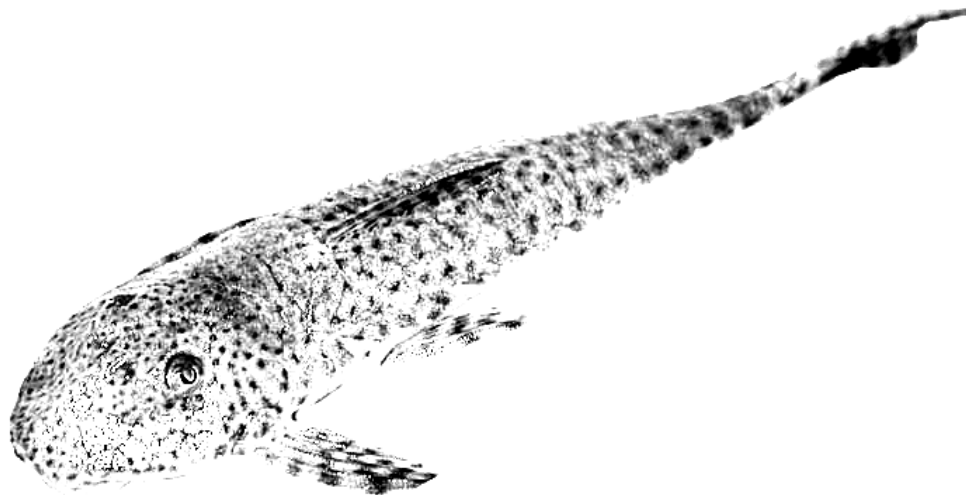


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ZOOLOGIA

Guilherme José da Costa Silva

**Análise filogenética entre gêneros da subfamília Loricariinae
(Siluriformes: Loricariidae) com ênfase no gênero *Harttia*,
baseada em caracteres moleculares**



ORIENTADOR: Prof. Dr. Claudio de Oliveira

Botucatu

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

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

Guilherme José da Costa Silva

Análise filogenética entre gêneros da subfamília Loricariinae
(Siluriformes: Loricariidae) com ênfase no gênero *Harttia*,
baseada em caracteres moleculares.

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Claudio de Oliveira

Botucatu - SP

2009

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

Silva, Guilherme José da Costa.

Análise filogenética entre gêneros da subfamília Loricariinae (Siluriformes: Loricariidae) com ênfase no gênero *Harttia*, baseada em caracteres moleculares / Guilherme José da Costa Silva. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (mestrado) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Claudio de Oliveira

Assunto CAPES: 20400004

1. Peixe - Filogenia 2. Zoologia

CDD 597

Palavras chave: Biogeografia; Filogenia Molecular; *Harttia*; Loricariinae; Peixes

Agradecimentos

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

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

Aos meus pais, José Carlos e Mariza, às minhas irmãs, Cris e Carol, que tanto me apoiaram e me ajudaram em toda minha vida. Nada seria possível sem vocês. Aos meus sobrinhos queridos, Caian, Otto e Inaiá. Também aos meus cunhados Flávio e Adinan pela amizade.

Agradeço à Débora (Ozark), minha namorada linda, que não só me ajudou na redação como também me deu carinho, apoio e força para continuar em frente. Agradeço também a Marlene e Rafael e Guilherme pelo apoio e amizade.

Aos amigos de Minas Júlio, Diego e Rafael.

Agradeço a Todos meus familiares. Em especial meus tios José Marcos, Paulo, Maria José e Marcos pela grande participação em minha criação. Agradeço também ao meu primo Rafael pela amizade de sempre.

Aos amigos de faculdade Renato (Lag) e Bárbara (Babú) pela parceria, amizade e ensinamentos durante nossa trajetória juntos.

Aos meus colegas de trabalho e amigos, pelo incentivo e momentos de descontração, Adriana (Adrianinha), Alex (Alf), Ana Paula, Andréia Alves, Bruno (Guiodai), Celso (Celsão), César Martins, Cláudia (Claudinha), Clivia (Thuthuka), Cristiane (Cris), Daniela (Dani), Danilo, Débora, Elisa (Meketrefe), Ernesto, Fábio (Fio), Fernando (Konrado), Gláucia (Anfetamina), Gleisy, Emanuel (mané), Guilherme (Karunxo), Gustavo, Heleno, Heraldo, Igor (Brecha), José Carlos (Zéca), José Eduardo (Zé), José Luís (Zé), Jefferson (Menudo), Juliana (Julianinha), Júlio, Kelly, Lessandra, Luis Henrique (Japonês), Luiz Ricardo, Luiz (Zirigui), Márcio, Mahmoud, Marlon, Maressa, Marina, Mauro, Natália, Patrícia, Paulo Vênere, Ricardo (Japa), Ricardo Benine, Rosangela, Tatiane (Tati), Waldo, Welley e Vanessa.

Em especial para Fio, Kelly, Mané, Marlon, Marcio e Zirigui pela ajuda tanto na

parte de redação como na interpretação dos dados.

Aos companheiros de república Júlio e Inútil pela amizade e companheirismo.

Aos membros da banca examinadora.

Ao Osvaldo Oyakawa pela colaboração na identificação das espécies, pelas contribuições nas discussões, dedicação e palavras de incentivo para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Renato Devidé em Ricardo Texeira, pela ajuda técnica e amizade.

Aos museus de Zoologia da USP e de Genebra pelas amostras e seqüências fornecidas

Ao pessoal da Suíça, Juan, Raphael e Sônia pela ajuda e colhimento durante minha estadia.

Ao Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, ao Departamento de Morfologia, à Pós Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Zoologia, ao Instituto de Biociências e à Universidade Estadual Paulista (UNESP) e a Botucatu que tornaram possível o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao FAPESP, pela concessão de bolsa e reserva técnica CNPq, e CAPES pelo apoio ao desenvolvimento do projeto.

Por último, agradeço novamente a Deus por colocar todas essas pessoas maravilhosas em minha vida.

Resumo

A família Loricariidae, uma das mais especiosas famílias de peixes do mundo, com cerca de 700 espécies, tem sido objeto de vários estudos taxonômicos e sistemáticos, o que tem auxiliado na compreensão da diversidade e dos padrões gerais de relacionamento entre seus gêneros e espécies. Todavia, dada a ampla diversidade do grupo, muitos dos problemas da família ainda estão por serem resolvidos. Dentro de Loricariidae, a subfamília Loricariinae tem sido reconhecida como um grupo monofilético, porém o conhecimento da relação entre seus gêneros é ainda incipiente. Atualmente essa subfamília compreende cerca de 210 espécies distribuídas em 31 gêneros encontrados na América Central e do Sul. O presente trabalho teve como objetivo principal procurar ampliar o conhecimento sobre a diversidade e os padrões de relacionamento dos gêneros da subfamília Loricariinae e em especial estudar as relações entre espécies do gênero *Harttia*. Para isso foram analisadas quatro matrizes de dados, construídas a partir de seqüências parciais do gene nuclear F-Reticulon 4 e dos genes mitocondriais COI, 16S e 12S mais o RNA transportador da Valina que existe entre eles. Cada matriz foi construída com um conjunto de genes e de amostras particulares, para testar diferentes hipóteses. Graficamente, pela análise de transversão e transição, observou-se que os conjuntos de dados não se encontram saturados, possibilitando seu emprego para análise filogenética. Amostras das subfamílias Hypoptopomatinae, Neoplecostominae, Delturinae e Hypostominae foram utilizadas como grupo externo nas diferentes análises. As hipóteses de relacionamento filogenético obtidas por Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança apresentaram topologias idênticas em todas as análises, tendo sido testadas estatisticamente pela técnica de *bootstrap*. Os resultados corroboram as hipóteses de relacionamento biogeográficas obtidas a partir de caracteres mitocondriais e morfológicos, presentes na literatura. Podemos concluir, a partir de nossas análises, que a subfamília Loricariinae é um grupo monofilético e grupo irmão de Hypostominae + Hypoptopomatinae + Neoplecostominae. *Harttia* é um grupo monofilético e irmão do grupo composto por Sturisomini e Loricariini. A partir das filogenias obtidas é possível propor que eventos de captura de cabeceiras devem ter tido grande importância na diversificação de espécies de *Harttia* do Sudeste Brasileiro.

