

Vania Quibao Pretti

**Relações Filogenéticas no gênero *Acestrorhynchus*
(Teleostei, Characiformes) com base na análise de
genes nucleares e mitocondriais.**

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Biologia/ Genética.

Orientadora:
Profa Dra Lurdes F. de Almeida-Toledo

São Paulo
2007

Ficha Catalográfica

Pretti, Vania Quibao

Relações filogenéticas no gênero
Acestrorhynchus (Teleostei, Characiformes) com
base na análise de genes nucleares e mitocondriais

2007

63 páginas

Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo – Departamento de
Genética e Biologia Evolutiva

1. *Acestrorhynchus*
2. filogenia molecular
3. genes nucleares e mitocondriais

Comissão Julgadora

Prof. (a) Dr (a)

Prof. (a) Dr (a)

Prof. (a) Dr (a)

Prof. (a) Dr (a)

Profa Dra Lurdes Foresti de Almeida-Toledo

Orientadora

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas e instituições que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho e para minha formação durante esses três anos, em especial:

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida, à FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro ao LIUSP, e ao departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IB-USP pelo apoio financeiro nos congressos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Lurdes Foresti de Almeida Toledo, pela confiança em mim depositada durante a realização deste projeto, e por seu exemplo de tratamento e atenção com todos os seus alunos, estando sempre disposta a nos atender e orientar a qualquer hora.

À minha co-orientadora e “chefe”, a Dra. Daniela Calcagnotto, por sua grande paciência e dedicação em tempo integral para realização deste trabalho, desde o “B+A=BA” da bancada até as análises e discussão, pelos milhares de telefonemas atenciosamente atendidos, e por seu exemplo de como fazer coisas difíceis de uma maneira simples e eficiente.

À minha co-orientadora para assuntos de taxonomia e outras coisinhas mais, a Profa. Dra. Mônica Toledo Piza Ragazzo, por estar sempre pronta para me orientar durante todas as etapas deste projeto, por sua grande ajuda nas preparações das viagens de coletas, por seu exemplo de organização e clareza ao expor suas idéias científicas.

Agradeço por ter a grande sorte de desenvolver um projeto com três pessoas desse gabarito atuando em parceria. Cada uma delas a sua maneira, foi fundamental para realização desse trabalho e para minha formação acadêmica e pessoal. Isso deveria ser a regra!

Ao nosso querido técnico e amigo Carlos Eduardo Lopez. Não posso imaginar o LIUSP sem ele! Agradeço todo o apoio no dia a dia do laboratório e nas coletas, em especial na coleta dos *Raphiodon* na usina de Jupiá, aquela sim podemos chamar de uma coleta com emoção!

A todos os amigos do Laboratório de Ictiogenética, aos da velha-guarda Dra Fátima Daniel, Dra Flora Campos Fernandes e Dra Soraia Barreto Aguiar obrigada a todas pela forma carinhosa com que me receberam, e em especial a Dra Cinthia Móises, a Ms.Sabrina Baroni e Msa Riviane Garcez pelas “ajudinhas” com a dissertação.

Aos novos integrantes do Laboratório, Karina Brandão, Raquel Maria Rodrigues, Keila C. de Oliveira e em especial Marilena Peixoto e Caroline Garcia pela convivência divertida e animada no laboratório.

Ao amigo Felipe Claro Lourenço por toda a ajuda computacional nos inúmeros “paus” que eu sempre fazia dar no PC, e por me socorrer em muitas outras coisas.

Ao amigo Frederico Henning, pela ajuda na clonagem, nas traduções, pelas discussões filosóficas, ajudas computacionais e na construção dos mapas, enfim pela nossa convivência agradável durante o mestrado.

Aos amigos de departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Marta Cánovas, Marcos Bissaro, Max Hernani e Fábio Pinheiro (Calipão).

Aos amigos da Zoologia George Matox e em especial José Manuel Iglesias.

Ao Dr.Luis Paulo Andreoli, por todos os “sedex” que eficientemente encaminhou durante este mestrado e por ter sido paciente quando eu abusava do seu horário.

À Carmem e Jô por todos os nossos telefonemas.

Aos professores do departamento de Genética e Biologia Evolutiva, em especial à Dra. Denise Selivon, Dra. Lyria Mory, Dra. Anita Wajntal, Dra. Cristina Miyaki, Dr. Sérgio Russo Matiolli, Dra. Célia P. Koiffmann, Dr. Gabriel Marroig, Dr. Diogo Meyer. Dr. Luis Eduardo Soares Netto e Dra Maria Cristina Arias.

Ao amigo e Professor, Dr. Carlos Ribeiro Vilela, por me ensinar inúmeras coisas extra curriculares, inúmeras palavras do português arcaico, sempre me socorrer com minhas dúvidas, principalmente com as citações impossíveis, enfim por tornar a convivência no departamento muito mais divertida.

Aos funcionários do departamento de Genética e Biologia Evolutiva da USP, D. Neide, Elenice, Deisy, Neide, Susy, D. Luzia e D. Genoveva.

Aos motoristas e funcionários do Instituto de Biociências, em especial ao motorista Israel por toda ajuda nas coletas. Ao Eduardo e ao Leandro das finanças por sempre me socorrerem com as burocracias. Ao Helder e a Érica da secretaria de Pós-Graduação por sempre me atenderem de forma tão prestativa.

Aos professores do Museu de Zoologia da USP, Dr. Naércio Aquino Menezes, Dr. Oswaldo T. Oyakawa e Dr. Mário de Pinna e aos amigos José Luis Birindelli, Carine Chamon, Ilana Fichberg e Júlia Klasco.

Ao Dr. Flávio Lima, do MZUSP por gentilmente coletar e ceder exemplares de *Acestrorhynchus* para este trabalho.

À amiga e “pop star” Janice Muriel Cunha, pelas amostras de *Acestrorhynchus*, coletadas na Ilha de Marajó e no rio Madeira, pela ajuda nas análises e principalmente pela companhia agradável e divertida em minhas idas ao museu.

À amiga Ana Cristina Bondioli, pela ajuda com alguns programas, pela amizade, por nossas divertidas hospedagens pelo Brasil e viagens “internacionais”.

Ao professor Dr. Cláudio Oliveira do Instituto de Biociências de Botucatu, por todas as amostras de *Acestrorhynchus* gentilmente fornecidas para este trabalho.

Ao Professor Dr. Fábio Porto Foresti e aos amigos Diogo Hashimoto e Tatiana Voltolin do Laboratório de genética de peixes da UNESP de Bauru.

Aos funcionários da CODEVASF, por todo apoio fornecido durante a coleta dos exemplares de *Acestrorhynchus*, do rio São Francisco, em especial ao Dr. Yoshimi Sato pela forma atenciosa como me recebeu.

Aos funcionários e motoristas do INPA, pela ajuda nas coletas dos exemplares de *Acestrorhynchus* do rio Negro.

À Cristina Ropke e Rafael Arruda, alunos de pós-graduação do INPA, pela companhia na viagem a Silves, por toda ajuda na coleta dos exemplares de *Acestrorhynchus* daquela região.

Ao Dr. Alberto Akama, integrante do MZUSP e do INPA, por sua fundamental ajuda nas coletas dos exemplares na Amazônia, pela identificação dos exemplares, pela ótima hospedagem, e por toda atenção dedicada a mim em Manaus. Também agradeço a sua esposa Bia e ao adorável Fernandinho pela hospedagem muito agradável.

À professora Dra Lúcia Helena Rapp Py-Daniel do INPA pela participação nas coletas em Manaus.

Ao professor Jansen Zuanon, por toda atenção no INPA, pela coleta de tecido de *Acestrorhynchus minimus* e por gentilmente fornecer a foto do *Acestrorhynchus minimus* vivo, utilizada nessa dissertação.

À Gislene Torrente Vilara, da UNIR pelas amostras de tecido de *Acestrorhynchus* gentilmente cedidas.

Ao Professor Doutor Fernando Marques do departamento de Zoologia da USP, pela ajuda nas análises do POY.

Aos amigos e integrantes do CRUSP 311C, Raí e Fabí, pelas pizzas horríveis que dividimos juntos durante nossas madrugadas de conversas e risadas sobre a Pós-Graduação.

À Maria Rosa, por todas as comidinhas que carinhosamente enviou por sedex.

Aos meus queridos irmãos Vivian e Vitor, por nossas guargalhadas..... e é claro pelo empréstimo de seus queridos computadores.

Ao meu irmão Vinícius e sua esposa Aline.

Ao meu namorado Helbert, por seu cuidado e carinho, pelos nossos muitos finais de semana no departamento, enfim por todo seu companheirismo durante o desenvolvimento desse mestrado.

Aos meus queridos pais Maria Ermínia e Antonio Vicente, que não medem esforços para me ajudar, por seus inúmeros auxílios paipesp concedidos, enfim por todo amor e apoio tornando tudo mais fácil para mim.

Índice

Resumo	I
Abstract	II
1-INTRODUÇÃO	01
1.1-A ordem Characiformes.....	01
1.2-Classificações do gênero <i>Acestrorhynchus</i> dentro dos Characiformes.....	04
1.3-O gênero <i>Acestrorhynchus</i>	07
1.4-Sistemática molecular como ferramenta.....	19
1.4.1-Homologia.....	21
1.4.2-Marcadores moleculares.....	21
1.4.3-Cladística.....	22
1.4.4-Parcimônia.....	23
1.4.5-Valores de suporte.....	24
1.4.5.1-Valores de <i>bootstrap</i>	24
1.4.5.2-Valores do suporte de Bremer.....	25
1.4.5.3-Valores do suporte particionado de Bremer.....	25
1.4.6-Divergência nucleotídica.....	26
2-OBJETIVOS	28
3- MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1-Táxons examinados.....	29
3.1.1-Grupo interno.....	29
3.1.2-Grupo externo.....	29
3.2-Extração do DNA total.....	30
3.3-Amplificação e seqüenciamento.....	30
3.4-Análise das seqüências.....	33
3.5-Reconstrução filogenética.....	34
3.6-Divergências entre seqüências.....	34

4-RESULTADOS	
4.1-Topologia da árvore.....	35
4.2-Estatística da árvore e suporte dos nós.....	37
4.3-Topologia dos cladogramas.....	38
4.4-Análises independentes.....	39
4.5-Comparação entre seqüências.....	40
5-DISSCUSSÃO	44
5.1-Análise simultânea dos dados moleculares.....	45
5.2-Comparação entre as topologias moleculares e morfológicas.....	46
5.2.1-Pontos corroborados.....	46
5.2.2-Divergências encontradas.....	47
5.3-Padrões de coloração.....	49
5.4-O grupo <i>lacustris</i>	50
5.5- <i>Acestrorhynchus falcatus</i>	51
5.6-Eventos de diminuição do tamanho corporal.....	52
5.7- <i>Acestrorhynchus abbreviatus</i>	53
6-CONCLUSÕES	55
7-BIBLIOGRAFIA	57
8-ANEXOS	62

Resumo

O gênero *Acestrorhynchus* encontra-se amplamente distribuído na América do Sul, estando presente nas bacias do Paraná-Paraguai, Uruguai, no rio São Francisco, nos rios costeiros das Guianas, e nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco, sendo as duas últimas, o local onde se encontra a maior diversidade desses peixes. Na ausência de estudos mais detalhados sobre as relações filogenéticas entre as espécies de *Acestrorhynchus*, as 14 espécies reconhecidas têm sido agrupadas com base no seu padrão de coloração. O primeiro trabalho focalizando as relações filogenéticas das espécies de *Acestrorhynchus*, foi desenvolvido recentemente e estabelece as relações de parentesco de 13 espécies do gênero com base na análise de 104 características osteológicas e de morfologia externa. No presente estudo, 2139 pares da região 16S e da ATPase, ambos do genoma mitocondrial, juntamente o primeiro íntron da proteína ribossomal S7 do genoma nuclear, foram analisados para as espécies *A. microlepis*, *A. falcatus*, *A. heterolepis*, *A. pantaneiro*, *A. falcistrotris*, *A. altus*, *A. minimus*, *A. grandoculis*, *A. britskii*, *A. lacustris* e *A. nasutus*. Os gêneros *Roeboides*, *Rhaphiodon* e *Gephyrocharax* foram utilizados como grupo externo. A análise de máxima parcimônia, com busca heurística e adição aleatória de seqüências com o algoritmo TBR resultou na obtenção de uma árvore mais parcimoniosa com 2.551 passos. Os índices de consistência e retenção foram, respectivamente, 0,633 e 0,533. Os resultados obtidos através da análise dos dados moleculares corroboram, assim como os resultados morfológicos, o monofiletismo dos agrupamentos propostos com base nos padrões de coloração.

Abstract

Fishes of the Neotropical characiform genus *Acestrorhynchus* Eigenmann, comprise freshwater species widely distributed throughout South American rivers, being found in the Paraná, Paraguai, Uruguai, São Francisco and of Guyana rivers. However it is in the Amazonas and Orinoco river basins where the highest diversity of this group of fishes is present. In the absence of more detailed phylogenetic studies the 14 recognized species are grouped on the basis of their color patterns. The first specific study about the phylogenetic relationships of *Acestrorhynchus* species, was recently developed and it established the relationships of 13 species of the genus, based in the analysis of 104 osteological and external morphological characters. In the present study, simultaneous analysis of 2139 aligned base pairs from the mitochondrial 16S and ATPase and the nuclear first intron of the S7 ribosomal protein were analyzed for the species *A. microlepis*, *A. falcatus*, *A. heterolepis*, *A. pantaneiro*, *A. falcistrostris*, *A. altus*, *A. minimus*, *A. grandoculis*, *A. britskii*, *A. lacustris* e *A. nasutus*. The genera *Roeboides*, *Rhaphiodon* and *Gephyrocharax* were included in the analysis as outgroups. Maximum parsimony analysis, and heuristic searches with random taxon addition replicates and TBR branch swapping were performed resulting in one most parsimonious tree with 2,551 steps in length. The consistence index and retention index were 0,633 and 0,533, respectively. The results revealed with molecular data as well as the ones obtained with morphological characters corroborate, the monophyly of the genus and the grouping proposed based in the color pattern.

1-Introdução

Os peixes exibem uma enorme diversidade em sua morfologia, no habitat que ocupam e na sua biologia (NELSON, 2006) e é essa grande diversidade que faz desse grupo um objeto ideal para estudos evolutivos e de sistemática. A diversidade morfológica da fauna Neotropical de peixes de água doce é considerada a maior entre todas as faunas de peixes epicontinentais do planeta. Existem atualmente, descritas, 4.475 espécies de peixes de água doce das Américas do Sul e Central e estima-se que esse número ultrapasse 6.000 espécies (REIS, KULLANDER e FERRARIS, 2003). Os peixes de água doce neotropicais, mais especificamente os sul americanos, pertencem, em sua maioria, a um dos cinco grupos: Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Ciclídeos (LUNDBERG et al. 2000).

1.1- A Ordem Characiformes

Os Characiformes detêm uma das maiores diversidades entre os peixes de água doce (NELSON, 2006) e apresentam uma vasta especialização trófica, abrangendo animais detritívoros, herbívoros, planctívoros, predadores lepdófagos (aqueles que se alimentam de escamas) e carnívoros vorazes, como as piranhas.

Além das notáveis adaptações morfológicas e fisiológicas, os Characiformes apresentam grandes variações de tamanho, existindo peixes que podem chegar a 1,30 m de comprimento e pesar até 38 Kg como espécies do gênero africano *Hydrocynus* (Characiformes, Alestidae) (GÉRY, 1977) e outros que passaram por

um processo de miniaturização, não ultrapassando 26 mm quando adultos, como por exemplo algumas espécies da família Characidae (WEITZMAN e VARI,1988).

