das localidades de Colômbia (SP), Itiquira (MT), Rio Branco (AC) e Araguaiana (MT) foram diferentes entre as análises. A espécie encontrada em Araguaiana aparece sempre como espécie irmã do clado onde se encontram as outras espécies de *M. thoracata*. Dentro desse clado monofilético, os exemplares de Itiquira e Colômbia sempre são colocados como espécies irmãs com um alto valor de *bootstrap*; a espécie de Rio Branco (AC) forma um clado irmão com o mesmo. Nas análises de ML para os genes 12S e 12S combinado com Siah, o exemplar de *M. thoracata* de Araguaiana aparece como espécie irmã dos ramos onde surgem as espécies *M. picta* e *L. pectorale* e *M. thoracata*, formando uma politomia (Figuras 7 e 13).

Para as relações entre os gêneros *Megalechis* e *Lepthoplosternum* foram encontrados resultados semelhantes aos obtidos nos estudos moleculares (Shimabukuro-Dias *et al.*, 2004). Pelas análises por NJ com as seqüências dos genes 12S e 12S e Siah combinados (seqüências das espécies e apenas as dos gêneros), *Lepthoplosternum pectorale* forma um grupo irmão do clado que estão as espécies de *Megalechis*, todas com altos valores de *bootstrap*. No entanto, as filogenias obtidas pelos métodos de MP e ML para todos os genes e combinações dos mesmos entre si, colocam as espécies *Lepthoplosternum pectorale* e *Megalechis picta* como um grupo monofilético e este como grupo irmão da espécie *Megalechis thoracata* com alto suporte estatístico.

O clado onde aparecem os gêneros *Lepthoplosternum* e *Megalechis* surge como monofilético e há uma separação entre as espécies de *Lepthoplosternum* pelas análises de NJ e

ML feitas com todos os genes mitocondriais em conjunto (Figura 15 e 17). *L. tordilho* é basal em relação às espécies dos gêneros *Lepthoplosternum* e *Megalechis*; *M. picta* e *M. thoracata* formam um clado irmão do clado que possui *L. pectorale* e *L. altamazonicum*. Na árvore obtida pelo método de máxima parcimônia (Figura 16), *Megalechis* e *Lepthoplosternum* aparecem como um clado monofilético, mas as espécies de *Megalechis* formam um grupo separado do grupo das espécies de *Lepthoplosternum*. E nessa mesma árvore obtida, *L. altamazonicum* é irmã de *L. pectorale* e formam um clado irmão de *L. tordilho*. Ao contrário, Reis e Kaefer (2005) sugerem que a relação existente entre as espécies do gênero *Lepthoplosternum* é a que *L. pectorale* e *L. beni* são espécies irmãs uma da outra formando uma politomia parcialmente não resolvida com *L. ucamara* e *L. stellatum*. *L. tordilho* é irmã dessas quatro espécies e *L. altamazonicum* é a mais basal das espécies. Para esclarecer esse ponto seriam necessários mais estudos com todas as espécies do gênero e mais genes com diferentes taxas de evolução.

A espécie *L. pectorale* é encontrada originalmente na bacia do Rio Paraguai e as outras espécies do gênero são encontradas na bacia Amazônica (Reis e Kaefer, 2005). Segundo Reis *et al.* (2005), o gênero *Megalechis* é encontrado na região trans-Andina, bacia Amazônica e em algumas partes do território brasileiro. A espécie *M. picta* é encontrada no leste dos Andes, no Amazonas, Orinoco, na bacia do Rio Essequibo e em rios da costa do norte do Brasil (Reis *et al.*, 2005). Segundo o mesmo autor, a espécie *M. thoracata* encontra-se também na região trans-Andina, Amazonas, Orinoco, bacia do Rio Paraguai e em rios costeiros das Guianas e norte do Brasil, mas nota-se uma introdução recente no Rio Paraná. A ampla distribuição desses gêneros, sua sobreposição na América do Sul e sua grande similaridade morfológica e molecular indicam que novos estudos devam ser conduzidos para um melhor conhecimento das relações entre os gêneros e espécies de *Lepthoplosternum* e *Megalechis*.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que os genes mitocondriais empregados foram capazes de recuperar, em grande parte, o padrão de relacionamento entre os gêneros de callichthíneos. Entretanto, considerando que o padrão de relacionamento entre os gêneros não foi congruente com aqueles encontrados nos estudos morfológicos e que o relacionamento entre algumas espécies não foi bem resolvido, novas análises, com um número maior de espécies e também com outros genes com diferentes taxas de evolução, deverão ser realizadas a fim de esclarecer as relações ainda não resolvidas nesta subfamília.