Palavra chave: *Harttia*, Loricariinae, Filogenia Molecular, Biogeografia e Peixes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 MATERIAIS.....	19
3.2 MÉTODOS.....	24
3.2.1 Extração de DNA Genômico.....	24
3.2.1.1 Extração por Fenol-Clorofórmio (SAMBROOK <i>et al.</i> ,2001).....	24
3.2.1.2 Extração por Tampão de extração (ALJANABI & MARTINEZ, 2001).....	25
3.2.1.3 Extração por Kit Comercial (“DNeasy Tissue Kit” – Qiagen Peqlab).....	26
3.2.2 Amplificação dos Segmentos de DNA.....	28
3.2.2.1 Amplificação dos genes mitocondriais.....	29
3.2.2.2 Amplificação do gene nuclear.....	30
3.2.3 Purificação das Amostras Amplificadas.....	33
3.2.4 Reação de PCR para Seqüenciamento.....	35
3.2.5 Limpeza do PCR de Seqüenciamento.....	36
3.2.6 Seqüenciamento de DNA.....	37
3.2.7 Obtenção de seqüências consenso.....	38
3.2.8 Alinhamento das seqüências e Análise dos dados	38
3.2.8.1 Alinhamento das seqüências.....	38
3.2.8.2 Análise dos dados.....	39
4. RESULTADOS.....	42
5. DISCUSSÃO.....	51
5.1. Relação entre os gêneros de Loricariinae.....	51
5.2 Relação entre as espécies de <i>Harttia</i> e implicações biogeográficas.....	54
6. CONCLUSÃO.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

Com o estabelecimento da sistemática filogenética por Willi Hennig em 1950 e sua difusão após a tradução para o inglês em 1966, a classificação biológica tornou-se mais precisa e fundamentada, baseada em regras práticas cujos fundamentos são de origem “biológica e embriológica”, propiciando assim o surgimento de uma nova escola classificatória, a Cladística (MAYR, 1998). Após o surgimento dessa ciência foram possíveis não apenas avanços no que diz respeito à classificação biológica, mas também na compreensão da diversidade biológica e da evolução dos táxons, incluindo suas características morfológicas, fisiológicas, comportamentais e moleculares, o que confere à Cladística o status de ciência organizadora do conhecimento biológico (MAYR, 1998).

Dentro desse enfoque evolutivo, filogenético e biogeográfico os grupos de organismos devem ser propostos, a fim de organizar, delimitar, reconstruir e prever possíveis eventos biológicos que só podem ser compreendidos à luz da evolução.

Entre os organismos conhecidos como cordados um dos maiores grupos existentes é o de peixes neotropicais de água-doce. De mesma magnitude são os problemas filogenéticos, biogeográficos e taxonômicos para esse grupo de animais, que possui uma infinidade de espécies ainda não descritas e vários grupamentos sabidamente não naturais.

A ictiofauna Neotropical de água-doce é bastante rica, incluindo 71 famílias e 4.475 espécies reconhecidamente válidas, segundo (REIS *et al.*, 2003). O estudo dos peixes neotropicais tem-se expandido consideravelmente nos últimos anos (MALABARBA *et al.*, 1998), principalmente após a incorporação de novas técnicas de obtenção e interpretação de dados, entre as quais está o uso da metodologia de análise filogenética. Entretanto, o

relacionamento dentro e entre muitos grupos ainda não é conhecido, sendo necessários estudos adicionais.

Dentro da ordem Siluriformes a superfamília Loricarioidea é considerada o maior grupo monofilético de bagres Neotropicais (DE PINNA, 1998), correspondendo cerca de 60% dos Siluriformes neotropicais. O relacionamento entre as famílias de Loricarioidea é considerado bem determinado (DE PINNA, 1998; BRITTO, 2003). Fazem parte dessa superfamília três das famílias mais especiosas da ordem: Loricariidae (716 espécies), Callichthyidae (194 espécies) e Trichomycteridae (207 espécies) (DE PINNA, 1998; BRITTO, 2003; REIS, 2003; FERRARIS, 2007), além das famílias Astroblepidae, Scoloplacidae e Nematogenyidae, que são monotípicas ou formadas por um pequeno número de espécies (NELSON, 2006).

As espécies da superfamília Loricarioidea estão distribuídas na América do Sul e na América Central, ocorrendo numa grande variedade de habitats, incluindo corredeiras em riachos a 3.000 metros de altitude até ambientes lênticos como lagos. A grande maioria das espécies corresponde a peixes primários de água doce, ou seja, não toleram ambientes salobros e marinhos (NELSON, 2006). Apesar dos membros da superfamília Loricarioidea apresentarem ampla distribuição, muitas espécies são características por formarem populações restritas a pequenas áreas. Isto possivelmente faz com que esta família apresente uma das maiores diversidade de formas de todos os peixes do mundo.

Nas hipóteses de relacionamento entre as famílias de Loricarioidea propostas em de-Pinna (1998) e Britto (2003) as famílias Callichthyidae, Scoloplacidae, Astroblepidae e Loricariidae formam um grupamento monofilético onde Astroblepidae e Loricariidae são

propostas como irmãs. Por outro lado, Trichomycteridae e Nematogenyidae formam outro grupo monofilético irmão dos demais Loricarioidea.

Ao contrário da maioria dos outros bagres, os loricariídeos possuem uma armadura óssea e boca modificada em um disco especializado em sucção. A família Loricariidae, com aproximadamente 716 espécies (FERRARIS, 2007), é a maior em número de espécies entre os Siluriformes e também uma das maiores famílias da ictiofauna mundial, possuindo uma distribuição geográfica semelhante à de Loricarioidea e ocupando diferentes habitats (ARMBRUSTER, 2004; NELSON, 2006).