Os peixes dessa ordem encontram-se amplamente distribuídos pela América do Sul e também pelo continente africano. Os primeiros estudos feitos sobre as relações filogenéticas entre os Characiformes foram baseados em dados morfológicos superficiais como características do crânio, da dentição e da morfologia externa desses animais e tiveram origem no final do século XIX até meados de século XX (VARI, 1998); desde então muitos estudos filogenéticos envolvendo os mais diferentes níveis dentro de Characiformes vêm sendo realizados.

Os Characiformes podem ser divididos atualmente em 18 famílias (LOWE-McCONNELL, 1975), 16 famílias (GREENWOOD et al. 1966) ou 14 famílias (GÉRY, 1977) dependendo principalmente de como cada autor considera a família Characidae. Considerando-se a classificação mais adotada, essa ordem encontra-se dividida em 18 famílias (LOWE-McCONNELL, 1975; NELSON, 2006) e aproximadamente 1668 espécies, sendo que destas, a grande maioria, 1465 espécies de 14 famílias, encontra-se no continente americano e 209 espécies representando 4 famílias são encontradas no continente africano (BUCKUP, 1998).

Devido à grande diversidade apresentada pela ordem Characiformes, o estabelecimento de suas relações filogenéticas nos mais diferentes níveis taxonômicos é uma tarefa consideravelmente difícil. Torna-se necessário para tanto que uma grande quantidade de caracteres seja analisada, mas muitas vezes a quantidade de caracteres morfológicos disponíveis para análise mostra-se insuficiente. Sendo assim a utilização de dados moleculares, para auxiliar na elucidação destas filogenias tem se tornado uma ferramenta importante. O primeiro estudo molecular para a ordem dos Characiformes foi realizado por Ortí e Meyer (1997), no qual os autores examinaram as seqüências parciais dos genes

mitocondriais 12S e 16S, para 38 taxons, com o intuito de testar hipóteses prévias das relações filogenéticas entre suprafamílias dessa ordem. Esse estudo, embora tenha apresentado saturação na substituição de nucleotídeos para análises taxonômicas desse nível, forneceu suporte para alguns clados bem reconhecidos taxonomicamente e também propôs pela primeira vez hipóteses de relacionamento entre alguns táxons de Characiformes como, por exemplo, *Acestrorhynchus* sendo grupo irmão do clado formado pela família africana Alestidae.

Já em 2005, Calcagnotto, Schaefer e DeSalle estabelecem as relações filogenéticas entre as famílias da ordem Characiformes, com base na análise simultânea de 3660 pares de bases, dos genes mitocondriais 16S e citocromo *b*, e dos genes nucleares *seven in absentia* (*sia*), ativador da recombinação (*RAG2*), *forkhead* (*fhk*) e o intron 5 do gene que codifica para a tropomiosina (*trop*). Para esta análise filogenética os autores utilizaram 124 espécimes do grupo interno e 11 espécimes do grupo externo.

Um aspecto interessante dos estudos realizados para esta ordem de peixes é que as famílias de Characiformes do continente americano e aquelas encontradas no continente africano não formam dois grupos monofiléticos distintos. Esse fato evidencia que o grupo apresenta uma história biogeográfica bastante antiga, tendo se originado antes do início da separação de Gondwana (LUNDBERG, 1998).

Atualmente sabe-se que um único evento vicariante não explica a atual distribuição dos Characiformes nos continentes africano e sul americano. Tendo em vista a escassez de fósseis que documentam a diversificação do grupo pré-separação dos continentes é necessário buscar outras hipóteses para explicar o não monofiletismo das duas grandes linhagens geográficas.

1.2- Classificações do Gênero *Acestrorhynchus* Dentro dos Characiformes

O gênero *Acestrorhynchus*, foi inicialmente proposto dentro da tribo Acestrorhynchini (subfamília Characinae) por Menezes (1969), a qual reunia então *Acestrorhynchus*, *Paroligosasarcus* e *Oligossarcus*. No entanto, Menezes e Géry (1983) sugeriram que este táxon Acestrorhynchini poderia não ser monofilético.

Mais recentemente, Lucena e Menezes (1998) baseados em dados morfológicos, propuseram que o gênero *Acestrorhynchus* deveria ser excluído da família Characidae e apresentaram uma nova hipótese para as relações desse gênero dentro de Characiformes. Nessa nova classificação, o gênero *Acestrorhynchus* é proposto em uma família própria denominada Acestrorhynchidae, composta por este único gênero. Segundo a mesma hipótese, a família Acestrorhynchidae formaria um grupo monofilético tendo como grupo irmão a família Cynodontidae (Figura 1).

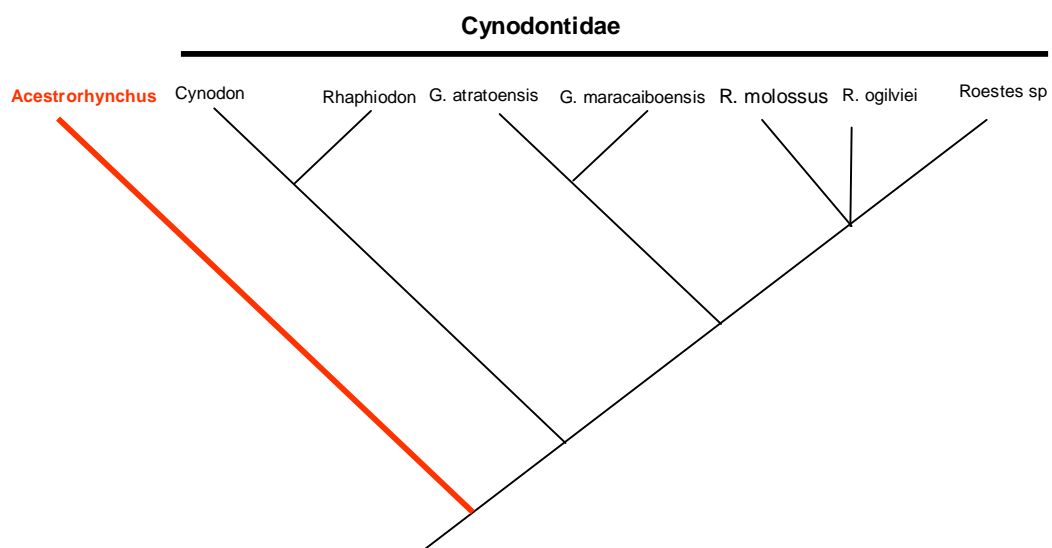


Figura 1- Relações filogenéticas de *Acestrorhynchus* (família Acestrorhynchidae) com a família Cynodontidae. Modificado de Lucena e Menezes, 1998.

Em sua hipótese baseada em caracteres morfológicos Buckup (1998) estabelece as relações para as famílias de Characiformes sendo atualmente a hipótese mais adotada. Embora tendo encontrado resultados diferentes dos de Lucena e Menezes (1998) quanto às relações do gênero *Acestrorhynchus*, o autor prefere adotar a hipótese daqueles autores para fins de classificação, uma vez que o foco neste trabalho eram as relações de Characidiinae e não as interações de Acestrorhynchidae.

Conforme dito anteriormente na filogenia molecular de Ortí e Meyer (1997) o gênero *Acestrorhynchus* é proposto como grupo irmão da família africana Alestidae (Figura 2).

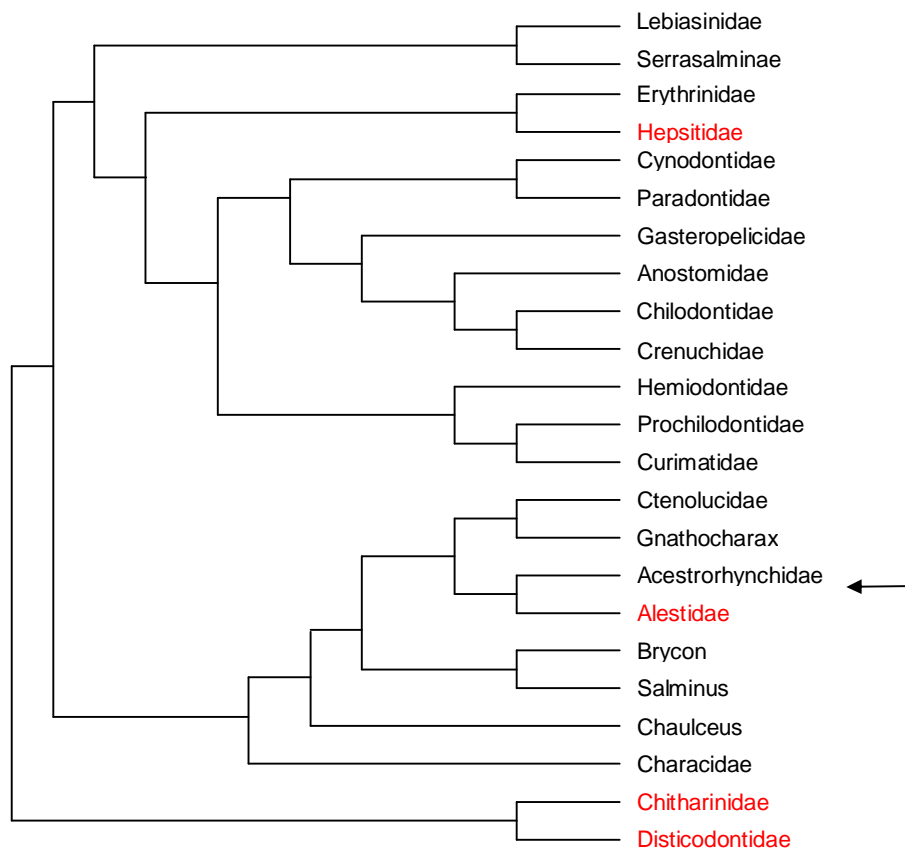


Figura 2 – Filogenia molecular de Characiformes com base na análise dos genes mitocondriais 12S e 16S. Destaque em vermelho para as famílias africanas (modificado de ORTÍ e MEYER, 1997).

No trabalho sobre as relações filogenéticas de Characiformes feito com base em dados moleculares por Calcagnotto, Schaefer e DeSalle (2005) apresentou um resultado interessante quanto ao posicionamento do gênero *Acestrorhynchus*. Segundo esta hipótese *Acestrorhynchus* é proposto como grupo irmão de *Bryconops*, ocupando uma posição basal dentro da família Characidae o que contraria a hipótese morfológica de Lucena e Menezes (1998) (Figura 3).

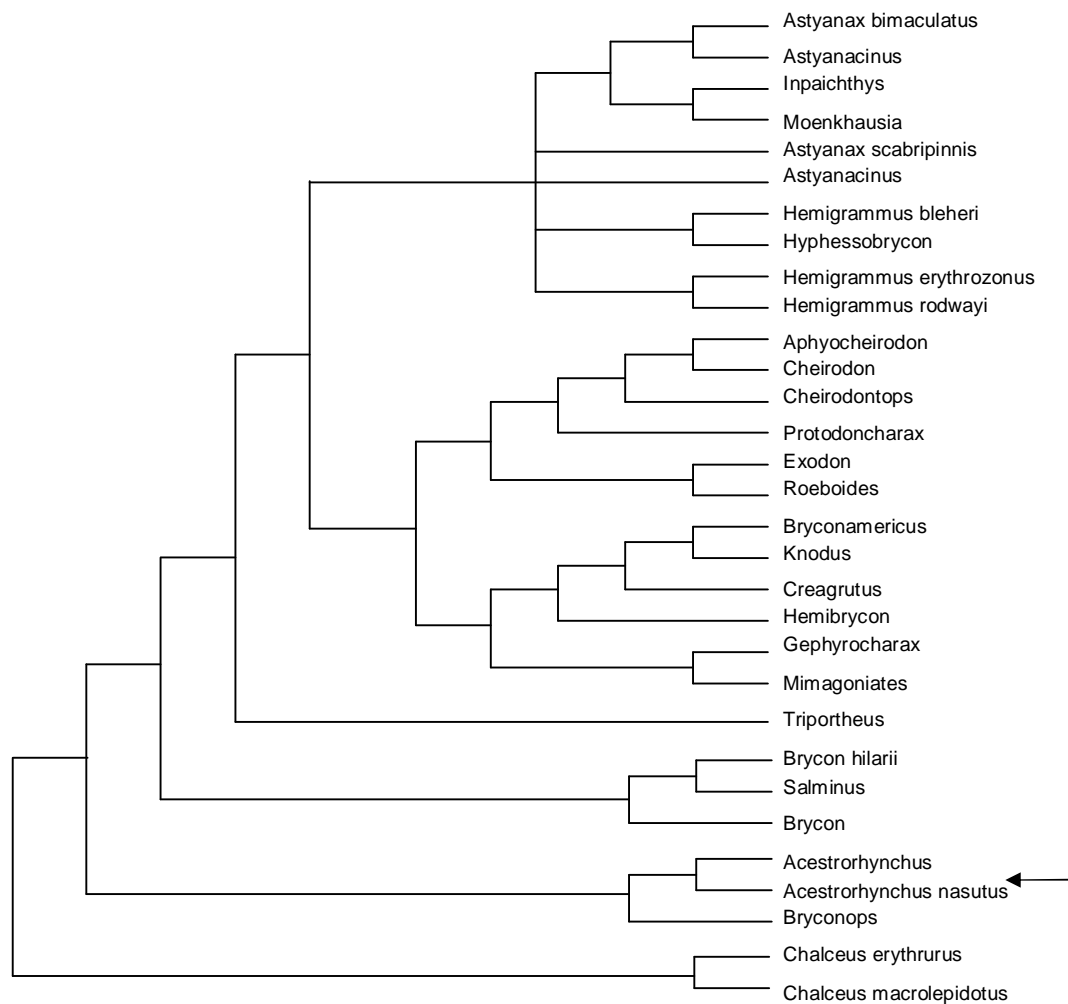


Figura 3- Filogenia molecular de Characidae com bases nos genes mitocondriais 16S e citocromo *b*, e dos genes nucleares gene ativador da recombinação (RAG2), *seven in absentia* (*sia*), *forkhead* (*fkh*) e tropomiosina (*trop*) (modificado de CALCAGNOTTO, SCHAEFER e DeSALLE, 2005).

Embora a questão das relações filogenéticas de *Acestrorhynchus* com os demais Characiformes ainda não esteja completamente resolvida, a hipótese de monofiletismo do gênero parece ser bem corroborada (MENEZES, 1969; MENEZES e GÉRY, 1983; LUCENA e MENEZES, 1998; TOLEDO-PIZA, no prelo).

1.3- O Gênero *Acestrorhynchus*

O gênero *Acestrorhynchus* Eigenmann e Kennedy, é atualmente o único incluído na família denominada Acestrorhynchidae, uma das 18 famílias da ordem Characiformes (Figura 4) (MENEZES, 2003). O gênero *Acestrorhynchus* é considerado um grupo monofilético com base em vários caracteres morfológicos (MENEZES, 1969; MENEZES e GERY, 1983; TOLEDO-PIZA, no prelo).



Figura 4- Exemplar de *Acestrorhynchus*

(cortesia: E. Ferreira e J. Zuanon)

Existem atualmente 19 espécies nominais incluídas no gênero *Acestrorhynchus*, das quais 14 são consideradas válidas: *A. abbreviatus*, *A. altus*, *A. britskii*, *A. falcatus*, *A. falcistrostris*, *A. grandoculis*, *A. heterolepis*, *A. isalineae*, *A. lacustris*, *A. maculipinna*, *A. microlepis*, *A. minimus*, *A. nasutus* e *A. pantaneiro* (MENEZES, 2003; LÓPEZ-FERNÁNDEZ e WINEMILLER, 2003; TOLEDO-PIZA e MENEZES, 1996).