Conclusões



6. CONCLUSÕES

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

1. Os dados moleculares corroboram a hipótese de monofilia da subfamília Callichthyinae.
2. Os dados moleculares corroboram a hipótese já existente do gênero *Dianema* ser basal em relação aos outros gêneros de Callichthyinae.
3. Os dados com os genes nucleares e moleculares em conjunto sugerem uma possível maior relação de parentesco entre os gêneros *Hoplosternum* e *Dianema* do que com os outros gêneros da subfamília.
4. Exemplares do gênero *Hoplosternum* encontrados na Venezuela, diferem dos exemplares encontrados nos estados de SP, RJ e RS, indicando uma possível introdução desses animais nesses estados pelo homem.
5. O análises moleculares com o exemplar do gênero *Megalechis picta*, encontrado na Venezuela, indicam uma possível separação entre o mesmo e as espécies encontradas na bacia Amazônica, podendo representar a ocorrência de uma nova espécie para a bacia do Orinoco.
6. As espécies *Megalechis picta* e *Lepthoplosternum pectorale* formam um grupo monofilético e este é grupo irmão da espécie *M. thoracata*.
7. Os dados moleculares sugerem que para as espécies do gênero *Lepthoplosternum*, *L. tordilho* é basal em relação às outras espécies de *Lepthoplosternum* e *Megalechis*; contudo esses gêneros devem ser testados com dados adicionais.
8. Novas análises, com um número maior de espécies e também com outros genes com diferentes taxas de evolução, deverão ser realizadas a fim de esclarecer as relações ainda não resolvidas nesta subfamília.

Referências



Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves-Gomes, J., Ortí, G., Haygood, M., Heiligenberg, W., Meyer, A. (1995). Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Mol. Biol. Evol.*, 12: 298-318.
- Arratia, G., Kapoor, B.G., Chardon, M., Diogo, R. (2003). *Catfishes*. 2 vol., Plymouth: Science Publishers, 844 pp.
- Britto, M.R. (2003). Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysi). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 512 pp.
- Burgess, W.E. (1989). *An Atlas of Freshwater and Marine Catfishes. A Preliminary Survey of Siluriformes*. T.F.H. Publications, Neptune, NJ.
- Calcagnotto, D., Schaefer, S.A., DeSalle, R. (2005). Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 36: 135-153.
- Chubb, A.L. (2004). New nuclear evidence for the oldest divergence among neognath birds: the phylogenetic utility of ZENK (i). *Mol. Biol. Evol.*, 30: 140-151.
- Cibois, A., Cracraft, J. (2004). Assessing the passerine “Tapestry”: phylogenetic relationships of the Muscicapoidea inferred from nuclear DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32: 264-273.
- Delsuc, F., Stanhope, M.J., Douzery, E.J.P. (2003). Molecular systematics of armadillos (Xenartha, Dasypodidae): contribution of maximum likelihood and Bayesian analyses of mitochondrial and nuclear genes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 28: 261-275.
- Diogo, R. (2003). Higher-level phylogeny of Siluriformes – An overview. In: Arratia, G.; Kapoor, B.G.; Chardon, M.; Diogo, R. (Eds.). *Catfishes*. London: Science Publishers, pp.353-384.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Ferraris, C.J. (1998). Catfishes and knifefishes. In: *Encyclopedia of fishes* (Paxton, J.R., Eschmeyer, W.N., eds.). 2a. ed., Academic Press, San Diego, pp. 106-112.