De acordo com Reis *et al.* (2003) existem seis subfamílias em Loricariidae: Hypoptopomatinae, Loricariinae, Hypostominae, Ancistrinae, Neoplecostominae e Lithogeneinae. Armbruster (2004), em um trabalho realizado com base em caracteres de morfologia externa, osteologia e anatomia do trato digestivo da família Loricariidae, com ênfase nas subfamílias Hypostominae e Ancistrinae, apresentou uma nova hipótese de relacionamento para Loricariidae (Figura 2). Nessa hipótese foi aceita a monofilia da subfamília Loricariinae, assim como sua relação com Hypostominae. Reis *et al.* (2006) descreveram uma nova subfamília basal para Loricariidae, nomeada Delturinae, incluindo o gênero *Delturus* como gênero tipo e *Hemipsilichthys* (agora sinônimo senior de *Upsilonodus* incluindo as espécies *Hemipsilichthys gobio*, *Hemipsilichthys papilatus* e *Hemipsilichthys nimus*). As demais espécies antes pertencentes a *Hemipsilichthys* foram transferidas para o revalidado gênero *Pareiorhaphis*.

Montoya-Burgos *et al.* (1998), elaboraram uma filogenia molecular para cerca de 50 espécies da família Loricariidae, utilizando segmentos de genes 12S e 16S do rRNA mitocondrial (Figura 3). Os resultados mostraram que a família Loricariidae é monofilética,

porém a subfamília Hypostominae e o gênero *Hypostomus* formaram grupos polifiléticos. Esse estudo corroborou a hipótese de que a subfamília Loricariinae é monofilética, porém um número muito pequeno de gêneros foi analisado.

Em um trabalho mais recente realizado a partir de análise de dados de origem molecular foi proposta a elevação da categoria da tribo Otothyridini a subfamília (CHIACHIO *et al.*, 2008) e com isso totalizando sete subfamílias de Loricariidae: Delturinae, Lithogeneinae, Loricariinae, Hypoptopomatinae, Hypostominae, Neoplecostominae e Otothyridinae.

Em todos os trabalhos já citados a monofilia de Loricariinae sempre foi corroborada, entretanto é importante perguntar, o que define Loricariinae?

A subfamília Loricariinae possui como sinapomorfias: o pedúnculo caudal longo e bastante deprimido e a ausência da nadadeira adiposa (COVAIN, 2005), além das demais simplesiomorfias que definem os Loricariidae. Por serem bastante achatados, são popularmente chamados de “acari” e “cascudo chinelo”. Possuem hábito de ficar sobre o substrato inorgânico (rocha, cascalho, areia, silte etc.) ou orgânico (madeira morta, resíduos vegetais, etc.), ocupando desde ambientes lóticos (como exemplo *Harttia*) a lênticos (como exemplo *Loricariichthys*). Sua distribuição é bastante ampla, da Costa Rica até a Argentina. O hábito alimentar dos integrantes de Loricariinae é bastante variado, sendo detritívoro, carnívoro ou herbívoro. A coloração é bastante variada, podendo ser críptica ou chamativa. Apresentam hábitos reprodutivos comportamentais interessantes, existindo, por exemplo, cuidado parental onde os machos encubam os ovos sob o abdômen. O tamanho médio das espécies dentro do grupo também é bastante variado, podendo ter, como em algumas espécies de *Harttia*, aproximadamente 13 cm de

comprimento padrão, e como algumas espécies *Loricaria* ou *Loricariichthys*, que podem atingir cerca de 40 cm de comprimento padrão. Tal diversidade de formas e comportamentos dos loricariíneos faz com que esses peixes possuam um grande potencial para a aquariofilia.

Com a revalidação do gênero *Cteniloricaria* por Reis *et al.* (2003), e sinominização de todos os gêneros e espécies descritas ou revalidadas por Isbrücker (2001), a subfamília Loricariinae passa a abranger 209 espécies divididas em 31 gêneros: *Apistoloricaria* (4 espécies), *Aposturisoma* (1 espécie), *Brochiloricaria* (2 espécies), *Crossoloricaria* (5 espécies), *Cteniloricaria* (3 espécies), *Dasylicaria* (5 espécies), *Dentectus* (1 espécie), *Farlowella* (25 espécies), *Furcodontichthys* (1 espécie), *Harttia* (18 espécies), *Harttiella* (1 espécie), *Hemiodontichthys* (1 espécie), *Ixinandria* (2 espécies), *Lamontichthys* (4 espécies), *Limatulichthys* (1 espécie), *Loricaria* (11 espécies), *Loricariichthys* (17 espécies), *Metaloricaria* (2 espécies), *Paraloricaria* (3 espécies), *Planiloricaria* (1 espécie), *Pseudohemiodon* (7 espécies), *Pseudoloricaria* (1 espécie), *Pterosturisoma* (1 espécie), *Pyxiloricaria* (1 espécie), *Reganella* (1 espécie), *Rhadinoloricaria* (1 espécie), *Ricola* (1 espécie), *Rineloricaria* (47 espécies), *Spatuloricaria* (11 espécies), *Sturisoma* (14 espécies) e *Sturisomatichthys* (4 espécies). Esse número cresce a cada ano com a descrição de novas espécies.

Py-Daniel (1997) propôs a primeira filogenia baseada em caracteres morfológicos para os gêneros de Loricariinae, onde ela aparece como um grupo monofilético (Figura 4). Nesse mesmo trabalho a tribo Harttini e o gênero *Harttia* foram apresentados como monofiléticos, entretanto as relações de parentesco entre as espécies do gênero *Harttia*

utilizadas nas análises não foram muito resolutivas, devido ao pequeno número de espécies e caracteres analisados.

Em Covain *et al.* (2007) também foram estudadas as relações entre os representantes de Loricariinae com base em caracteres morfológicos. Nesse trabalho foram analisados 29 dos 31 gêneros de Loricariinae. A topologia apresentada nesse trabalho diverge da apresentada em Py-Daniel (1997) em alguns aspectos principalmente a respeito das relações entre os gêneros dos grupos menores internos à subfamília. Entretanto diferenças nos grandes grupos internos da subfamília não foram comuns, agrupando, na maioria das vezes, os mesmos conjuntos de gêneros. A única grande divergência é quanto ao gênero *Ixinandria*, que na hipótese de Covain *et al.* (2007) aparece com integrante da tribo Harttiini (Figura 5).

Já em Covain *et al.* (2008), trabalho realizado a partir de análises de dados moleculares, foi proposto um rearranjo na subfamília a nível de tribo, onde o gênero *Harttia* aparece como basal aos demais loricariíneos analisados, sugerindo então que os gêneros *Farlowella*, *Sturisoma*, *Sturisomatichthys* e *Lamontichthys* não mais pertencessem à tribo Harttiini (Figura 6). Contudo, embora esse trabalho seja o mais recente, utilizamos no presente trabalho a nomenclatura proposta em Py Daniel (1997), onde *Farlowella*, *Sturisoma*, *Sturisomatichthys* e *Lamontichthys* ainda pertenciam à tribo Harttiini, mesmo sabendo que é um grupo não natural, com o intuito de apontar características morfológicas compartilhadas por esses gêneros.

Os indivíduos da tribo Harttiini apresentam a base da nadadeira dorsal oposta à base da nadadeira pélvica, possuem 12 (raramente 11) raios ramificados na nadadeira caudal, ausência do pós-orbital, pequena diversidade da forma dos dentes e da estrutura

dos lábios (COVAIN *et al.*, 2005), além das demais simplesiomorfias que definem os Loricariinae. O dimorfismo sexual no grupo aparece na forma de uma hipertrofia dos odontóides nas margens do focinho e algumas vezes na parte superior dos espinhos das nadadeiras peitorais (Figura 1). Dentro de Harttiini a subtribo Harttiina caracteriza-se por apresentar dentes muito filamentosos e lábio posterior com um barbilhão curto de cada lado, estendendo-se para porção latero-posterior dos animais. Sete gêneros pertencem à subtribo Harttiina: *Sturisoma*, *Harttia*, *Lamontichthys*, *Harttiella*, *Pterosturisoma*, *Cteniloricaria*, *Sturisomatichthys* e *Farlowella* (COVAIN *et al.*, 2007). Contudo, em Rapp Py-Daniel & Oliveira (2001) é proposta a sinonimização do gênero *Ctenoloricaria* em *Harttia*, reduzindo o número de gêneros de Harttiina para seis.