As 14 espécies de *Acestrorhynchus* encontram-se amplamente distribuídas na América do Sul (Figura 5). Onze delas estão distribuídas na região amazônica sendo que *A. falcatus*, *A. microlepis* e *A. falcistrostris* são amplamente distribuídas nesta região. *A. grandoculis*, *A. minimus*, *A. heterolepis* e *A. altus* tem distribuição mais restrita e *A. isalineae* e *A. maculipinna* são conhecidas somente em suas localidades-tipo, 110km a leste do Humaitá, ao longo da rodovia Transamazônica (AM) e Rio Preto da Eva (AM), respectivamente (MENEZES, 1969; MENEZES e GÉRY, 1983; TOLEDO-PIZA e MENEZES, 1996). Outras duas espécies são descritas na bacia do rio São Francisco, *A. britskii* e *A. lacustris* (MENEZES, 1969) (Figura 5). Para as bacias dos rios Paraguai e Uruguai existe somente uma espécie descrita *A. pantaneiro* (MENEZES, 1992).

As espécies de *Acestrorhynchus* variam de pequeno a médio porte, sendo raramente encontrados exemplares com mais de 40 cm (MAGO-LECCIA, 1970). Uma característica interessante é a variação no tamanho médio das espécies que compõe o gênero *Acestrorhynchus* sendo *A. heterolepis*, a maior dentre elas com exemplares que chegam em média a 33 cm de comprimento, e *A. minimus*, a menor espécie com exemplares que geralmente não ultrapassam 10 cm de comprimento (TOLEDO-PIZA, no prelo).

Esses animais habitam principalmente regiões de água lenta como lagoas e margens de rios (BRITSKI, SATO e ROSA, 1984), sendo predadores principalmente de outros peixes (MENEZES, 1969).



Figura 5- Distribuição geográfica das espécies do gênero *Acestorhynchus*. Em rosa distribuição das espécies *A. falcatus*, *A. microlepis*, *A. falcistrotris*, *A. grandoculis*, *A. minimus*, *A. heterolepis*, *A. altus*, *A. isalineae*, *A. maculipinna*. Em amarelo distribuição das espécies *A. lacustris* e *A. britskii*. Em azul distribuição da espécie *A. pantaneiro*

A primeira espécie descrita no gênero foi *Acestrorhynchus falcatus* (BLOCH, 1794); (MENEZES, 1969). Menezes (1969) realizou a primeira revisão sistemática do gênero e reconheceu oito espécies *A. falcatus* (com duas subespécies *A. f. falcatus* e *A. f. varius*), *A. lacustris*, *A. altus*, *A. britskii*, *A. microlepis*, *A. guianensis*, *A. nasutus* e *A. heterolepis*, das quais *A. altus*, *A. britskii* e *A. guianensis* foram descritas como novas.

Posteriormente, Menezes e Géry (1983) descreveram três novas espécies: *A. isalineae*, *A. maculipinna* e *A. grandoculis*, todas de pequeno porte. Os autores também apresentaram uma chave de identificação incluindo as novas espécies do gênero, sendo que esta agrupava as espécies com base principalmente no padrão de coloração.

O exame dos exemplares coletados entre 1970 e 1990 levou Menezes (1992) a reavaliar os caracteres diagnósticos das espécies de *Acestrorhynchus* com mancha umeral arredondada incluídas no grupo *lacustris*: *A. altus* e *A. lacustris* foram redefinidas, uma nova espécie *A. pantaneiro* foi descrita, e a espécie *A. abbreviatus* foi reconsiderada uma espécie válida.

Toledo-Piza e Menezes (1996) redefiniram o grupo *microlepis*, descreveram uma nova espécie para gênero *Acestrorhynchus*, *A. apurensis* e consideraram *A. guianensis* como sinônimo de *A. microlepis*. Novamente uma chave de identificação para as espécies do gênero *Acestrorhynchus* também foi proposta pelos autores deste trabalho, com base principalmente em diferenças no padrão de coloração. Desde então as espécies de *Acestrorhynchus* têm sido reunidas em grupos definidos de acordo com suas características de coloração.

O grupo *lacustris*, que inclui, *A. lacustris*, *A. abbreviatus*, *A. altus* e *A. pantaneiro*, é caracterizado pela presença de uma mancha umeral arredondada (Figura 6).

O grupo *microlepis*, inclui *A. microlepis* e *A. grandoculis* que se caracterizam por possuir uma pequena mancha escura no corpo, imediatamente posterior ao opérculo (Figura 7).

O grupo *nasutus* caracteriza-se pela presença de duas bandas longitudinais estreitas e escuras, ao longo do corpo e inclui *A. nasutus*, *A. maculipinna* e *A. isalineae* (Figura 8). Exemplares jovens de *A. falcistrostris*, também possuem este padrão de colorido, que porém, é perdido nos exemplares adultos (Figura 9).

As outras espécies do gênero possuem padrão de colorido distinto das demais: *A. falcatus* que apresenta uma mancha umeral bem definida, porém é verticalmente alongada; *A. heterolepis* que possui uma pequena mancha escura na região da cabeça na porção dorsal do opérculo; *A. britskii* e *A. minimus* que não apresentam nenhuma marca colorida conspícua no corpo (MENEZES, 1969; MENEZES, 1992; TOLEDO-PIZA e MENEZES, 1996) (Figura 10).



Figura 6- Espécies do grupo *lacustris*



Figura 7-Espécies do grupo *microlepis*



Figura 8- Espécies do grupo *nasutus*



A



B

Figura 9- Espécie *A. falcirostris*. A- Exemplo adulto. B- Exemplo juvenil.



Figura 10- Espécies do gênero *Acestrorhynchus* que não são incluídas nos demais grupos baseados em padrões de coloração.

O primeiro trabalho enfocando a questão das relações filogenéticas das espécies de *Acestrorhynchus* dentro de um contexto cladístico foi desenvolvido recentemente por Toledo-Piza (no prelo) com o intuito de: (1) investigar se os grupos taxonomicamente definidos com base nos padrões de coloração são monofiléticos, (2) verificar quais as relações entre todas as espécies do gênero, (3) entender a evolução dos diferentes tamanhos de corpos observados dentro do gênero. O estudo incluiu 13 espécies do gênero *Acestrorhynchus*, *A. britskii*, *A. microlepis*, *A. grandoculis*, *A. minimus*, *A. heterolepis*, *A. falcistrotris*, *A. insalineae*, *A. nasutus*, *A. abbreviatus*, *A. altus*, *A. falcatus*, *A. lacustris*, e *A. pantaneiro*, e baseou-se na análise de 104 caracteres osteológicos e de morfologia externa desses animais. Duas hipóteses mais parcimoniosas foram formuladas, ambas corroborando o monofiletismo do gênero *Acestrorhynchus* (Figura 11).

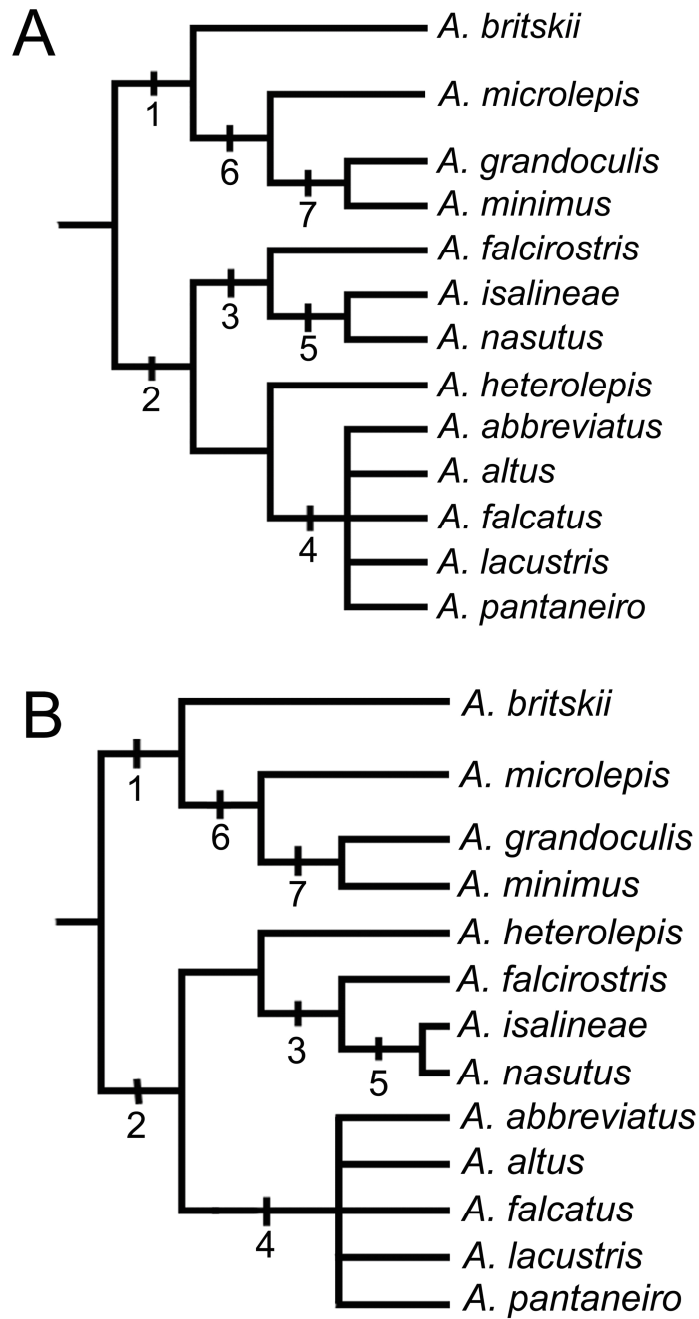


Figura 11- Relações filogenéticas do gênero *Acestorhynchus* com base em caracteres morfológicos (Toledo-Piza, no prelo). A e B diferentes localizações de *A. heterolepis*.

As duas hipóteses de Toledo-Piza (no prelo) divergem em relação à posição de *A. heterolepis* dentro do gênero. Em uma das hipóteses, *A. heterolepis* é proposto como grupo irmão do clado formado por *A. abbreviatus*, *A. altus*, *A. falcatus*, *A. lacustris* e *A. pantaneiro* (Figura 8a). Já na hipótese alternativa *A. heterolepis* é classificado como grupo irmão do clado formado por *A. falcistrostris*, *A. isalineae* e *A. nasutus* (Figura 8b). Os resultados desse estudo corroboraram hipóteses preliminares de agrupamento das espécies com base nos padrões de coloração do corpo (MENEZES, 1969; MENEZES, 1992; TOLEDO-PIZA e MENEZES, 1996) e também evidenciaram a ocorrência de dois eventos independentes de redução do tamanho corporal nas espécies do gênero (*A. grandoculis* e *A. minimus*) e (*A. nasutus* e *A. isalineae*). As espécies do grupo *microlepis* (*A. microlepis* e *A. grandoculis*), foram consideradas relacionadas entre si, porém com base na hipótese apresentada *A. minimus* é incluído também neste grupo. *A. britskii* é proposto como grupo irmão das espécies do grupo *microlepis*. As hipóteses propostas nos cladogramas 5 e 3 mostram um grupo monofilético formado pelos exemplares *A. isalineae* e *A. nasutus* (que possuem as listras longitudinais ao longo do corpo) juntamente com *A. falcistrostris* (que possui o mesmo padrão de colorido em estágio juvenil). O clado 4 nos mostra que as espécies com mancha umeral (que são as espécies do grupo *lacustris* mais *A. falcatus*) formam um clado monofilético, mas as relações deste clado que é composto por *A. abbreviatus*, *A. altus*, *A. falcatus*, *A. lacustris* e *A. pantaneiro* não foram elucidadas.

Atualmente dados moleculares têm se tornado uma ferramenta cada vez mais utilizada para auxiliar na elucidação de filogenias de difícil resolução. Essa é uma abordagem que pode elucidar questões pendentes sobre as relações no gênero *Acestrorhynchus*, uma vez que os caracteres morfológicos utilizados não foram suficientes para resolver algumas de suas relações.

1.4- Sistemática Molecular como Ferramenta

Os avanços na área de genética molecular causaram um grande impacto nos campos da taxonomia e da sistemática, não apenas porque passaram a auxiliar no reconhecimento de novas espécies (SUNEETHA, DAHLEG e NAEVDAL, 2000; CASTRO et al. 2004), mas por ajudarem a elucidar suas relações filogenéticas (HILLIS, MORITZ e MABLE 1996). A sistemática molecular ocupa um lugar central em biologia na era genômica, devido ao avanço sem precedentes nas tecnologias para acesso à informação no DNA (LI et al. 2007).

As primeiras filogenias propostas com base em dados moleculares eram restritas a grupos pequenos e utilizavam um número bastante limitado de caracteres. O avanço das técnicas de seqüenciamento e a possibilidade de utilização de uma grande variedade de genes informativos em diferentes níveis taxonômicos têm tornado possível a construção de filogenias moleculares para grandes grupos e a utilização de um número cada vez maior de representantes. Atualmente a inferência das relações entre organismos com base em muitos locos gênicos independentes, além de ser um enfoque amplamente aceito, permite a elaboração de filogenias mais robustas e filogenias robustas são um pré-requisito importante na elaboração de hipóteses biogeográficas.

A utilização de análises simultâneas de diferentes conjuntos de dados, gerados por genes diferentes, tem se tornado cada vez mais freqüente. Isto porque a análise simultânea torna, na maioria das vezes, mais robusto o suporte das filogenias obtidas em comparação com suportes obtidos quando os conjuntos de dados de diferentes genes são analisados separadamente.

Lavoué, Sullivan e Hopkins (2003) propõem uma filogenia para a superfamília Mormyroidea com base em dados dos genes nucleares ativador da recombinação

(RAG2) e o gene da proteína ribossomal S7 e dos genes mitocondriais 12S, 16S e citocromo *b*. Os autores encontraram resultados bastante expressivos para determinar as relações internas de Mormyroidea. Estes resultados foram também muito úteis para o entendimento da evolução do sistema de eletrócitos nesses animais. Segundo os autores, os genes utilizados nesse trabalho também podem ser úteis na construção de filogenias ao nível de subfamílias.

Da mesma forma Hrbek, Seckinger e Meyer (2006) investigaram as relações filogenéticas dos membros de Poeciliinae (Cyprinodontiformes) para testar hipóteses de diversificação desses animais como resultado da união da América Central e Caribe no Cretáceo. Neste trabalho foi realizada a análise simultânea de 4333 pares de bases dos genes mitocondriais 12S, 16S, citocromo *b*, NADH subunidades I e II, e 1549 pares de bases do gene nuclear ativador da recombinação (RAG1), o que resultou em uma hipótese filogenética com altos valores de suporte.

Mais recentemente, Li e colaboradores (2007) propõem as relações de parentesco para um dos mais numerosos grupos de peixes, os Actinopterygii. Os autores apresentam um enfoque prático que compara seqüências de genomas inteiros, para identificar genes nucleares de cópia única indicados para serem utilizados em inferências filogenéticas. Neste trabalho os autores obtêm um total de 154 possíveis marcadores moleculares para genes nucleares, com base na análise do genoma completo dos organismos modelo, *Danio rerio* e *Takifugu rubripes*.