- Fink, S.V., Fink, W.L. (1981). Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). *Zool. J. Linn. Soc. Lond.*, 72: 297-353.
- Fink, S.V., Fink, W.L. (1996). Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). In: Stiassny, M.L.J.; Parenti, L.R.; Johnson, G.D. (Eds). *Interrelationships of fishes*. San Diego: Academic Press, pp.209-49.
- Futuyma, D.J. (1992). *Bilogia Evolutiva*. 2 ed., Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, Ribeirão Preto.
- Gosline, W.A. (1940). A revision of the Neotropical catfishes of the family Callichthyidae. *Stand. Ichth. Bull.*, 2: 1-29.
- Griffiths, C.S., Barrowclough, G.F., Groth, J.G., Mertz, L. (2004). Phylogeny of the Falconidae (Aves): a comparison of the efficacy of morphological, mitochondrial, and nuclear data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32: 101-109.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Seris* 41: 95-98.
- Hasegawa, M., H. Kishino, Yano, T. (1985). Dating of the huma-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial A. *J. Mol. Evol.* 22: 160-174.
- Hoedman, J.J. (1952). Notes on Ichthyology of Surinam (Dutch Guiana). The catfish genera *Hoplosternum* and *Callichthys*, with key to the genera and groups of the family Callichthyidae. *Beaufortia*, 12: 1-11.
- Holcroft, N.I. (2005). A molecular analysis of the interrelationships of tetraodontiform fishes (Acanthomorpha: Tetraodontiformes). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 34: 525-544.
- Hrbek, T., Küçük, F., Frickey, T., Stölting, K.N., Wildekamp, R.H., Meyer, A. (2002). Molecular phylogeny and historical biogeography of the *Aphanius* (Pisces, Cyprinodontiformes) species complex of central Anatolia, Turkey. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 25: 125-137.
- Inoue, J.G., Miya, M., Tsukamoto, K., Nishida, M. (2001). A mitogenetic perspective on the basal teleostean phylogeny: resolving higher-level relationships with longer DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 20: 275-285.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 111-120.

- Kocher, T.D., Stepien, C.A. (1997). *Molecular Systematics of Fishes*. Academic Press, London, U.K.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- Lanave, C., Preparata, G., Saccone, C., Serio, G. (1984). A new method for calculating evolutionary substitution rates. *J. Mol. Evol.* 20:86-93.
- Lavoué, S., Sullivan, J.P., Hopkins, C.D. (2003). Phylogenetic utility of the first two introns of the *S7* ribosomal protein gene in African electric fishes (Mormyroidea: Teleostei) and congruence with other molecular markers. *Biol. J. Linn. Soc.* 78, 273-292.
- Lemmon, A.R., Milinkovitch, M.C. (2002a). MetaPIGA (Phylogenetic Inference using the MetaGA) version 1.0.2b. Distribuído pelos autores. www.ulb.ac.be/sciences/ueg.
- Lemmon, A.R., Milinkovitch, M.C. (2002b). The metapopulation genetic algorithm: an efficient solution for the problem of large phylogeny estimation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10516-10521.
- Lewin, B. (1994). *Genes V*. Oxford University Press Inc., New York, 1272 p.
- Lovejoy, N.R., Collette, B.B. (2001). Phylogenetic relationships of new world needlefishes (Teleostei: Belontiidae) and the biogeography of transitions between marine and freshwater habitats. *Copeia* 2001, 324-338.
- Lydeard, C., Wooten, M.C. e Meyer, A. (1995). Molecules, morphology, and area cladograms: a cladistic and biogeographic analysis of *Gambusia* (Teleostei: Poeciliidae). *Syst. Biol.*, 44: 221-236.
- Misawa, K., Janke, A. (2003). Revisiting the Glires concept-phylogenetic analysis of nuclear sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 320-327.
- Miya, M., Takeshima, H., Endo, H., Ishiguro, N.B. et al. (2003). Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26: 121-138.
- Murphy, W.J., Collier, G.E. (1997). A molecular phylogeny for Aplocheiloid fishes (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): the role of vicariance and the origins of annualism. *Mol. Biol. Evol.*, 14: 790-799.

- Murphy, W.J., Thomerson, J.E., Collier, G.E. (1999). Phylogeny of the neotropical killifish family Rivulidae (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 13: 289-301.
- Near, T.J., Bolnick, D.I., Wainwright, P.C. (2004). Investigating phylogenetic relationships of sunfishes and black basses (Actinopterygii: Centrarchidae) using DNA sequences from mitochondrial and nuclear genes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32: 344-357.
- Nei, M., Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York, USA.
- Nelson, J.S. (1994). *Fishes of the world*. 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Oliveira, C., Almeida-Toledo, L.F., Mori, L. Toledo –Filho, S.A. (1993). Cytogenetic and DNA content in six genera of the family Callichthyidae (Pisces, Siluriformes). *Caryologia*, 46: 171-188.
- Orti, G., Meyer, A. (1996). Molecular evolution of ependymin and the phylogenetic resolution of early divergences among euteleost fishes. *Mol. Biol. Evol.*, 13: 556-573.
- Ortí, G. (1997). Radiation of characiform fishes: evidence from mitochondrial and nuclear DNA sequences. In: *Molecular Systematics of Fishes*. (Kocher, T.D. e Stepien, C.A., eds). Academic Press, London, U.K., pp. 1-11.
- Page, R.D.M. (2001). Component. ver. 2.0. Tree comparison software for Microsoft Windows. Distribuído pelo autor.
- Palumbi, S., Martin, A. Romano, W.O., Stice, L., Grabowski, G. (1991). *The simple fool's guide do PCR*. version 2.0. University of Hawaii, Honolulu.
- Parkinson, C.L. (1999). Molecular systematics and biogeographical history of pitvipers as determined by mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Copeia*, 576-586.
- de Pinna, M.C.C. (1998). Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. IN: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S., eds). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, 279-330 pp.
- Posada, D., Crandall, K.A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.