O gênero *Harttia* Steindachner 1877 é composto por peixes que compartilham as seguintes características diagnósticas: corpo achatado e pouco quilhado. Também possuem como características grandes placas ao redor do ânus, órbitas arredondas, presença de muitos dentes (60 a 120 em cada dentário), focinho arredondado, barbilhão maxilar pouco desenvolvido ou inexistente e uma nadadeira cauda caudal chanfrada (COVAIN *et al.*, 2006). Além das demais simplesiomorfias que definem Loricariinae. (RAAP PY-DANIEL & OLIVEIRA 2001). Algumas espécies apresentam acentuado dimorfismo sexual e grande quantidade de odontóides na lateral da cabeça e no espinho da nadadeira peitoral (Figura 1).



FIGURA 1. Vista dorsal de um exemplar macho maduro de *Harttia guianensis* apresentando grande quantidade de odontóides no espinho da nadadeira peitoral.

O gênero distribui-se desde a bacia do Orinoco, Venezuela, até a bacia do rio Ribeira de Iguape na região Sudeste do Brasil (PROVENZANO *et al.*, 2005) ocupando ambientes de cabeceiras de rios de diferentes tamanhos e de correnteza variando de média a forte, com grande quantidade de oxigênio dissolvida. Possuem a característica de forrageio sobre superfície de rochas de diferentes tamanhos (COVAIN *et al.*, 2005). Até o momento foram descritas 21 espécies no gênero (Tabela 1).

TABELA 1. Lista das espécies descritas de *Harttia* e suas distribuições em bacias ou subacias.

Espécie	Localidade
<i>Harttia loricariformis</i> Steindachner 1877 (espécie tipo)	Bacia do rio Paraíba do Sul
<i>H. carvalhoi</i> Miranda Ribeiro 1939	Bacia do rio Paraíba do Sul
<i>H. gracilis</i> Oyakawa 1993	Bacia alto rio Paraná
<i>H. kronei</i> Miranda Ribeiro 1908	Bacia do rio Ribeira de Iguape
<i>H. leiopleura</i> Oyakawa 1993	Bacia do rio São Francisco
<i>H. novalimensis</i> Oyakawa 1993	Bacia do rio Das Velhas- São Francisco
<i>H. longipina</i> Langeani Oyakawa & Montoya- Burgos 2001	Bacia do rio Das Velhas-São Francisco
<i>H. torrenticola</i> Oyakawa 1993	Bacia do rio São Francisco
<i>H. rhombocephala</i> Miranda-Ribeiro 1939 (possivelmente extinta)	Bacia Costeira Oriental
<i>H. garavelloi</i> Oyakawa 1993	Bacia do rio Jequitinhonha
<i>H. punctata</i> Rapp-Py Daniel & Oliveira 2001	Bacia do rio Tapajós-Amazonas
<i>H. dissidens</i> Rapp-Py Daniel & Oliveira 2001	Bacia do rio Tapajós-Amazonas
<i>H. duriventris</i> Rapp-Py Daniel & Oliveira 2001	Bacia do rio Tocantins-Araguaia
<i>H. depressa</i> Rapp-Py Daniel & Oliveira 2001	Bacia do rio Uatuman-Amazonas
<i>H. uatumensis</i> Rapp-Py Daniel & Oliveira 2001	Bacia do rio Uatuman-Amazonas
<i>H. trombetensis</i> Rapp-Py Daniel & Oliveira 2001	Bacia do rio Trombetas-Amazonas
<i>H. maculata</i> Boeseman 1971	Bacia do rio Maroni

<i>H. fowleri</i> Pellegrin 1908	Bacia do rio Oyapock
<i>H. guianensis</i> Rapp-Py Daniel & Oliveira 2001	Bacia do rio Aproague
<i>H. surinamensis</i> Boeseman 1971	Bacia do rio Suriname
<i>H. merevari</i> Provenzano Machado-Allison, Chernoff, Willink & Petry 2005	Bacia do rio Orinoco

Sabe-se atualmente da existência de pelo menos onze espécies de *Harttia* ainda não descritas: uma da bacia do alto rio Paraná, uma da bacia do rio Doce, uma da Serra da Canastra, uma da bacia do rio Tocantins, duas da bacia do rio São Francisco, duas do rio Tapajós e três do rio Xingu. Essas espécies estão em diferentes fases do processo de descrição. Com isso tem-se conhecimento da existência de pelo menos 32 espécies para o gênero.

Isbrucker (2001) propôs que *Harttia leiopleura* seja colocada como espécie tipo do gênero *Quiritixys* devido ao seu acentuado dimorfismo sexual. Tal proposta não foi aceita em Reis *et al.* (2003); contudo, em nenhum dos dois trabalhos essa questão teve grande argumentação ou foi estudada mais a fundo.

Também em Reis *et al.* (2003), *Harttia maculata*, *H. fowleri*, e *H. platistoma* propostas em Rapp Py-Daniel & Oliveira (2001) como pertencentes a *Harttia*, foram recolocadas como espécies pertencentes ao gênero *Ctenoloricaria*. Já em Ferraris (2007) *H. surinamensis* foi novamente validada como uma das espécies do gênero *Harttia*, recolocando *Ctenoloricaria fowleri* e *C. maculata*, juntamente com *C. platistoma* como representantes do gênero *Ctenoloricaria*. Essa questão ainda segue em aberto e carente de uma revisão. A grande quantidade de espécies do gênero, somada às dúvidas do ponto de

vista taxonômico que esse gênero enfrenta, faz com que seja necessário um profundo estudo sistemático do grupo.

A primeira e única referência quanto às relações internas do gênero *Harttia* foi proposta por Py-Daniel (1997), onde o gênero apareceu como monofilético (Figura 4). Entretanto as relações filogenéticas dentro do gênero não foram claramente resolvidas devido ao número reduzido de espécies analisadas (Figura 7).

É nesse contexto de pouca informação filogenética entre os gêneros representantes de Loricariinae e principalmente entre as espécies do gênero *Harttia* que esse projeto foi proposto. Pretendeu-se, a partir de análises de dados moleculares, elaborar hipóteses de relacionamento entre gêneros de Loricariinae e espécies de *Harttia*, procurando com isso auxiliar em futuras descrições de novas espécies e na detecção de padrões de distribuição geográfica para peixes da região Neotropical.