Como dito anteriormente, ao longo dos anos é possível verificar o aumento da abrangência taxonômica desses estudos e a inclusão de um número cada vez maior de caracteres. Entretanto, existem ainda algumas questões importantes que geram certa polemica como, por exemplo, a questão da homologia das seqüências utilizadas.

1.4.1- Homologia

Ao se reconstruir uma filogenia, seja ela com dados moleculares ou morfológicos, a primeira preocupação deve ser com a homologia dos caracteres estudados (HENNIG, 1950 e 1966; PHILLIPS, JANIES e WHEELER, 2000). Atualmente definem-se dois caracteres como homólogos se suas partes idênticas ou semelhantes possuem origem comum (PATTERSON, 1988; LEWIN, 1997).

No caso da utilização de dados moleculares, a homologia dos genes comparados é essencial, porém a certeza dessa homologia nem sempre é tão simples.

Existem dois processos que podem gerar genes homólogos: a divergência gênica e a duplicação (PATTERSON, 1988; LEWIN, 1997). A origem de genes homólogos por duplicação de um gene dentro da mesma espécie dá origem aos genes denominados parálogos (MEYER, 1997; PATTERSON, 1988; SCHNEIDER, 2003a). Quando dois genes são homólogos, pois têm origem em uma espécie ancestral, então esses genes são denominados ortólogos (MEYER, 1997; PATTERSON, 1988; SCHNEIDER, 2003a).

1.4.2- Marcadores Moleculares

O seqüenciamento de regiões específicas do DNA é uma importante técnica para a obtenção de dados para a construção de filogenias moleculares. Em comparações interespecíficas, o mais apropriado e informativo é trabalhar com caracteres que variem entre os grupos estudados, mas não dentro deles. Genes que apresentam taxa de evolução alta e polimorfismos intra-específicos de baixos a moderados são os mais adequados para a análise de relações evolutivas entre espécies próximas.

O DNA mitocondrial (mtDNA) apresenta uma taxa de substituição de nucleotídeos alta, cerca de 5 a 10 vezes maior que aquela apresentada pelo DNA nuclear (HARRISON, 1989). Estudos vêm mostrando que essa taxa de substituição pode ser variar em regiões diferentes da molécula, entre táxons e também ao longo do tempo evolutivo em uma mesma linhagem (AVISE, 1991; STRAUSS, 1999). No grupo dos peixes a taxa de substituição nucleotídica parece ser menor que em vertebrados superiores (MARTIN e PALUMBI, 1993). Todas essas características fazem do mtDNA uma molécula indicada para estudos interespecíficos.

É crescente o número de trabalhos que empregam associados, marcadores dos genomas nuclear e mitocondrial para a resolução de questões filogenéticas (PEREIRA, BAKER e WAJNTAL, 2002). A inclusão de seqüências nucleares contribui para aumentar o número de locos independentes na análise, uma vez que, devido ao fato de não sofrer recombinação, a molécula de DNA mitocondrial é considerada como um único loco com vários alelos ligados. Dentre as seqüências do genoma nuclear utilizadas, os introns são mais recomendados, pois dispõem de maior liberdade para mudar seus nucleotídeos.

Segundo Doyle (1992), a congruência entre topologias obtidas por diferentes conjuntos de dados sugere que a árvore de genes reflita a árvore de espécies, fornecendo maior confiança nas estimativas das relações filogenéticas.

1.4.3- Cladística

Cladística ou sistemática filogenética, é o sistema de classificação proposto por Hennig em 1950, 1966, amplamente discutido na literatura (e.g. WILLEY, 1981; SCHUH, 2000) e seu critério principal é que *“as classificações biológicas devem ser*

um reflexo inequívoco do conhecimento atual sobre as relações de parentesco entre os táxons” (AMORIM,1997). A descendência de um ancestral comum exclusivo é o critério usado pela metodologia cladística para agrupar os organismos. Segundo este paradigma somente os caracteres derivados (ou apomórficos) podem usados para caracterizar os táxons.

1.4.4- Parcimônia

Em reconstruções filogenéticas com base em dados moleculares de seqüências de nucleotídeos utilizando o método de máxima parcimônia, nem todos os sítios variáveis dentro de uma seqüência são considerados informativos. Um sítio é considerado informativo para parcimônia quando ele apresenta no mínimo duas bases diferentes duplicadas (SCHNEIDER, 2003a).

O método de máxima parcimônia para reconstrução de topologias consiste em fazer uma árvore não enraizada para três táxons da amostra. Em seguida, um quarto táxon deve ser adicionado em todas as posições possíveis dessa árvore. Este passo irá formar três possíveis árvores não enraizadas demonstrando as relações estritamente bifurcadas entre esses táxons. O procedimento é então repetido até que todos os táxons tenham sido incorporados às árvores e, desse modo, todas as possíveis árvores geradas para esse grupo tenham sido construídas. A árvore mais parcimoniosa é aquela que apresenta o menor número de passos (SWOFFORD et al. 1996).

1.4.5- Valores de Suporte

1.4.5.1- Valores de *Bootstrap*

O suporte pode ser acessado por uma variedade de caminhos mas, a reamostragem do *bootstrap* (FELSENTEIN, 1985; EFRON, HALLORAN e HOLMES, 1996) é o método mais comumente usado para dados moleculares (SANDERSON e SHAFFER, 2002).

O teste estatístico do *bootstrap* é realizado para testar a confiabilidade de relações filogenéticas. Nesse teste, dada uma matriz, que contém, por exemplo, cinco táxons e 100 sítios, uma porcentagem desses sítios é escolhido e substituído ao acaso, originando uma pseudo-replica do banco de dados com o mesmo número de sítios, mas com composição nucleotídica diferente. Esse processo é então repetido muitas de vezes, ao final é construída uma árvore de consenso entre todas as pseudo-réplicas e os valores em percentuais são anotados para cada nó interno da árvore (SCHNEIDER , 2003a).

Através de estudos de simulação, Hillis e Bull (1993) sugerem os valores de *bootstrap* de 70% como limiar de significância. Li (1997) propõe que para um agrupamento ser considerado significativamente apoiado seus valores de *bootstrap* devem ser iguais ou superiores a 95%. Uma estratégia de verificação da confiabilidade dos índices de *bootstrap* foi sugerida por Chen, Bonillo e Leointre, (2003) baseada na repetibilidade dos agrupamentos. Segundo os autores é preferível aceitar um mesmo clado, inferido diversas vezes por diferentes conjuntos de dados, mesmo que esse clado seja suportado por valores de *bootstrap* baixos do que um clado fortemente apoiado por altos valores de *bootstrap* mas inferido a partir de um conjunto de dados único.

Segundo Schneider (2003a) talvez a melhor alternativa seja a interpretação conjunta das sugestões de Li (1997) e o limite de Hillis e Bull (1993). Sendo assim os valores de *bootstrap* significativos, ou seja, acima de 95% seriam considerados independente da repetibilidade do clado. Já valores moderados entre 70 e 94% ou fracos entre 51 e 69% poderiam ser considerados como indicativo de suporte para clados, desde que sustentados por vários marcadores diferentes.

1.4.5.2- Valores do Suporte de Bremer

O suporte de Bremer (BS-BREMER, 1988 e 1994), também conhecido como suporte de ramos ou *decay index*, mede, para cada ramo existente no consenso estrito dos cladogramas mais parcimoniosos, o número e passos adicionais que são necessários para que este ramo colapse no consenso estrito de árvores sub-ótimas.

1.4.5.3- Valores do Suporte Particionado de Bremer

O suporte particionado de Bremer (PBS-BAKER e DESALLE, 1997), que é uma variação do suporte de Bremer, identifica conflitos entre conjunto de dados para relações particulares. PBS indica a contribuição de cada conjunto de dados para o valor final do BS para o conjunto de caracteres combinados total. Com este índice, a rede de suporte e conflito de caráter rendida por cada conjunto de dados de um determinado nó pode ser estimada em análises simultâneas de todos os dados relevantes.

O valor do PBS individual pode ser positivo, negativo ou zero. Dentro de um sistema de análise simultânea um PBS positivo indica que determinado conjunto de dados fornece suporte para aquele nó particular. Um PBS negativo mostra que um determinado conjunto de dados resulta em uma árvore mais curta sem o determinado nó. PBS zero indica a indiferença de um determinado conjunto de dados para a manutenção daquele nó (BAKER e DeSALLE, 1997).

Esse método permite a detecção de suporte e conflito oculto, ou que não são evidentes na análise separada de cada conjunto de dados (BAKER e DeSALLE, 1997).

1.4.6- Divergência Nucleotídica

A contagem simples do número de diferenças entre duas seqüências subestima a quantidade real de mudança evolutiva devido á possibilidade de ocorrência de substituições múltiplas ou homoplasias (mutação reversa, convergência ou paralelismo). Para evitar um viés na estimativa desses valores, as distâncias genéticas nucleotídicas devem ser calculadas de acordo com um modelo evolutivo adequado.

O modelo utilizado deve ter a capacidade de incorporar a heterogeneidade nas taxas de substituição de nucleotídeos ao longo dos sítios. Sítios sob forte restrição seletiva, são resistentes a mudanças e tendem a esconder a verdadeira magnitude da mudança. O modelo de distribuição gama é o mais usado para modelar a heterogeneidade da taxa de substituição nucleotídica (SCHNEIDER, 2003b). A distribuição gama é modelada pelo parâmetro α : valores pequenos de α indicam maior heterogeneidade da taxa de substituição entre os sítios, enquanto que valores

altos sugerem uma maior homogeneidade na distribuição de taxas de substituição entre sítios.

O programa Modeltest (POSADA e CRANDALL, 1998) é utilizado para a escolha do modelo de evolução de DNA que melhor se ajusta aos dados obtidos (SCHNEIDER, 2003b). O Modeltest utiliza 11 modelos diferentes de substituição nucleotídica para escolher o mais adequado. Para isso o programa utiliza o LRT (Likelihood Ratio Test), que compara modelos progressivamente mais complexos e escolhe aquele que não apresenta diferenças significantes quando comparado com modelos mais complexos, ou seja, o teste LRT opta sempre pelo modelo mais simples (SCHNEIDER, 2003b).

2-Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral, utilizar dados obtidos através do seqüenciamento de genes nucleares e mitocondriais para estabelecer as relações de parentesco entre as espécies do gênero *Acestrorhynchus*.

De maneira mais específica os objetivos foram:

- (1) Tentar resolver as relações do clado composto pelas espécies com mancha umeral *A. abbreviatus*, *A. altus*, *A. falcatus*, *A. lacustris* e *A. pantaneiro*, as quais não foram esclarecidas nas filogenias baseadas em caracteres morfológicos.
- (2) Elucidar as relações de *A. heterolepis* dentro do gênero *Acestrorhynchus*.
- (3) Comparar as hipóteses filogenéticas obtidas para o gênero através dos dados moleculares, com aquelas propostas com base nos caracteres morfológicos.

3- Materiais e Métodos

3.1- Táxons Examinados

3.1.1- Grupo Interno

As amostras de tecido dos peixes do gênero *Acestrorhynchus*, foram obtidas através de coletas realizadas pelo Laboratório de Ictiogenética da USP (LIUSP), em coletas conjuntas entre LIUSP e a Coordenadoria de Desenvolvimento do Vale do São Francisco (CODEVASF), coletas conjuntas entre LIUSP e o Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA) e também fornecidas por coletas realizadas por outros laboratórios e instituições como o Museu de Zoologia da USP (MZUSP), Laboratório de Biologia de Peixes da UNESP de Botucatu (LBP), Universidade de Rondônia (UNIR) e INPA. Das 14 espécies do gênero *Acestrorhynchus*, *A. britskii*, *A. microlepis*, *A. grandoculis*, *A. minimus*, *A. heterolepis*, *A. falcistrotris*, *A. nasutus*, *A. altus*, *A. falcatus*, *A. lacustris* e *A. pantaneiro* foram analisadas (Anexo 1). *Acestrorhynchus abbreviatus*, *A. maculipinna* e *A. isalineae* não foram analisadas neste trabalho por terem distribuição mais restrita e serem relativamente difíceis de serem encontradas apesar do esforço empregado em obter exemplares destas espécies.

3.1.2- Grupo Externo

Foram utilizados para o grupo externo os gêneros *Rhaphiodon*, *Roeboides* e *Gephyrocharax*.

As amostras de tecidos para os exemplares do grupo externo foram obtidas através de coletas do Laboratório de Ictiogenética e cedidas por D. Calcagnotto (Anexo 1).

O gênero *Rhaphiodon* foi escolhido com base na hipótese de Lucena e Menezes (1998) que propõe a subfamília Cynodontinae (composta pelos gêneros *Cynodon* e *Rhaphiodon*) como grupo irmão da família Acestrorhynchidae. *Roeboides* e *Gephyrocharax* foram escolhidos como representantes de duas subfamílias de Characidae (Characinae e Glandulocaudinae respectivamente).

3.2- Extração do DNA Total

A extração do DNA genômico foi realizada com a utilização do Kit DNEasy Tissue Extraction (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante, a partir de tecidos de musculatura e nadadeira, preservados em etanol 95%. Após a extração a qualidade do DNA era avaliada em gel de agarose 1%. Todas as amostras de tecido utilizadas para extração de DNA forneceram uma quantidade adequada de material.

3.3- Amplificação e Seqüenciamento

Em nossa análise foram utilizados os genes mitocondriais 16S e ATPase e o primeiro intron do gene nuclear que codifica para a proteína S7. As seqüências dos primers utilizados estão descritas na Tabela 1.

As reações de amplificação ou PCR (Polymerase Chain Reaction) foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf e MJ Research, INC, modelo

PTC- 100 TM , em volume total de 25 µl, contendo:15,9 µl de água MilliQ, 2,5 µl de dNTPs (10 mM), 2,5 µl de tampão 10x contendo (NH₄)₂SO₄, 1,0 µl de cada um dos primers (10 pM), 1,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 1,0 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 0,5 µl de DNA molde. As reações de PCR precisaram de uma etapa de testes para adequar as quantidades de DNA e MgCl₂ bem como para ajustar as temperaturas de anelamento. A descrição dos ciclos de PCR encontram-se na Tabela 2.

Tabela 1- Seqüências dos *primers* utilizados.

16S ar	ACG CCT GTT TAT CAA AAA CAT	Palumbi, 1996
16S br	CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T	
ATP8	AAA GCR TYR GCC TTT TAA GC	Kocher et al. 1989;
CO3	GTT AGT GGT CAK GGG CTT GGR TC	McVeigh, Barlett e Davidson, 1991
S7 1F	TGGCCTCTTCCTTGGCCGTC	Chow e Hazama, 1998
S7 2R	AACTCGTCTGGCTTTTCGCC	

Tabela 2- Descrição dos ciclos de PCR

Primer	Desnaturação	Ciclos	Extensão
ATPase	94 °C/ 2 min	35 x (94 °C/ 1 min, 51 °C/ 45 s, 72 °C/ 1:30 min)	72 °C/ 7 min
S7	95 °C/ 3 min	30 x (95 °C/ 30 s, 60 °C/ 45 s, 72 °C/ 1 min)	72 °C/ 10 min
16S	95 °C/ 10 min	33 x (95 °C/ 50 s, 47 °C/ 50 s, 72 °C/ 1 min)	72 °C/ 7 min

O produto da reação de amplificação foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), em tampão TBE (EDTA 2mM; Tris 89mM; Borato 89mM), a uma voltagem de 95 V. Foi utilizado como marcador de peso molecular o 100bp DNA ladder (Invitrogen). A coloração dos géis foi realizada com solução de brometo de etídeo (10 mg/mL) e a seguir os géis foram fotografados em Polaróide sob luz ultravioleta.