- Reeder, T.W. (1995). Phylogenetic relationships among phrynosomatid lizards as inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences: substitutional bias and information content of transitions relative to transversions. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 4: 203-222.
- Reis, R.E. (1997). Revision of the neotropical catfish genus *Hoplosternum* (Ostariophysi: Siluriformes: Callichthyidae), with the description of two new genera and three new species. *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, Vol 7, 4: 299-326.
- Reis, R.E. (1998). Anatomy and phylogenetic analysis of the neotropical callichthyid catfishes (Ostariophysi, Siluriformes). *Zool. J. Linn. Soc.* 124, 105-168.
- Reis, R.E. (2003). Família Callichthyidae. In: Check list of the freshwater fishes of South America, eds.: Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris Jr., C.J. Porto Alegre: Edipucrs, pp. 291-309.
- Reis, R.E., Le Bail, P.-Y., Mol, J.H.A.(2005). New arrangement in the synonymy of *Megalechis* Reis, 1997 (Siluriformes: Callichthyidae). *Copeia* (3) 678-682.
- Reis, R.E., Kaefer, C.C.(2005). Two new species of the Neotropical catfish genus *Lepthoplosternum* (Ostariophysi: Siluriformes: Callichthyidae). *Copeia* (4) 724-731.
- Ribeiro, P.M. (1959). Considerações sobre Callichthyidae Gill, 1872 (Nematognathi). *Boletim Mus. Nacional* 206, 1-9.
- Sambrook, J., Russel, D.W. (2001). *Molecular cloning a laboratory manual*. 3^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- San Mauro, D., Gower, D.J., Oommen, O.V., Wilkinson, M., Zardoya, R. (2004). Phylogeny of caecilian amphibians (Gymnophiona) based on complete mitochondrial genomes and nuclear RAG1. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33: 413-427.
- Savage, J.M. (1995). Systematics and the biodiversity crisis. *BioScience*, 45: 673-679.
- Schaefer, S.A. (1998). Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). IN: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S., eds). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, pp. 375-400.
- Shimabukuro-Dias, C.K., Oliveira, C., Reis, R.E., Foresti, F. (2004). Molecular phylogeny of the armored catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32 (1): 152-163.
- Slowinski, J.B., Lawson, R. (2002). Snake phylogeny: evidence from nuclear and mitochondrial genes. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 194-202.

- Spinks, P.Q., Shaffer, H.B., Iverson, J.B., McCord, W.P. (2004). Phylogenetic hypotheses for the turtle family Geoemydidae. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32: 164-182.
- Steiner, C., Tilak, M., Douzery, E. J.P., Catzeflis, F.M. (2005). New DNA data from a transthyretin nuclear intron suggest an Oligocene to Miocene diversification of living South America opossums (Marsupialia: Didelphidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 35: 363-379.
- Stock, D.W., Gibbons, J.K., Whitt, G.S. (1991). Strengths and limitations of molecular sequences comparisons for inferring the phylogeny of the major groups of fishes. *J. Fish Biol.*, 39: 225-236.
- Swofford, D.L. (2002). PAUP* - Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J., Hillis, D.M. (1996). Phylogenetic inference. IN: *Molecular Systematics*. (Hillis, D.M, Moritz, C., Mable, B.K., eds). Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, USA, 407-514 pp.
- Tamura, K., Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA human and chimpanzees. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 9: 814-825.
- Teeling, E.C., Madsen, O., Murphy, W.J., Springer, M.S., O'Brien, S.J. (2003). Nuclear gene sequences confirm an ancient link between New Zealand's short-tailed bat and South American noctilionoid bats. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 308-319.
- Teugels, G.G. (1996). Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei); an overview. *Aquat. Living Resour.*, 9: 9-34.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22:4673-4680
- Vari, R.P., Malabarba, L.R. (1998). Neotropical Ichthyology: an overview. IN: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S., eds). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, 1-11 pp.
- Xia, X., Xie, Z. (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity* 92, 371-373.
- Zhang, D.-X., Hewitt, G.M. (1996). Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends Ecol. Evol.*, 11: 247-251.