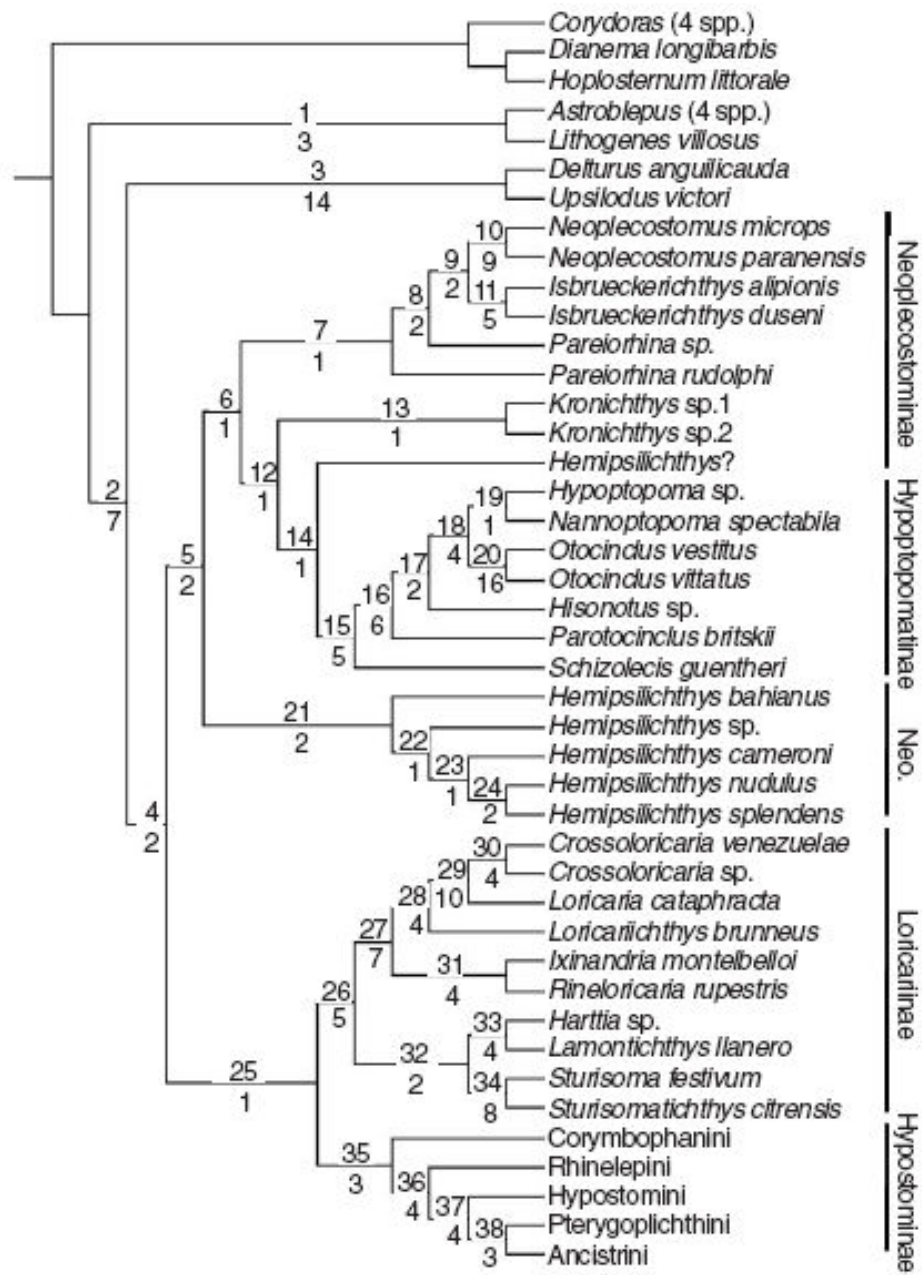


FIGURA 2. Filogenia da família Loricariidae segundo Armbruster (2004). Números acima dos ramos indicam o número dos cladogramas discutidos pelo autor e os números abaixo dos ramos representam índices de decaimento de Bremer.

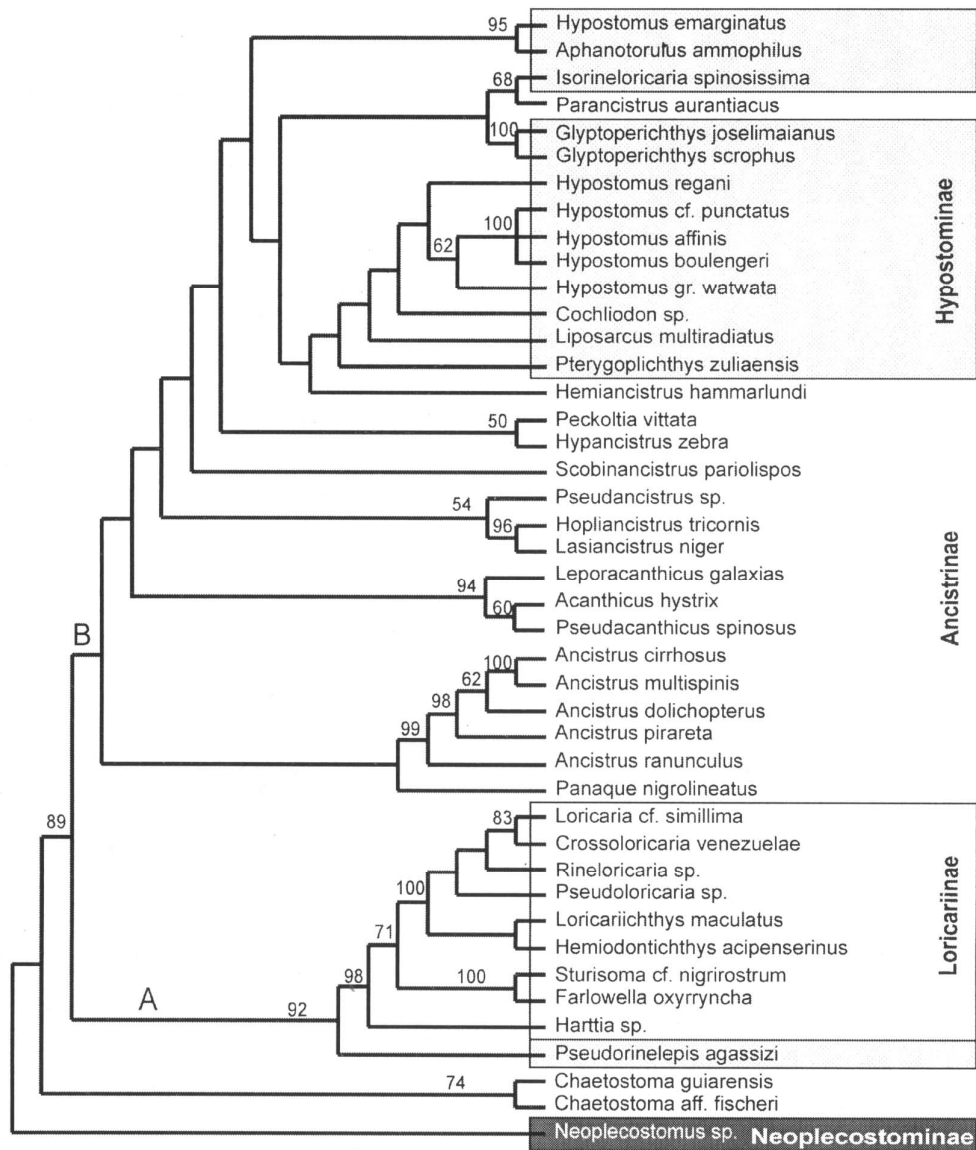


FIGURA 3. Filogenia proposta por Montoya-Burgos *et al.* (1998), baseada em seqüências parciais dos genes mitocondriais 12S e 16S, para a família Loricariidae. Os números acima dos ramos representam valores de *bootstrap* encontrados nas análises de Máxima Parcimônia efetuadas.