Para purificação do produto de PCR foram utilizados dois Kits: Qiaquick Purification (Qiagen) e ChargeSwitch PCR Clean-Up (Invitrogen). A quantificação da PCR purificada foi realizada utilizando eletroforese em gel de agarose 2%, e comparada com ladder "Low Mass DNA".

O produto da PCR purificada, foi utilizado para as reações de seqüenciamento (BigDye Sequence Terminator v. 3.1, Applied Biosystems Inc.) utilizando os mesmos *primers* da reação inicial de amplificação.

Foram seqüenciadas uma fita *forward* e uma fita *reverse* para cada um dos exemplares das 11 espécies do gênero *Acestrorhynchus* e também para *Rhaphiodon*, *Gephyrocharax* e *Roeboides*, utilizados como grupo externo. Sempre que possível foram analisados dois exemplares por espécie.

Após a reação de seqüenciamento, as amostras foram precipitadas utilizando etanol e acetato de sódio conforme protocolo sugerido pelo fabricante do Kit de seqüenciamento.

O produto de seqüenciamento foi analisado em seqüenciador automático ABI Prism Genetic Analyzer (modelo 3100).

3.4- Análise das Seqüências

Todas as seqüências obtidas foram editadas com a utilização do programa *Sequencher* 4.1 (Genes Code Corporation), através de inspeções visuais e análises simultâneas das seqüências e seus respectivos eletroferogramas. Esta etapa foi de especial importância para identificação de possíveis erros de leitura eletrônica e sua posterior correção. No caso de haver polimorfismos de um nucleotídeo uma seqüência consenso foi utilizada e o polimorfismo codificado de acordo com o código de ambigüidade do IUPAC-IUP.

Em seguida as seqüências foram comparadas às seqüências homólogas de outros peixes teleósteos armazenadas no GenBank, para a confirmação da homologia do fragmento amplificado. Para esta etapa utilizou-se o programa Blast (ALTSCHUL, 1990).

Para o alinhamento das seqüências de DNA foi utilizado o algoritmo Clustal X (THOMPSON et al. 1997), com parâmetro padrão para a abertura de gaps (=10) e custo de extensão (=0,2).

Após o alinhamento as seqüências foram novamente visualizadas e conferidas no programa MacClade (MADDISON e MADDISSON, 1992) e os *gaps* iniciais e finais foram tratados como *missing*.

3.5- Reconstrução Filogenética

O estudo das relações filogenéticas utilizou a metodologia cladística. A análise da matriz de caracteres para a obtenção das topologias foi realizada com o auxílio de programa PAUP* 4.0b10 (SWOFFORD, 2000) utilizando o método de máxima parcimônia. A árvore mais parcimoniosa foi encontrada através do método de busca heurística com 5000 réplicas de adição de seqüências com o algoritmo TBR, sem atribuição de peso aos caracteres, os quais foram considerados como não ordenados. Os *gaps* foram tratados como *missing*.

O algoritmo TreeRot (SORENSEN, 1999), foi utilizado para calcular os valores do suporte de Bremer, utilizando 100 réplicas de adição de táxon ao acaso e para calcular os valores de PBS para cada um dos genes utilizados.

3.6- Divergências entre Seqüências

O número de nucleotídeos diferentes para cada uma das regiões analisadas, encontrado através da comparação de seqüências par a par foi calculado com o auxílio do programa MEGA (TAMURA et al. 2007).

As distâncias genéticas nucleotídicas também foram calculadas para as diferentes regiões analisadas com a utilização do programa PAUP* 4.0b10 (SWOFFORD, 2000) com base nos modelos evolutivos selecionados para cada gene separadamente com o auxílio do programa Modeltest (POSADA e CRANDALL, 1998).

4- Resultados

4.1- Topologia da Árvore

A análise resultou na obtenção de uma árvore mais parcimoniosa com 2551 passos (Figura12). O índice de consistência (IC) apresentou valor de 0,633 e o de índice de retenção (IR) foi de 0,533.

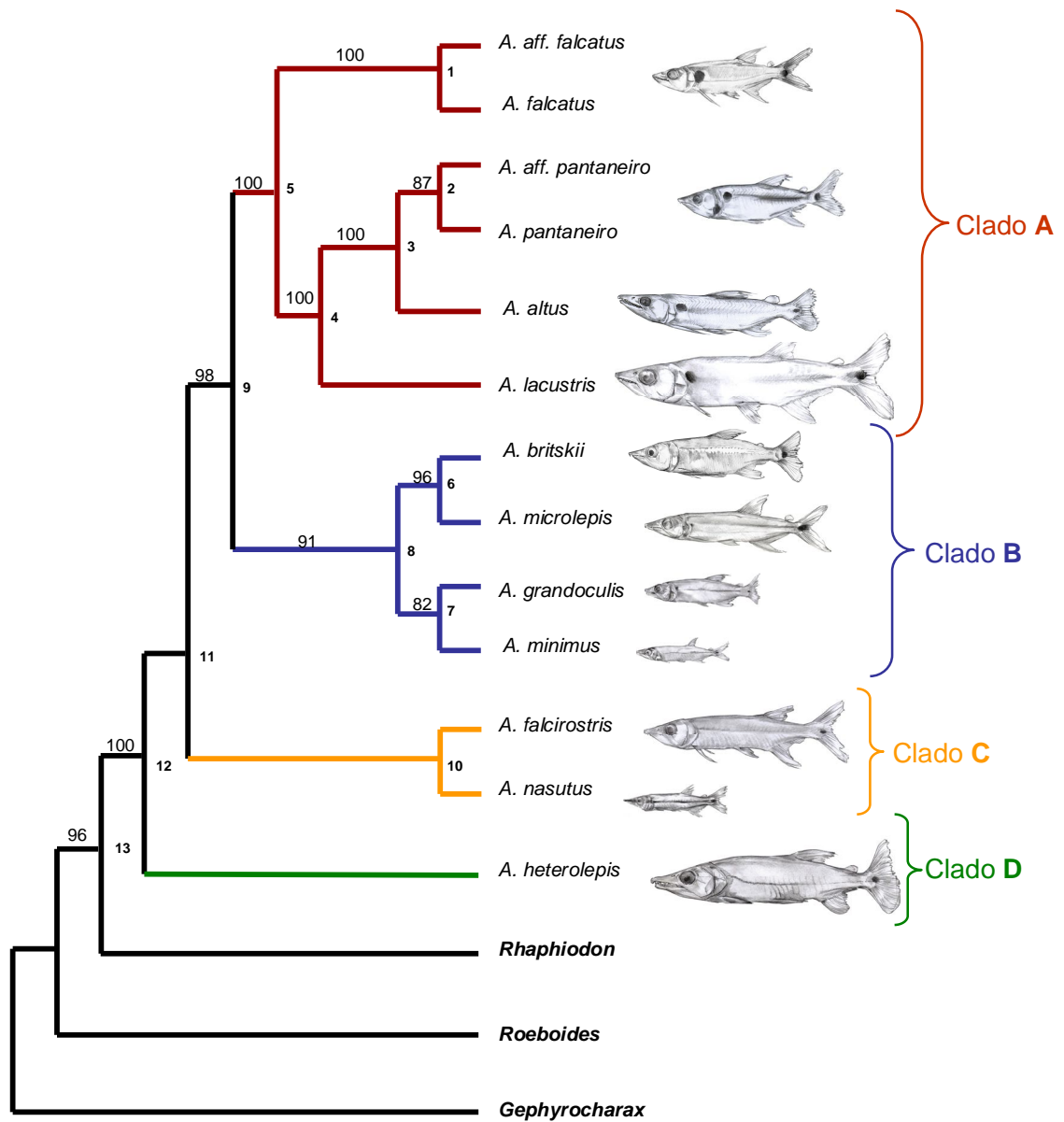


Figura 11- Árvore filogenética do gênero *Acestorhynchus* com base na análise simultânea do gene nuclear S7 e dos genes mitocondriais 16S e ATPase. Clado A (vermelho), clado B (azul), clado C (amarelo) e clado D (verde). Valores de *bootstrap* estão localizados acima dos ramos e o número de cada clado está localizados dentro dos nós.

4.2-Estatística da Árvore e Suporte dos Nós

Um total de 2139 bp foram utilizados na análise combinada dos dados, sendo que destes, 608 pb eram do gene 16S, 821 pb das subunidades 6 e 8 da ATPase e 710 eram do primeiro intron do gene que codifica para a proteína S7. Do total de caracteres, 1041 são constantes e 657 são informativos para parcimônia.

Os valores de PBS total foram 100, 125 e 37 para os genes 16S ATPase e S7, respectivamente, e os valores obtidos para cada nó específico são mostrados na tabela 3.

Tabela 3- Valor absoluto de contribuição de cada um dos genes para todos os ramos.

Nó/Contribuição Parcial por Gene	16S	ATPase	S7	Total/Nó
1	18	30	14	62
2	3	1	-1	3
3	2	10	0	12
4	19	47	5	71
5	10	10	6	26
6	5	1	4	10
7	0	10	-1	9
8	-1	9	3	11
9	1	4	5	10
10	9	-6	1	4
11	9	-6	1	4
12	15	11	0	26
13	10	4	0	14
Total	100	125	37	262

A porcentagem de contribuição de cada um dos genes na análise simultânea é apresentada abaixo (Figura 13).

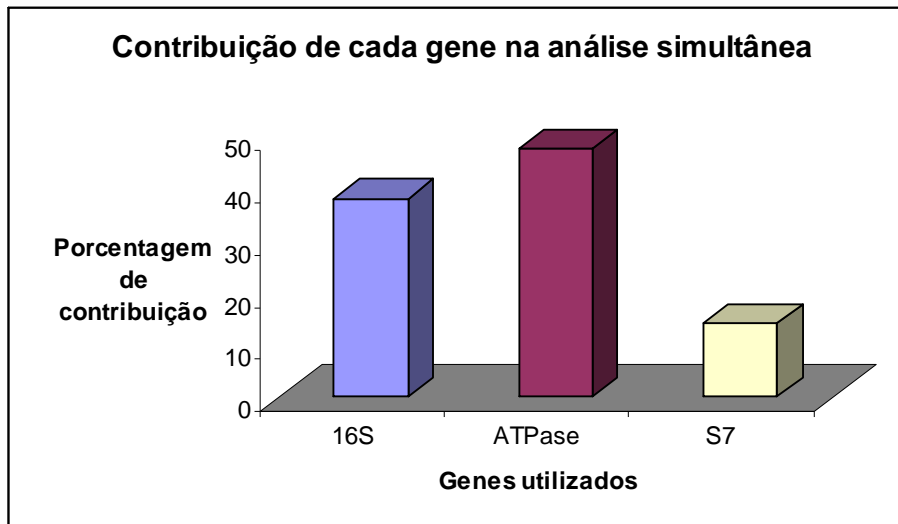


Figura 13- Porcentagens de contribuição de cada um dos genes na Análise Simultânea calculadas a partir dos valores absolutos de PBS. (1) 16S, (2) ATPase e (3) S7.

4.3- Topologia dos Cladogramas

Os resultados obtidos através da análise simultânea dos dados moleculares corroboraram os agrupamentos baseados nos padrões de coloração desses animais. A árvore obtida apresentou-se internamente dividida em quatro clados (**A**, **B**, **C** e **D**). O clado **A** é composto por *A. falcatus*, *A. aff. falcatus*, *A. pantaneiro*, *A. aff. pantaneiro*, *A. altus* e *A. lacustris* sendo: *A. aff. falcatus* como grupo irmão de *A. falcatus*; *A. aff. pantaneiro* como grupo irmão de *A. pantaneiro*; *A. altus* como grupo irmão do clado formado por *A. pantaneiro* e *A. aff. pantaneiro*; e *A. lacustris* como grupo irmão do clado anterior (Figura 12). O clado B é formado por *A. britskii*, *A. microlepis*, *A. grandoculis* e *A. minimus* sendo: *A. britskii* como grupo irmão de *A. microlepis* e este clado como grupo irmão do clado formado por *A. grandoculis* grupo irmão de *A. minimus*.

O clado C é formado por *A. falcirostris* grupo irmão de *A. nasutus*. *Acestrorhynchus heterolepis* é proposto no clado D como basal dentro do gênero *Acestrorhynchus*.

Dentre os táxons utilizados como grupo externo, *Rhaphiodon* é recuperado como o mais próximo do gênero *Acestrorhynchus* sendo seguido por *Roeboides* e *Gephyrocharax*.

4.4- Análises Independentes

Foram também construídas separadamente as relações filogenéticas para cada um dos genes utilizados nesta análise. O gene 16s resultou em duas árvores mais parcimoniosas com 389 passos e os índices de consistência e retenção foram de 0,609 e 0,581 respectivamente. A árvore consenso estrito recupera as mesmas relações internas para o clado composto pelas espécies do grupo *lacustris* mais *A. falcatus* e *A. aff. falcatus*, como na análise simultânea dos dados (Clado A, figura 12). Além disso, recupera *A. nasutus* e *A. falcirostris* mais proximamente relacionados e propõe *A. heterolepis* como basal dentro do gênero. Já as espécies do grupo *microlepis* não formam um grupo monofilético com base na análise do gen 16S sozinho.

A análise independente do gene da ATPase resultou em uma árvore mais parcimoniosa, com 1352 passos, índice de consistência de 0,521 e índice de retenção de 0,493. Novamente o clado formado pelas espécies do grupo *lacustris* mais *A. falcatus* e *A. aff. falcatus* foi recuperado exatamente conforme o obtido na análise simultânea dos dados. *Acestrorhynchus nasutus* e *A. falcirostris* são propostos respectivamente nesta ordem como grupo basais e as demais espécies

do gênero formam um clado único, grupo irmão do clado formado pelas espécies do grupo *lacustris* mais *A. falcatus* e *A. aff. falcatus*. O posicionamento de *A. nasutus* e *A. falcistrostris* como basais difere do resultado encontrado na análise simultânea dos dados (Figura 12). Além disso a relação entre as demais espécies do gênero também foi recuperada de forma diferente:

((*A. britskii*, *A. microlepis*) (*A. grandoculis* (*A. heterolepis*, *A. minimus*)))

Já o gene S7 sozinho gerou mais de 100 árvores mais parcimoniosas, cujo consenso estrito resultou em uma politomia entre todas as espécies de *Acestrorhynchus*.

4.5- Comparação entre Seqüências

O número de nucleotídeos diferentes encontrado através da comparação de seqüências par a par foi calculado entre as seqüências de DNA das 11 espécies de *Acestrorhynchus* utilizados nesta análise (Tabelas 4, 5 e 6).