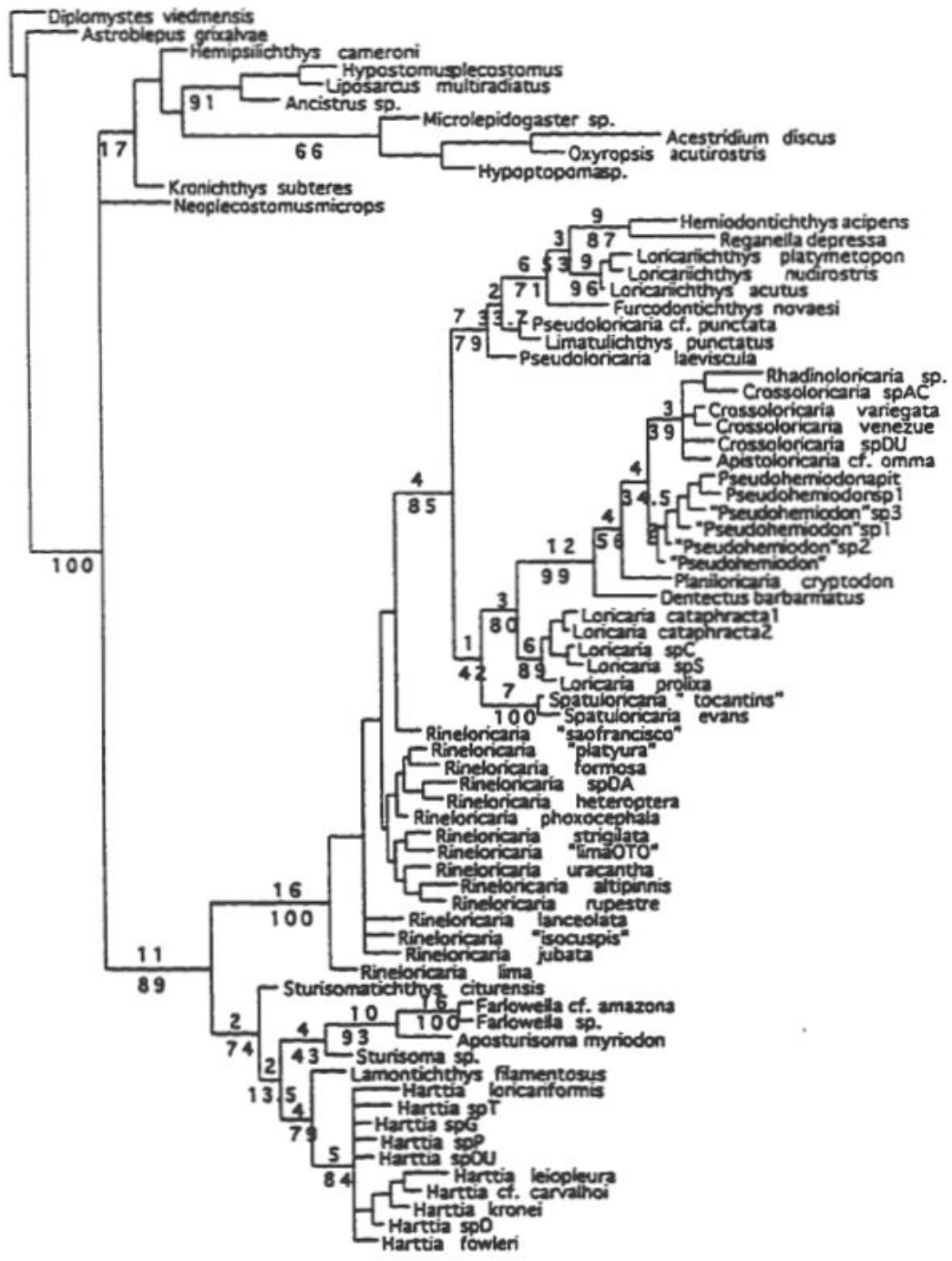


FIGURA 4. Relações filogenéticas a partir de dados não ordenados da subfamília Loricariinae com outros Loricariidae proposta por Py-Daniel (1997). Os números acima dos ramos indicam o índice de decaimento, e os números abaixo dos ramos indicam o *bootstrap*.

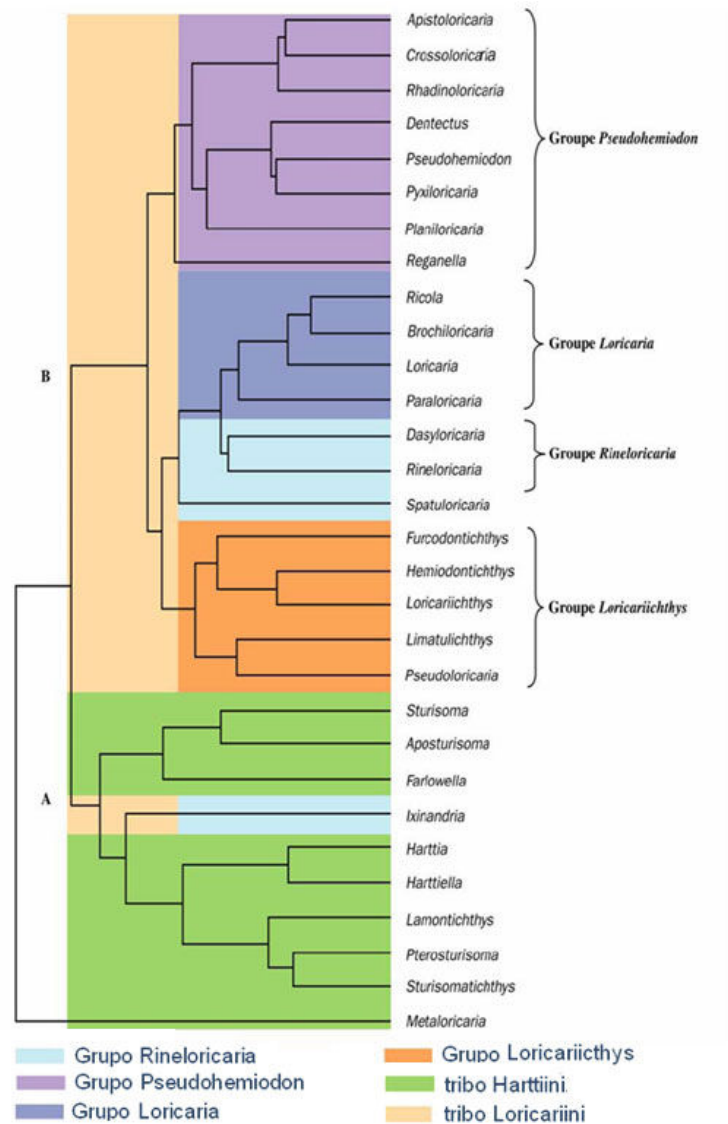


FIGURA 5. Árvore de UPGMA de 30 gêneros da subfamília obtida a partir de distância morfológica **A** representa a Tribo Harttiini e **B** representa a Tribo Loricariini. (Modificado de Covain *et al.*, 2007)

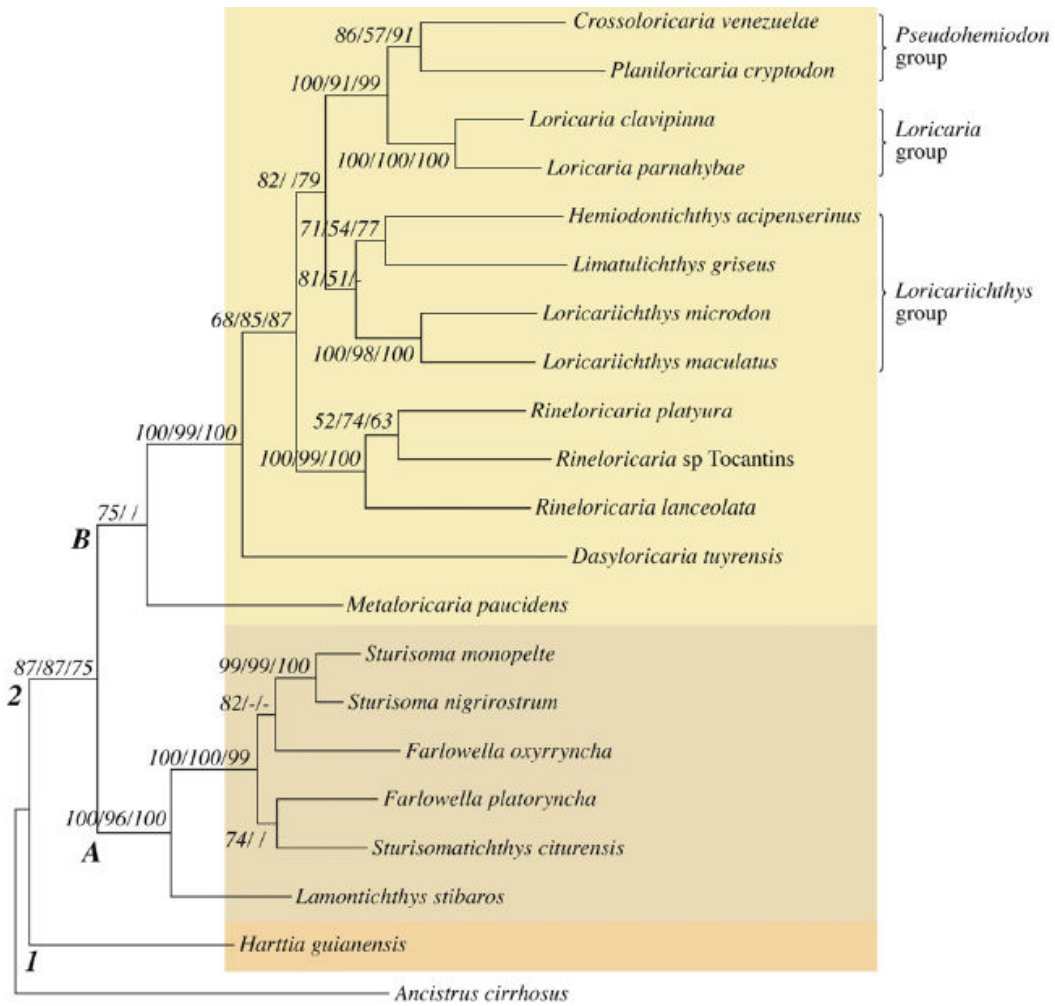


FIGURA 6. Árvore de Máxima Verossimilhança incluindo 14 gêneros e 20 espécies inferidos de análises de seqüências parciais do gene 12S e 16S, segundo Covain *et al.* (2008). Os números acima dos ramos indicam os valores de bootstrap encontrados maiores que 50% para as análises de Máxima Verossimilhança, Máxima Parcimônia, e Neighbour-Joining respectivamente. (-) indica que as análises de Máxima Parcimônia e Neighbour-Joining não apresentaram esse mesmo grupamento. 1, Harttiini; 2, Loricariini; A, Sturisominae; B, Loricariinae.

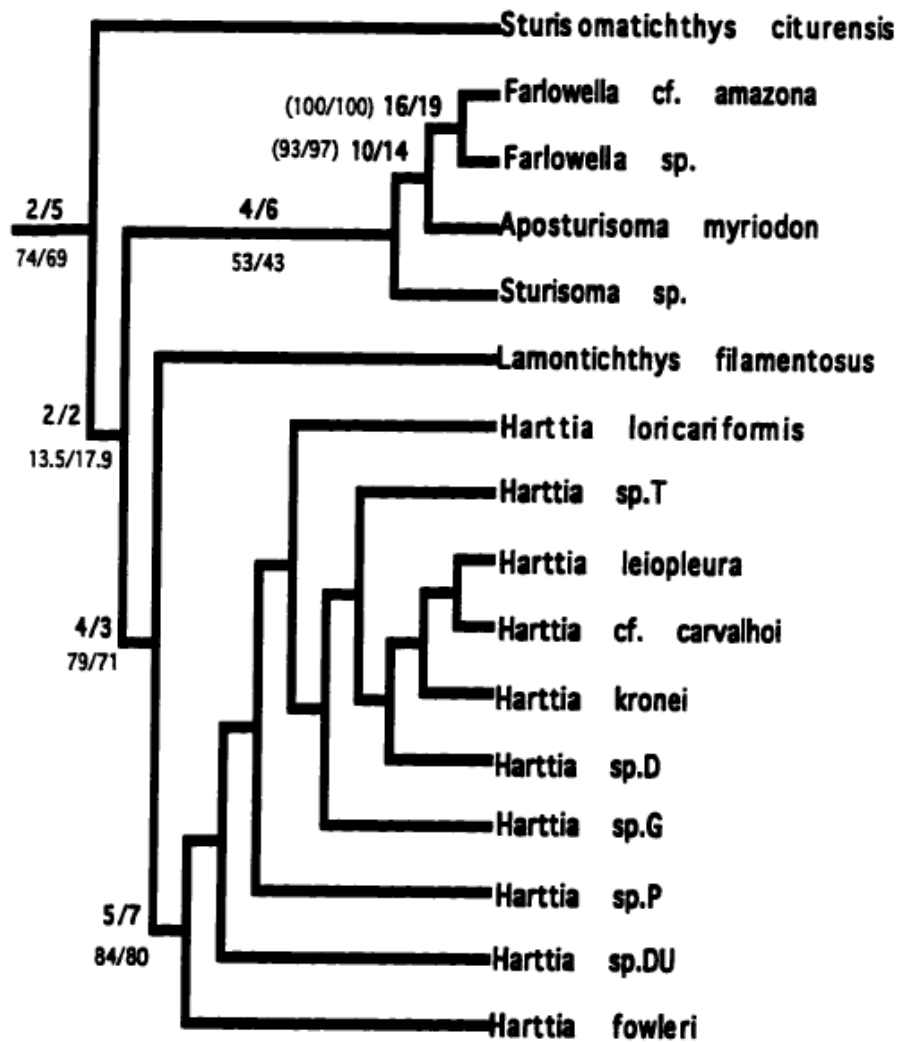


FIGURA 7. Hipótese de relação entre espécies da tribo Harttiini, e particularmente do gênero *Harttia*, propostas a partir dados morfológicos ordenados, apresentada por Py-Daniel (1997).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo principal procurar ampliar o conhecimento sobre a diversidade e os padrões de relacionamento dos gêneros da subfamília Loricariinae e estudar as relações entre espécies do gênero *Harttia*.