Tabela 4- Número de nucleotídeos diferentes nas seqüências do gene 16S. Em destaque exemplares do grupo *lacustris*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 A_pantaneiro												
2 A_aff_pantaneiro	1											
3 A_lacustris	11	10										
4 A_altus	6	5	7									
5 A_falcatus	39	38	32	33								
6 A_aff_falcatus	43	43	42	37	13							
7 A_falcistrostris27	55	55	54	57	64	69						
8 A_nasutus	56	56	58	59	70	74	17					
9 A_grandoculis	45	45	43	46	55	59	47	48				
10 A_microlepis	48	48	46	43	57	60	51	58	38			
11 A_britskii	55	55	53	50	60	66	52	60	39	36		
12 A_minimus	37	37	34	36	45	50	44	44	24	37	43	
13 A_heterolepis	68	68	66	61	68	70	53	59	56	55	55	52

Tabela 5- Número de nucleotídeos diferentes nas seqüências do gene ATPase. Em destaque exemplares do grupo *lacustris*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 A_pantaneiro												
2 A_aff_pantaneiro	1											
3 A_lacustris	25	26										
4 A_altus	2	3	24									
5 A_falcatus	150	149	146	148								
6 A_aff_falcatus	139	137	136	136	37							
7 A_falcirostris27	210	210	212	204	214	218						
8 A_nasutus	166	164	168	162	178	178	188					
9 A_grandoculis	165	162	167	161	169	160	207	165				
10 A_microlepis	153	151	154	153	156	148	206	172	129			
11 A_britiskii	155	153	157	151	155	153	193	152	143	120		
12 A_minimus	176	173	175	171	159	154	209	168	133	130	142	
13 A_heterolepis	213	211	215	210	191	190	249	202	197	194	192	196

Tabela 6- Número de nucleotídeos diferentes nas seqüências do gene S7. Em destaque exemplares do grupo *lacustris*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 A_pantaneiro												
2 A_aff_pantaneiro	4											
3 A_lacustris	2	4										
4 A_altus	1	3	3									
5 A_falcatus	29	29	28	30								
6 A_aff_falcatus	29	29	28	30	3							
7 A_falcirostris27	120	120	116	117	116	115						
8 A_nasutus	62	66	65	63	67	66	114					
9 A_grandoculis	33	38	35	33	39	38	110	56				
10 A_microlepis	42	47	43	42	46	45	114	60	20			
11 A_britiskii	41	46	43	41	46	45	115	62	20	18		
12 A_minimus	42	47	44	42	44	42	118	63	18	31	29	
13 A_heterolepis	96	97	93	91	90	95	127	98	89	95	90	96

As distancias genéticas nucleotídicas também foram calculadas para as diferentes regiões analisadas neste trabalho. Este cálculo foi realizado com base nos modelos evolutivos selecionados para cada uma delas separadamente com o auxílio do programa Modeltest (POSADA e CRANDALL, 1998). O modelo selecionado para o conjunto de dados do gene mitocondrial 16S foi Tamura-Nei (TrN) (TAMURA e NEI, 1993) com os seguintes parâmetros adicionados: heterogeneidade das taxas

de substituição descrita pela distribuição gama (G) e proporção de sítios não variáveis (I). Este modelo considera a variação na frequência das bases (A, T, C, G), a variação na frequência de transições, e assume as transversões como igualmente frequentes (Tabela 7).

Tabela 7- Matriz de divergência nucleotídica compartilhada baseada no modelo TrN+G+I (TAMURA e NEI, 1993) com base em 608 pares de base do gene mitocondrial rRNA 16S para 13 espécies do gênero *Acestrorhynchus*. Em destaque as espécies do grupo *lacustris*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>A. pantaneiro</i>												
2 <i>A. aff. pantaneiro</i>	0.002											
3 <i>A. lacustris</i>	0.019	0.017										
4 <i>A. altus</i>	0.007	0.005	0.013									
5 <i>A. falcatus</i>	0.100	0.095	0.072	0.076								
6 <i>A. aff. falcatus</i>	0.097	0.096	0.094	0.083	0.021							
7 <i>A. falcistrotris27</i>	0.231	0.231	0.210	0.189	0.295	0.270						
8 <i>A. nasutus</i>	0.156	0.153	0.160	0.162	0.223	0.232	0.114					
9 <i>A. grandoculis</i>	0.120	0.118	0.120	0.117	0.135	0.137	0.174	0.128				
10 <i>A. microlepis</i>	0.138	0.136	0.116	0.107	0.176	0.171	0.193	0.144	0.088			
11 <i>A. britskii</i>	0.163	0.160	0.147	0.134	0.197	0.202	0.182	0.147	0.092	0.081		
12 <i>A. minimus</i>	0.122	0.120	0.108	0.103	0.130	0.129	0.120	0.116	0.084	0.107	0.115	
13 <i>A. heterolepis</i>	0.230	0.226	0.225	0.196	0.242	0.223	0.170	0.170	0.145	0.161	0.155	0.149

O modelo selecionado para a matriz do gene mitocondrial da ATPase foi Hasegawa-Kishino-Yano (HKY85) (HASEGAWA, KISHINO e YANO, 1985) com os parâmetros G e I adicionados. Este modelo também considera a variação entre a frequência das bases, no entanto leva em conta a variação na frequência tanto das transversões quanto transições (Tabela 8).

Tabela 8- Matriz de divergência nucleotídica compartilhada baseada no modelo HKY85+G+I (HASEGAWA, KISHINO e YANO, 1985) baseada em 821 pares de base do gene mitocondrial ATPase para 13 espécies de *Acestrorhynchus*. Em destaque as espécies do grupo *lacustris*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>A. pantaneiro</i>												
2 <i>A. aff. pantaneiro</i>	0.001											
3 <i>A. lacustris</i>	0.035	0.036										
4 <i>A. altus</i>	0.003	0.004	0.034									
5 <i>A. falcatus</i>	0.399	0.397	0.382	0.407								
6 <i>A. aff. falcatus</i>	0.359	0.351	0.346	0.359	0.051							
7 <i>A. falcirostris27</i>	0.904	0.899	0.916	0.910	0.867	0.869						
8 <i>A. nasutus</i>	0.542	0.529	0.560	0.533	0.587	0.574	0.680					
9 <i>A. grandoculis</i>	0.521	0.505	0.531	0.514	0.465	0.419	0.757	0.509				
10 <i>A. microlepis</i>	0.466	0.456	0.458	0.476	0.463	0.412	0.796	0.573	0.314			
11 <i>A. britskii</i>	0.534	0.526	0.539	0.516	0.516	0.505	0.830	0.531	0.424	0.273		
12 <i>A. minimus</i>	0.605	0.588	0.602	0.599	0.457	0.434	0.825	0.545	0.304	0.329	0.435	
13 <i>A. heterolepis</i>	0.904	0.889	0.924	0.916	0.725	0.736	1.063	0.803	0.804	0.748	0.836	0.832

Para a matriz do gene nuclear S7 modelo selecionado pelo programa também foi HKY85 (HASEGAWA, KISHINO e YANO, 1985) com o parâmetro I adicionado. Os resultados são apresentados abaixo (Tabela 9).

Tabela 9- Matriz de divergência nucleotídica compartilhada baseada no modelo HKY85+I (HASEGAWA, KISHINO e YANO, 1985) baseada em 710 pares de base do gene nuclear S7 para 13 espécies de *Acestrorhynchus*. Em destaque as espécies do grupo *lacustris*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>A. pantaneiro</i>												
2 <i>A. aff. pantaneiro</i>	0.007											
3 <i>A. lacustris</i>	0.046	0.050										
4 <i>A. altus</i>	0.003	0.007	0.048									
5 <i>A. falcatus</i>	0.002	0.005	0.051	0.005								
6 <i>A. aff. falcatus</i>	0.051	0.053	0.005	0.051	0.054							
7 <i>A. falcirostris27</i>	0.269	0.280	0.262	0.269	0.267	0.263						
8 <i>A. nasutus</i>	0.117	0.128	0.128	0.125	0.119	0.128	0.269					
9 <i>A. grandoculis</i>	0.057	0.070	0.067	0.063	0.058	0.070	0.253	0.109				
10 <i>A. microlepis</i>	0.070	0.085	0.077	0.077	0.075	0.085	0.267	0.119	0.034			
11 <i>A. britskii</i>	0.073	0.086	0.082	0.080	0.075	0.084	0.269	0.123	0.034	0.031		
12 <i>A. minimus</i>	0.074	0.087	0.075	0.081	0.076	0.080	0.278	0.124	0.031	0.055	0.051	
13 <i>A. heterolepis</i>	0.183	0.200	0.184	0.191	0.184	0.189	0.311	0.219	0.180	0.185	0.186	0.198

5- Discussão

A grande similaridade entre algumas das espécies do gênero *Acestrorhynchus* e a sobreposição dos caracteres morfológicos utilizados atualmente para sua identificação, tornam difícil a tarefa de estabelecer as relações filogenéticas entre suas espécies tendo como base somente os dados morfológicos.

Embora a utilidade dos caracteres morfológicos seja indiscutível (JENNER, 2004) e que a familiaridade com o grupo de estudo seja importante para que os trabalhos moleculares não se transformem em simples descrição de genótipos (WEITZMAN e MALABARBA, 1998), a aplicação dos dados moleculares pode contribuir de forma significativa para a resolução das relações evolutivas nos mais diferentes níveis taxonômicos.

Com o intuito estabelecer as relações internas do gênero *Acestrorhynchus*, utilizamos as seqüências nucleotídicas dos genes mitocondriais 16S e ATPase, e do gene nuclear S7 para propor uma hipótese das suas relações.

Os resultados mais relevantes desta análise foram o estabelecimento das relações dentro do grande clado A, que não foram possíveis de serem estabelecidas pela análise de dados morfológicos, e o posicionamento de *A. heterolepis*.

Embora as relações entre as espécies do clado A tenham sido resolvidas em nossa análise, as diferenças de nucleotídeos nas regiões gênicas analisadas nessas espécies foram consideradas pequenas, conforme mostrado em nossos resultados.

5.1- Análise Simultânea dos Dados Moleculares

Existem dados que quando utilizados sozinhos em uma análise não são informativos para a resolução de problemas de reconstrução filogenética, mas que podem ser úteis quando utilizados em análises simultâneas dos dados. Por outro lado, dados que oferecem informações consistentes em análises independentes podem não oferecer um bom suporte em análises combinadas (GATESY, O'GRADY, BAKER, 1999; HRBEK, SECKINGER e MEYER, 2007).

O gene da ATPase que contribuiu com a maior porcentagem do suporte total dos ramos na análise combinada (47,7%), foi também o que apresentou maior resolução entre todos na análise separada dos dados. Sua análise independente apresentou o gênero *Acestrorhynchus* como monofilético e manteve o clado formado pelas espécies do grupo *lacustris* mais *A. falcatus* e *A. aff. falcatus* exatamente igual ao obtido na análise simultânea dos dados, composto pelas mesmas espécies e apresentando as mesmas relações entre elas (Figura 12). Podemos destacar também na análise independente da ATPase, a presença de *A. nasutus*, como grupo irmão de *A. falcistrotris*, um resultado que corrobora não somente os dados obtidos em nossa análise simultânea mas também os dados morfológicos de TOLEDO-PIZA (no prelo).

O gene 16S teve 38,2% de contribuição em nossa análise simultânea, e quando analisado separadamente gerou duas árvores mais parcimoniosas cujo consenso não estabeleceu as relações entre *A. britskii* e *A. microlepis*. Esta análise independente também recuperou o clado formado pelas espécies do grupo *lacustris* mais *A. falcatus* e *A. aff. falcatus* conforme proposto na análise simultânea dos dados, *A. nasutus*, foi proposto como grupo irmão de *A. falcistrotris* e *A. heterolepis* é

apresentado como grupo basal, ambos resultados corroborando a análise simultânea.

O gene S7, teve a menor contribuição entre todos os três genes utilizados na análise simultânea, sendo responsável por 14,1% do suporte total dos ramos, e mostrou-se ineficaz para resolução das relações interespecíficas do gênero *Acestrorhynchus*. Sua análise independente encontrou mais de 100 árvores mais parcimoniosas, o que resultou em uma politomia. O gene S7, porém, apresentou um suporte oculto, visto que esse gene não foi capaz de nenhuma resolução quando utilizado separadamente, mas em nossas análises simultâneas apresentou uma contribuição de 14,1% no valor do suporte total de Bremer.

Neste trabalho, os genes que apresentaram maior porcentagem de contribuição na análise simultânea dos dados também apresentaram maior poder de resolução quando utilizados em análises independentes.

5.2- Comparação Entre as Topologias Moleculares e Morfológicas

5.2.1- Pontos Corroborados

As análises realizadas neste trabalho corroboram os dados de Toledo-Piza (no prelo) para as relações das espécies de *Acestrorhynchus* em diversos pontos, sendo eles:

Os clados propostos pela análise dos dados morfológicos (TOLEDO-PIZA, no prelo – clados designados por números – Figura 11) e aqueles propostos por dados moleculares (presente estudo – clados designados por letras – Figura 12) são praticamente os mesmos.

O clado 1 estabelece as relações entre *A. britskii*, *A. microlepis*, *A. grandoculis* e *A. minimus* corresponde ao clado B (azul) (Figuras 11 e 12). O clado 3 relaciona as espécies *A. falcistrotris*, *A. isalineae* e *A. nasutus* e corresponde ao clado C (amarelo) que conta somente com *A. falcistrotris* e *A. nasutus*. O clado 4 corresponde ao clado A (vermelho) e ambos reúnem as espécies com mancha umeral.

Podemos observar que as duas hipóteses filogenéticas, tanto a baseada em caracteres morfológicos, quanto a baseada em caracteres moleculares, reúnem as espécies do gênero *Acestrorhynchus* com base em seus padrões de colorido do corpo conforme proposto por Menezes (1969), Menezes e Géry (1983), e também evidenciam dois eventos independentes de redução do tamanho corporal entre as espécies.

5.2.2- Divergências Encontradas

Embora as grandes divisões internas sejam corroboradas pelas duas filogenias, a relação entre esses clados é diferente em cada uma das análises. O clado A que reúne as espécies com mancha umeral (espécies do grupo *lacustris* mais *A. falcatus*) é proposto como grupo irmão do clado B composto pelas espécies *A. britskii*, *A. microlepis*, *A. grandoculis* e *A. minimus*, sendo que estes dois clados são propostos como mais derivados dentro do gênero *Acestrorhynchus*. O clado 4 da análise de Toledo-Piza (no prelo) que corresponde ao nosso clado A, forma um grupo irmão com seu clado 3 composto por *A. falcistrotris*, *A. isalineae* e *A. nasutus* o que corresponde ao nosso clado C, e estes dois clados são propostos como mais derivados dentro do gênero em sua filogenia.

O clado C da análise molecular composto por *A. nasutus* e *A. falcistrostris* é proposto como grupo irmão mais basal dos cladogramas A e B. Já nas análises morfológicas o clado 1 composto por *A. britskii*, *A. microlepis*, *A. nasutus* e *A. minimus* (que corresponde ao nosso clado B) é que foi proposto como grupo irmão mais basal aos cladogramas 2 e 3 em sua filogenia.

Outra divergência ocorreu quanto ao posicionamento da espécie *A. heterolepis*. Nesta filogenia molecular *A. heterolepis* é proposto como basal a todas as demais espécies de *Acestorhynchus*. Na filogenia morfológica é apresentado em duas posições possíveis; em uma delas é proposto como grupo irmão de seu clado 4 (correspondente ao nosso clado A) e na outra é proposto como grupo irmão de seu clado 3 (correspondente ao nosso clado C).

Conforme discutido anteriormente, os três grandes cladogramas internos que são propostos para a filogenia do gênero *Acestorhynchus*, reúnem dentro deles as mesmas espécies, tanto nas nossas análises moleculares quanto nas análises morfológicas, mas as relações entre as espécies que fazem parte de cada um desses cladogramas apresentaram algumas diferenças entre as duas hipóteses.

O clado A da nossa análises (correspondente ao clado 4) teve suas relações estabelecidas, enquanto nas análises baseadas em caracteres morfológicos esse clado apresentou-se como uma politomia.

O clado B deste trabalho propõe que *A. grandoculis* e *A. minimus* são um grupo irmão e que estas duas espécies são ligadas ao clado formado por *A. microlepis* grupo irmão de *A. britskii*: ((*A. grandoculis*, *A. minimus*) (*A. microlepis*, *A. britskii*)) (figura 12). Já na filogenia morfológica *A. grandoculis* e *A. minimus* também são propostas formando um grupo irmão mas *A. microlepis* e *A. britskii* são propostas respectivamente nessa ordem como basais dentro desse clado:

(((*A. grandoculis*, *A. minimus*) *A. microlepis*) *A. britskii*) (figura 11).

5.3- Padrões de Coloração

As análises moleculares corroboram, assim como as morfológicas, o agrupamento das espécies de acordo com o seu padrão de coloração, conforme havia sido proposto por Menezes (1969), Menezes e Géry (1983), Toledo-Piza e Menezes (1992).

O clado A reúne todas as espécies que apresentam mancha umeral, sendo composto pelas espécies do grupo *lacustris*, nos quais a mancha umeral é arredondada, mais *A. falcatus* que apresenta uma mancha umeral verticalmente alongada (Figuras 5 e 8). A observação deste clado os mostra que todas as espécies com mancha umeral formam um grupo monofilético dentro de *Acestrorhynchus* com base nos dados moleculares, e que dentro deste grupo, as espécies com mancha umeral arredondada (grupo *lacustris*) são propostas como monofiléticas.

No clado B estão presentes *A. grandoculis* e *A. microlepis*, que apresentam uma pequena mancha escura imediatamente posterior ao opérculo, e tradicionalmente são incluídos no chamado grupo *microlepis* (Figura 7). Além destas espécies, o clado B inclui duas outras espécies, *A. minimus* e *A. britskii*, ambas sem a presença da mancha (figura 12). As espécies *A. microlepis* e *A. grandoculis* (Figura 7) não são propostas como um grupo monofilético dentro deste clado.

Das espécies do grupo *nasutus*, que têm como coloração característica listras longitudinais ao longo do corpo (*A. nasutus*, *A. maculipinna* e *A. isalineae*) (Figura 8), somente *A. nasutus* foi incluído nesta análise. *Acestrorhynchus nasutus*, e *A. falcistrotris* são propostos como grupo irmão. Conforme ressaltado anteriormente, o padrão característico de listras longitudinais ao longo do corpo ocorre somente nos exemplares jovens desta última espécie. As outras duas espécies tradicionalmente

incluídas no grupo *nasutus* (*A. maculipinna* e *A. isalineae*) não foram incluídas na presente análise

5.4- O Grupo *lacustris*

O grupo *lacustris* composto por *A. abbreviatus*, *A. altus*, *A. pantaneiro* e *A. lacustris* é caracterizado pela presença de uma mancha umeral arredondada bem definida. De acordo com Menezes, (1992) as espécies desse grupo apresentam um modelo de distribuição alopátrica, sendo que *A. altus* encontra-se presente nos rios e lagos da Ilha de Marajó e no baixo e médio Amazonas; *A. abbreviatus*, encontra-se presente nos rios da parte superior da bacia amazônica e no rio Madeira em Rondônia; *A. lacustris*, está presente na bacia do rio São Francisco e nos rios da bacia do alto Paraná; e *A. pantaneiro*, está presente nas bacias dos rios Paraguai, Prata, Uruguai, baixo Paraná e, possivelmente na bacia do rio Mamoré na Bolívia

Segundo estudos morfológicos, estas espécies são diagnosticadas com base principalmente em contagem do número de escamas ao redor do pedúnculo caudal e na linha transversal do corpo, aliado a diferenças nos tamanhos relativos das manchas umeral e formato da cauda (Figura 6) (MENEZES, 1992).

Um estudo em andamento (Iglesias, comun. pessoal) baseado em número maior de exemplares do que o analisado por Menezes (1992), tem mostrado uma grande sobreposição nas contagens das escamas em exemplares das diversas bacias geográficas, dificultando a diferenciação entre as espécies *A. altus*; *A. lacustris* e *A. pantaneiro*. Além disso, um grande número de exemplares do rio Madeira, não possui as características de *A. abbreviatus* (nadadeira peitoral atingindo a origem da nadadeira pélvica), única espécie do grupo registrada naquela drenagem.

Os 104 caracteres morfológicos analisados por Toledo-Piza, (no prelo) em sua filogenia, mostraram-se insuficientes para resolver as relações filogenéticas do clado que contém as espécies desse grupo. Os exemplares de cada uma das espécies desse grupo, vindos de diferentes regiões do Brasil (Anexos 1 e 2), apresentaram suas seqüências de nucleotídeos praticamente idênticas para o gene 16S, e muito similares para os genes S7 e ATPase (Tabelas 4, 5, 6, 7, 8 e 9). As divergências nucleotídicas entre as espécies do grupo *lacustris* são consideravelmente menores do que as divergências nucleotídicas encontradas entre as demais espécies do gênero *Acestrorhynchus*. Sendo assim, os dados obtidos na molecular salientam a necessidade de uma maior compreensão a respeito da classificação e da distribuição das espécies do grupo *lacustris*. Embora se observe uma relação geral entre divergência genética e separação taxonômica (THORPE, 1982) essa correlação é táxon específica, de forma que nem sempre é possível relacionar um determinado nível de divergência a um nível taxonômico específico, como gênero ou espécie (AVISE e JOHNS, 1999).

5.5- *Acestrorhynchus falcatus*

Acestrorhynchus falcatus, que apresenta como padrão de coloração uma mancha umeral verticalmente alongada, é uma espécie de ampla distribuição na bacia amazônica, ocorrendo também na bacia do rio Pindaré-Mearim (MA), no rio Paraguaçu (BA), e na bacia do rio Paraguai, além dos rios da bacia do Orinoco e das Guianas.

Menezes (1969) propôs a existência de duas subespécies para *A. falcatus* (*A. f. falcatus* e *A. f. varius*), com base na variação do número de escamas e proporções

corporais. Atualmente um estudo visando verificar se existe mais de uma espécie no complexo *A. falcatus* está sendo conduzido por Iglesias (comun. pessoal).

5.6- Eventos de Diminuição do Tamanho Corporal

A grande variação do tamanho corporal das espécies que compõem o gênero *Acestrorhynchus* é uma das características mais interessantes desse táxon, com espécies que não ultrapassam os 10cm e outras com mais de 30cm (Figura 14).

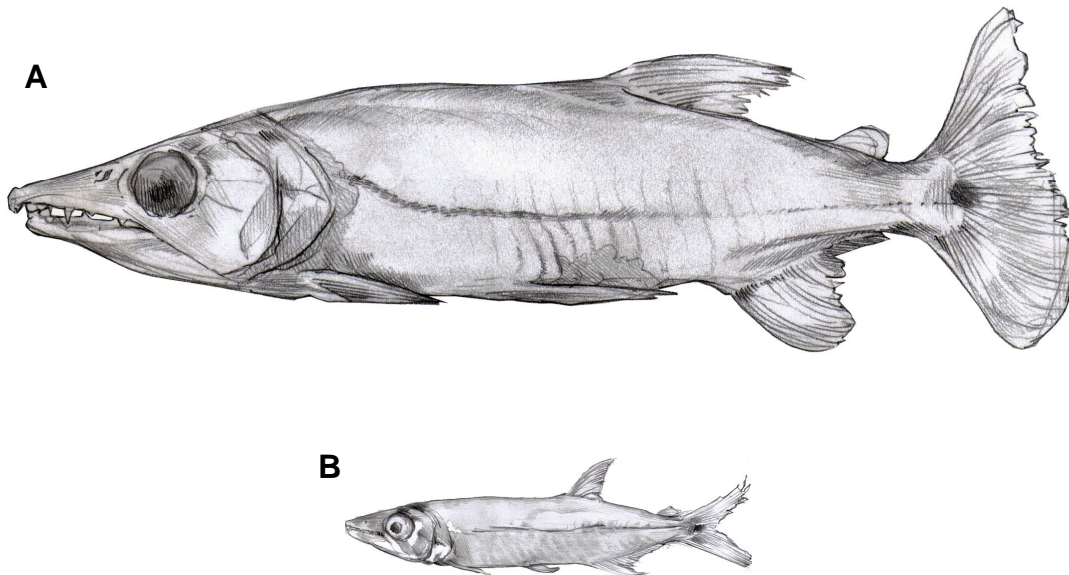


Figura 14- Proporção da variação de tamanho entre os exemplares do gênero *Acestrorhynchus*. A- *A. heterolepis* (comprimento padrão 140 mm). B- *A. minimus* (comprimento padrão 70 mm).

O estudo realizado por Toledo-Piza (no prelo), evidenciou a ocorrência de dois eventos independentes de redução do tamanho corporal, um apresentado no clado 7 composto por *A. grandoculis* e *A. minimus* e o outro ocorrido no clado 5 formado por *A. nasutus* e *A. isalineae* (Figura 11).

Os resultados obtidos na análise do presente trabalho também evidenciam dois eventos independentes de redução do tamanho corporal, sendo um deles apresentado no clado B formado por *A. grandoculis* e *A. minimus* (assim como nas análises de Toledo-Piza (no prelo)). O outro evento de redução do tamanho corporal é o de *A. nasutus* que é proposto no clado C como grupo irmão de *A. falcistrostris* (Figura 12). A inclusão das demais espécies de tamanho reduzido (*A. isalineae* e *A. maculipinna*) possibilitaria a verificação do número de eventos de redução do tamanho corporal no gênero.

5.7- *Acestrorhynchus abbreviatus*

Conforme discutido anteriormente as espécies do grupo *lacustris* no qual é incluído *A. abbreviatus*, são muito parecidas morfológicamente (TOLEDO-PIZA, no prelo). Nesta análise molecular foi utilizado um exemplar proveniente do rio Madeira, que apresentava mancha umeral arredondada, característica do grupo *lacustris*. A única espécie do grupo *lacustris* registrada até o momento naquela drenagem é *A. abbreviatus*, porém com base em características morfológicas externas o exemplar assemelha-se mais a *A. pantaneiro*, e a análise molecular mostrou uma grande similaridade entre as seqüências desse exemplar proveniente do rio Madeira com outros dois exemplares de *A. pantaneiro* com identificação confirmada utilizados nessa análise (Tabelas 4, 5, 6, 7, 8 e 9). Na falta de um exemplar de *A. abbreviatus* com identificação confirmada é impossível afirmar se este exemplar proveniente do rio Madeira apresenta suas seqüências mais similares às seqüências de *A. pantaneiro* ou às de *A. abbreviatus*. Mas, além da grande similaridade morfológica entre o exemplar proveniente do rio Madeira e *A. pantaneiro*, os índices de

divergência nucleotídica próximos de zero entre os três genes analisados (índice de divergência de 0,002, 0,001 e 0,007 para os genes 16S, ATPase e S7 respectivamente) são fortes indicadores de que a espécie *A. pantaneiro* pode não estar restrita às bacias dos rios Paraguai, Prata e Mamoré conforme descrito na literatura (MENEZES, 1992), mas que possa também ocorrer na drenagem do rio Madeira.

6- Conclusões

A análise simultânea baseada nos genes mitocondriais 16S e ATPase, juntamente com o gene nuclear S7, mostrou-se eficiente para resolução das relações filogenéticas dentro do gênero *Acestrorhynchus*, estabelecendo as relações entre os exemplares do chamado grupo *lacustris* e sendo capaz de definir o posicionamento de *A. heterolepis* abrangendo os principais objetivos deste trabalho.

Mais uma vez foram encontradas evidências de que os padrões de colorido do corpo desses animais devem estar diretamente relacionados com a evolução deste gênero. Isto porque assim como a análise de Toledo–Piza (no prelo), os resultados do presente trabalho agrupam as espécies do gênero *Acestrorhynchus* de acordo com seu padrão de coloração.

A análise molecular evidenciou a existência de no mínimo dois eventos independentes de redução do tamanho corporal entre as espécies de *Acestrorhynchus*, corroborando os resultados morfológicos.

Um dos resultados mais interessantes, mostrou a necessidade de um maior conhecimento da distribuição geográfica e da taxonomia de algumas espécies do gênero *Acestrorhynchus*, pela ocorrência comum de identificações duvidosas devido à sobreposição de características entre algumas espécies, em especial aquelas que compõem o grupo *lacustris*. O fato de os exemplares de *A. altus*, *A. aff. pantaneiro*, *A. pantaneiro* e *A. lacustris*, membros do grupo *lacustris*, apresentarem suas seqüências com índices de divergência muito baixos, evidenciou ainda mais essa necessidade.

Novas análises, com um número maior de exemplares de cada uma das espécies e com exemplares de diferentes localidades devem ser realizadas, com o intuito de

se verificar mais detalhadamente para cada uma das espécies a sua composição nucleotídica.

7- Bibliografia

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J.Mol.Biol.**, v.215, p.403-410, 1990.
- AMORIM, D. S. **Elementos Básicos de Sistemática Filogenética**. Segunda Edição. Ed. Holos, Ribeirão Preto, SP, 1997.
- AVISE, J.C.; Tem unorthox prespectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. **Annu. Rev. Genet.**, v.25, p.45-69, 1991.
- AVISE, J.C.; JOHNS, G.C. Proposal for a standardized temporal scheme of biological classification of extant species. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, p.7358-7363, 1999.
- BAKER, R.; DeSALLE, R. Multiple sources of character information and the phylogeny of Hawaiian drosophilids. **Syst. Biol.**, v.46, p.654-673, 1997.
- BREMER, K. The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. **Evolution**, v.42, p.795-803, 1988.
- BREMER, K. Branch support and tree stability. **Cladistics**, v.10, p.295-304, 1994.
- BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. **Manual de identificação para os peixes da região de Três Marias. (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco)**. 1ª edição, Câmara dos Deputados, Brasília, DF, 115p, 1984.
- BUCKUP, P.A. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of Characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S.; (org). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Ed. Edpuhrs, Porto Alegre, RS, 1998.
- CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S.A.; DeSALLE, R. Relationships among Characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Mol. Phyl. Evol.**, v.36-1, p.135-153, 2005.
- CASTRO, R.M.C.; VARI, R.P.; VIEIRA, F.; OLIVEIRA, C. Phylogenetic analysis and redescription of the genus *Henochilus* (Characiformes: Characidae). **Copeia**, v.3, p.496-506, 2004.
- CHEN, W.J.; BONILLO, C.; LEOINTRE, G. Repeatability of clades as a criterion of reliability: a case study for molecular phylogeny of Acanthomorpha (Teleostei) with larger number of taxa. **Mol. Phyl. Evol.**, v.26, p.262-288, 2003.
- CHOW, S.; HAZAMA K. Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. **Mol. Ecol.**, v.7, p.1247-1263, 1998.
- DOYLE, J.J. Gene trees and species trees: Molecular systematics as one-character taxonomic. **Syst. Bot.**, v.17, p.144-163, 1992.
- EFFRON, B.; HALLORAN, E.; HOLMES, S. Booststrap confidence levels for phylogenetic trees. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.93, p.13429-13434, 1996.

- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p.783-791, 1985.
- GATESY, J.; O'GRADY, P.; BAKER, R.H. Corroboration among data sets in simultaneous analysis: hidden support for phylogenetic relationships among higher level Artiodactyl taxa. **Cladistic**, v.15, p.271-313, 1999.
- GÉRY, J. **Characoids of the world**. T. F. H. Publications Inc, Neptune City, 1977. 672p.
- GREENWOOD, P.H.; ROSEN, D.E.; WEITZMAN, S.H.; MYERS, G.S. Phylogenetic studies of teleostean fishes with a provisional classification of living forms. **Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.**, v. 131, p. 339-456, 1966.
- HASAGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **J. Mol. Evol.**, v.22, p.160-174, 1985.
- HARRISON, R.G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. **Trends Ecol. Evol.**, V.4, p.6-11, 1989.
- HENNIG, W. **Grundzuge einer theorie der phylogetischen systematik**. Deutscher Zentralverlang, Berlin, 1950.
- HENNIG, W. **Phylogenetic Systematics**. University of Illinois Press, Urbana, Ill, 1966.
- HRBEK, T.; SECKINGER, J.; MEYER, A. A phylogenetic and biogeographic perspective on the evolution of poeciliid fishes. **Mol. Phyl. Evol.**, v.43, p.986-998, 2007.
- HILLIS, D.M.; BULL, J.J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Syst. Biol.**, v.42, p.182-192, 1993.
- HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. **Molecular Systematics**. 2^a ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1996.
- JENNER, R.A. Morphological phylogenetics in a molecular millennium. **Syst. Biol.**, v.53, p.333-342, 2004.
- KOCHER, T.D.; THOMAS, W.K.; MEYER, A.; EDWARDS, S.V.; PÄÄBO, S.; VILLABLANCA, F.X.; WILSON, A.C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, p.6196-6200, 1989.
- LAVOUÉ, S.; SULLIVAN, J.P.; HOPKINS, C.D. Phylogenetic utility of the first two introns of the S7 ribosomal protein gene in African electric fishes (Momyroidea: Teleostei) and congruence with other molecular markers. **Biol. J. Linn. Soc.**, v.78, p.273-292, 2003.
- LEWIN, R. **Patterns in evolution: the new molecular view**. Scientific American Library, 1997.
- LI, W.H. **Molecular Evolution**. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, 1997.
- LI, C.; ORTÍ, G.; ZHANG, G.; LU, G. A practical approach to phylogenomics: the phylogeny of ray-finned fish (Actinopterygii) as a case study. **BMC Evolutionary Biology**, v.7, p.44, 2007.
- LOWE-McCONNELL, R.H. **Fish communities in tropical freshwaters**. Longman Publishing, New York, 1975.

- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H, WINEMILLER, K.O. Morphological variation in *Acestrorhynchus microlepis* and *A. falcatus* (Characiformes: Acestrorhynchidae), reassessment of *A. apurensis* and distribution of *Acestrorhynchus* in Venezuela. **Ichth. Exp. Fresh.**, v.14(3), p.193-208, 2003.
- LUCENA, C.; MENEZES, N.A. A phylogenetic analysis of *Roestes* Günther and *Gilbertolos*, with a hypothesis on the relationships of the Cynodontidae and Acestrorhynchidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S.; (org). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Ed. Edpuhrs, Porto Alegre, RS, 1998.
- LUNDBERG, J.G. The temporal context for the diversification of neotropical fishes. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. ; (org). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Ed. Edpuhrs, Porto Alegre, RS, 1998.
- LUNDBERG, J.G.; KOTTELAT, M.; SMITH, G.R.; STIASSNY, M.L.J.; GILL, A.C. So many fishes, so little time: an overview of recent ichthyological discovery in continental waters. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.87(1), p.26-62, 2000.
- MADDISON, W.P.; MADDISON, D. R. **MacClade versão 3: Analysis of phylogeny and character evolution**. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1992.
- MAGO-LECCIA, F. Estudios preliminares sobre la ecología de los peces de los ilanos de Venezuela. **Act. Biol.**, Venezuela, v.7 (1), p. 71-102, 1970.
- MARTIN, A.P.; PALUMBI, S.R. Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.4087-4091, 1993.
- McVEIGH, H.P.; BARLETT, S.E.; DAVIDSON, W.S.; Polymerase chain reaction/direct sequence analysis of the cytochrome b gene in *Salmo salar*. **Aquaculture**, v.95, p.225-223, 1991.
- MENEZES, N.A. Systematics and evolution of the tribe Acestrorhynchini (Pisces, Characidae). **Arquivos de Zoologia**, v.18, p.1-150, São Paulo, SP, 1969.
- MENEZES, N.A.; GÉRY, J. Seven new *Acestrorhynchin* characid species (Osteichthyes, Ostariophysi, Characiformes) with comments on the systematic of the group. **Revue Suisse Zoologie**, v.90, p.563-592, 1983.
- MENEZES, N.A. Redefinição taxonômica das espécies de *Acestrorhynchus* do grupo *lacustris* com a descrição de uma nova espécie (Osteichthyes, Characiformes, Characidae). **Comum. Mus. Ciênc.**, PUCRS (série zoologia), v.5-5, p.39-54, 1992.
- MENEZES, N.A. Acestrorhynchidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS Jr. C.J. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS-Jr, C.J.; (org). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Ed. Edipucrs, Porto Alegre, RS, 742p, 2003.
- MEYER, D. Análise filogenética de seqüências de DNA. In: AMORIM, D. S. ; (org). **Elementos Básicos de Sistemática Filogenética**. Segunda Edição. Ed. Holos, Ribeirão Preto, SP, 1997.
- NELSON, J.S. **Fishes of the world**. Fourth edition. John Wiley & Sons, Inc., USA. 601p, 2006.

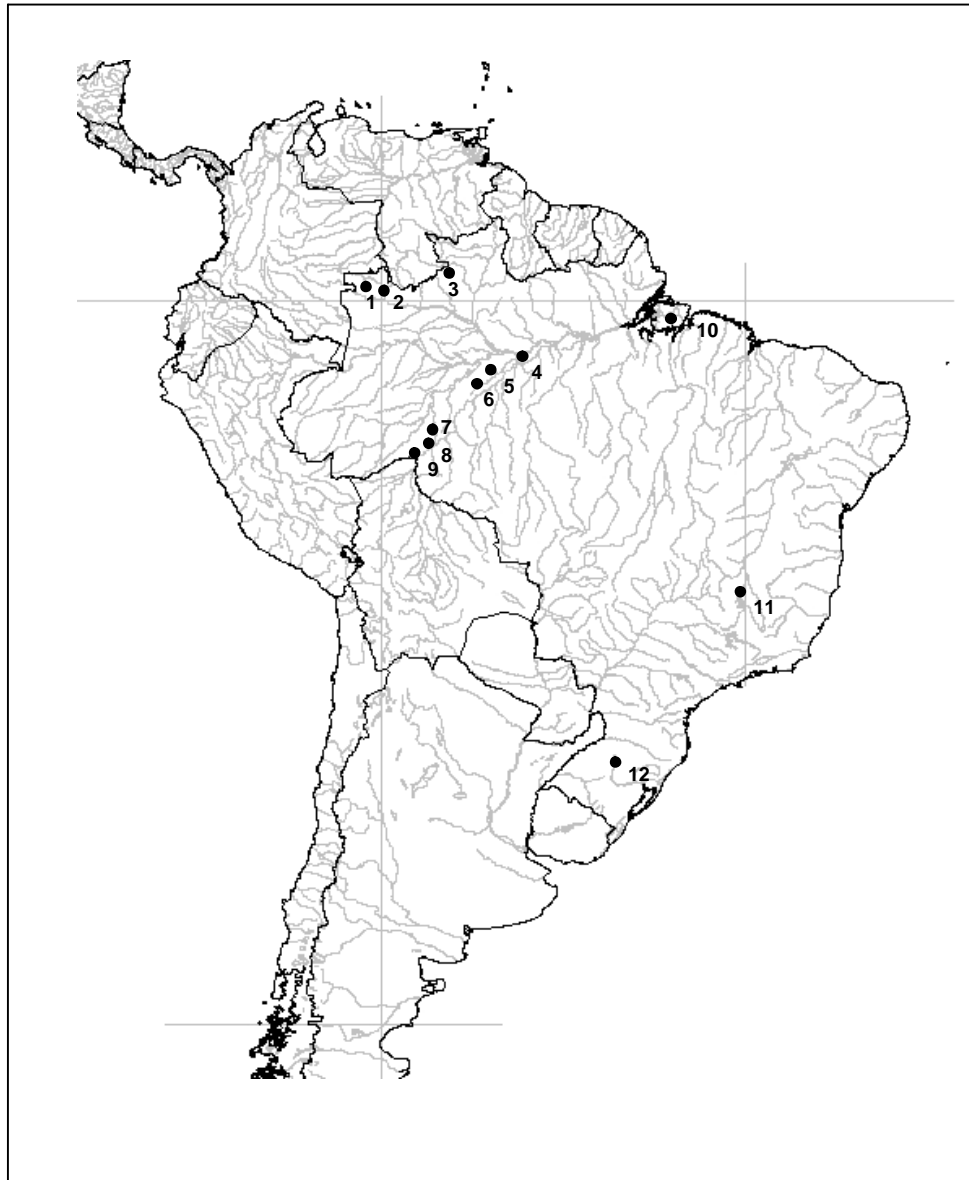
- ORTÍ, G.; MEYER, A. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. **Syst. Biol.**, v.46, p.75-100, 1997.
- PALUMBI, S.R. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K.; (org). **Molecular Systematics**. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA, 1996.
- PATERSON, C. Homology in classical and molecular biology. **Mol. Biol. Evol.**, v.5, p.603-625, 1988.
- PEREIRA, S.L.; BAKER, A.J.; WAJNTAL, A. Combined nuclear and mitochondrial DNA sequences resolve generic relationships within the Cracidae (Galliformes, Aves). **Syst. Biol.**, v.51, p.946-958, 2002.
- PHILLIPS, A.; JANIES, D.; WHEELER, W. Multiple sequence alignment in phylogenetic analysis. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.16, p.317-330, 2000.
- POSADA, D.; CRANDALL, K.A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics Appl. Notes**, v.14, p.817-818, 1998.
- REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS-Jr, C.J.; (org). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Ed. Edipucrs, Porto Alegre, RS, 742p, 2003.
- SANDERSON, M.J.; SHAFFER, H.B. Troubleshooting molecular phylogenetic analyses. **Rev. Ecol. Syst.**, v.33, p.49-72, 2002.
- SCHAEFER, S.A. Conflict and resolution: Impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical Cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S.; (org). **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Ed. Edpucrs, Porto Alegre, RS, 1998.
- SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética: um guia prático**. 2ª edição. Ed. Holos, 114p. Ribeirão Preto, S.P., 2003 (a).
- SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética: um guia prático**. 1ª edição. Ed. Holos, 114p. Ribeirão Preto, S.P., 2003 (b).
- SCHUH, R.T. **Biological systematics: principles and applications**. Cornell University Press, 236p, 2000.
- SORENSEN, M.D. **TreeRot, version 2**. Boston University, Boston, MA, 1999.
- STRAUSS, E. Can mitochondrial clocks keep time? **Science**, v.283, p.1435-1438, 1999.
- SUNEETHA, K.B.; DAHLE, G.; NAEVDAL, G. Analysis of mitochondrial DNA sequences from two *Maurollicus* taxa: evidence for separate species? **J. Fish Biol.**, v.57, p.1605-1609, 2000.
- SWOFFORD, D.L.; OLSEN, G.J.; WADDELL, P.J.; HILLIS, D.M. Phylogenetic inference. In: HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K.; (org). **Molecular systematics**. 2ª ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1996.
- SWOFFORD, D.L. **Phylogenetic analysis using parsimony** (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 2000.

- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in human and chimpanzees. **Mol. Biol. Evol.**, v.10, p.512-526, 1993.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, v.24, p.1596-1599, 2007.
- TOLEDO-PIZA, M.; MENEZES, N.A. Taxonomic redefinition of the species of the *Acestrorhynchus* of the *microlepis* group with the description of *Acestrorhynchus apurensis*, a new specie from Venezuela (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). **Am. Mus. Novitates**, v.3160, p.1-23, 1996.
- TOLEDO-PIZA, M. Phylogenetic relationships among *Acestrorhynchus* species (Ostariophysi: Characiformes: Acestrorhynchidae). **Zoo. Journ. Linn. Soc.**, (no prelo).
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAC, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, v.24, p.4876-4882, 1997.
- THORPE, J.P. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v.13, p.139-168, 1982.
- VARI, R.P.; MALABARBA, L.R. Neotropical Ichthyology: an overview. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S.; (org). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Ed. Edpuhrs, Porto Alegre, RS, 1998.
- VARI, R.P.; MALABARBA, L.R. Neotropical Ichthyology: an overview. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S.; (org). **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Ed. Edpuhrs, Porto Alegre, RS, 1998.
- WEITZMAN, S.H.; MALABARBA, L.R. Perspectives about the phylogeny and classification of the Characidae (Teleostei: Characiformes). In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.; (org). **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Ed. Edpuhrs, Porto Alegre, RS, 1998.
- WEITZMAN, S.H.; VARI, R.P. Miniaturization in South American freshwater fishes: an overview and discussion. **Proc. Biol. Soc.Wash**, v.101, p.444-465, 1988.
- WILEY, E.O. **Phylogenetics- the theory and practice of phylogenetic systematics**. New York, 439p, 1981.

Anexos

Localidades de coleta e número de tomo dos exemplares utilizados nesta análise.

Espécie	Número de Tombo	Localidade
<i>A. microlepis</i>	Não catalogado	Igarapé Jatuarana II
<i>A. microlepis</i>	UNIR 0010	Abunã
<i>A. aff. falcatus</i>	INPA 22601	Simão Grande
<i>A. aff. pantaneiro</i>	INPA 25984	Cautário
<i>A. falcatus</i>	MZUSP 85762	Rio Preto da Eva/ AM
<i>A. falcatus</i>	Não catalogado	
<i>A. pantaneiro</i>	MZUSP 94471	Passo Silvestre, 1º Distrito de Itaqui/ RS
<i>A. pantaneiro</i>	MZUSP 94471	Passo Silvestre, 1º Distrito de Itaqui/ RS
<i>A. heterolepis</i>	Não catalogado	Igarapé Arara
<i>A. heterolepis</i>	UNIR 0009	Abunã
<i>A. falcistrostris</i>	INPA 25979	Abunã
<i>A. nasutus</i>	MZUSP 94454	Igarapé lá Mirim/ São Gabriel da Cachoeira/ AM
<i>A. britskii</i>	MZUSP 94465	Represa de. Três Marias/ Três Marias/ MG
<i>A. britskii</i>	MZUSP 94465	Represa de. Três Marias/ Três Marias/ MG
<i>A. lacustris</i>	MZUSP94464	Represa de. Três Marias/ Três Marias/ MG
<i>A. lacustris</i>	MZUSP 94463	Rio São Francisco/ Três Marias/ MG
<i>A. altus</i>	MZUSP 94456	Cachoeira do Ararí/ Ilha de Marajó/ PA
<i>A. altus</i>	MZUSP 94456	Cachoeira do Ararí/ Ilha de Marajó/ PA
<i>A. grandoculis</i>	MZUSP 92130	Rio Tiquié/ Serra de Mucura
<i>A. minimus</i>	LBP 4194	Rio Negro/ Barcelos/ AM
<i>A. minimus</i>	LBP 4194	Rio Negro/ Barcelos/ AM
<i>Rhaphiodon</i>	Não catalogado	Rio Paraná/ Repr. Jupia/ Três Lagoas/ MT
<i>Roeboides</i>	AMNH 233430	Aquarista
<i>Gephyrocharax</i>	AMNH 233275	Rio Cheio/ Bolívia



Localidades de coleta dos exemplares do gênero *Acestrorhynchus* utilizados nesta análise. Pontos: 1- *A. grandoculis*; 2- *A. nasutus*; 3- *A. minimus*; 4- *A. falcatus*; 5- *A. microlepis*; 6- *A. aff.falcatus*; 7- *A. microlepis*, *A. falcirostris* e *A. heterolepis*; 8- *A. heterolepis*; 9- *A. aff.pantaneiro*; 10- *A. altus*; 11- *A. britskii* e *A. lacustris*; 12- *A. pantaneiro*.