Foram objetivos específicos:

1- Seqüenciar genes mitocondriais e nucleares do maior número possível de gêneros da família Loricariinae e de gêneros relacionados, com o propósito de construir uma árvore filogenética robusta para as os grupos analisados.

2- Seqüenciar genes mitocondriais e nucleares do maior número possível de espécies do gênero *Harttia* com o propósito de construir uma árvore filogenética representativa das relações de parentesco entre as mesmas.

3- Analisar as relações entre as espécies de *Harttia* do ponto de vista biogeográfico com o intuito de traçar hipóteses da história evolutiva do grupo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

As espécies utilizadas no presente estudo estão listadas na Tabela 2. Procurou-se analisar uma amostra representativa da subfamília Loricariinae, com vistas a um melhor entendimento de suas relações e, particularmente, do gênero *Harttia*, objeto de estudo principal desse trabalho. *Ancistrus cirrhosus* foi utilizado como grupo externo na análise entre os gêneros de Loricariinae e suas seqüências foram obtidas no Genbank, enquanto *Neoplecostomus microps* e *Hemipsilichthys gobio* foram utilizados na análise das relações filogenéticas das espécies do gênero *Harttia*.

TABELA 2. Relação das espécies utilizadas no presente estudo. As amostras de *Hypoptopoma* sp., *Pareiorhaphys* e *Isbrueckerichthys* foram retiradas de um trabalho que pretende elucidar as relações entre a subfamília Hypoptopomatinae e Neoplecostominae, o qual está sendo realizado em nosso laboratório. Para as informações da tabela assinaladas com o símbolo MHNG os tecidos estão depositados no Museu de Zoologia de Genebra e os números de lote e do exemplar ainda não foram obtidos.

Espécies	Lote (LBP)	Número do exemplar	Localidade	F-Reticulon-4	COI	12S+16S
<i>Harttia loricariformis</i>	2121	21364	Paraíba do Sul	OK	OK	-
<i>Harttia kronei</i>	518	6318	Ribeira de Iguape	OK	OK	-
<i>Harttia</i> sp. tapajos 1	5857	28329	Tapajós	OK	OK	-
<i>Harttia dissidens</i>	5859	28331	Tapajós	OK	OK	-
<i>Harttia</i> sp. Xingu 1	5855	28332	Xingu	OK	OK	-
<i>Harttia</i> sp. Xingu 2	5860	28333	Xingu	OK	OK	-

<i>Harttia</i> sp. Xingu 3	5861	28335	Xingu	OK	OK	-
<i>Harttia</i> sp. Xingu 3	5861	28337	Xingu	OK	OK	-
<i>Harttia</i> sp. Xingu 1	5862	28338	Xingu	OK	OK	-
<i>Harttia dissidens</i>	5863	28339	Tapajós	OK	OK	-
<i>Harttia punctata</i>	5865	28343	Tapajós	OK	OK	-
<i>Harttia torrenticola</i>	5835	28346	São Francisco	OK	OK	-
<i>Harttia</i> sp. Três Marias	5838	28351	São Francisco	OK	OK	-
<i>Harttia punctata</i>	5839	28354	Tapajós	OK	OK	-
<i>Harttia novalimensis</i>	6538	31683	São Francisco	OK	OK	-
<i>Harttia carvalhoi</i>	6320	29387	Paraíba do Sul	OK	OK	-
<i>Harttia carvalhoi</i>	6320	29388	Paraíba do Sul	OK	OK	-
<i>Harttia gracilis</i>	6331	29820	Paraná	OK	OK	-
<i>Harttia leiopleura</i>	6487	31527	Rio São Francisco	OK	OK	-
<i>Harttia leiopleura</i>	6487	31528	Rio São Francisco	OK	OK	-
<i>Harttia</i> sp. Serra do Cipó	6528	31652	Rio São Francisco	OK	OK	-
<i>Hemipsilichthys gobio</i>	2368	15363	Rio Paraíba do Sul	OK	OK	-
<i>Neoplecostomus microps</i>	645	7593	Rio Paraíba do Sul	OK	OK	-
<i>Harttia guianensis</i>	MHNG	MHNG	Rio Maroni	OK	-	OK
<i>Sturisoma</i> sp.	161	4044	Rio Branco-AC	OK	-	OK
<i>Spatuloricaria</i> sp.	1556	11507	Barra do garça/MS	OK	-	OK
.	1650	11818	Goiás	OK	-	OK
<i>Rineloricaria platiura</i>	MHNG	MHNG	MHNG	OK	-	OK
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	1557	11505	Barra do	OK	-	OK

			garça/MS			
<i>Pixiloricaria mensesensis</i>	4332	24034	Coxim MS	OK	-	OK
<i>Rineloricaria</i> sp.	MHNG	MHNG	MHNG	OK	-	OK
<i>Loricariichthys platimetopon</i>	MHNG	MHNG	MHNG	OK	-	OK
<i>Loricariichthys maculatus</i>	MHNG	MHNG	MHNG	OK	-	OK
<i>Loricaria</i> sp.	5049	11506	Barra do garça/MS	OK	-	OK
<i>Limatulichthys</i> sp.	MHNG	MHNG	MHNG	OK	-	OK
<i>Limatulichthys griseos</i>	MHNG	MHNG	MHNG	OK	-	OK
<i>Crossoloricaria venezuelae</i>	223	4101	Rio Branco-AC	OK	-	OK
<i>Brochiloricaria macrodon</i>	5048	24033	Coxim-MS	OK	-	OK
<i>Farlowella</i> sp.	4043	22907	Cruzeiro do Sul-AC	OK	-	OK
<i>Hemiodontichthys</i> sp.	5524	26640	Almeirim PA	OK	-	OK
<i>Lamontichthys stibarus</i>	MHNG	MHNG	MHNG	OK	-	OK
<i>Sturisomatichthys</i> sp.	163	4060	Rio Branco, AC	OK	-	OK
<i>Ancistrus cirrhosus</i>	MHNG	MHNG	MHNG	OK	-	OK
<i>Lamontichthys filamentosus</i>	162	4038	Rio Acre	OK	-	-
<i>Sturisomatichthys citurensis</i>	MHNG	MHNG	MHNG	OK	-	-
<i>Hypoptopoma gulare</i>	3081	19713	Rio Orinoco	OK	-	-
<i>Pareiorhapiys</i> sp.	6491	31541	São_Francisco	OK	-	-
<i>Pareiorhaphis</i> sp.	3646	21698	Santa_Catarina	OK	-	-
<i>Isbruckerichthys alipionis</i>	MHNG	MHNG	Rio Betari	OK	-	-

<i>Pareiorhaphis</i> sp.	MHNG	MHNG	MHNG	OK	-	-
<i>Pareiorhaphis splendens</i>	MHNG	MHNG	Rio Araraquara	OK	-	-
<i>Loricaria</i> sp.	MHNG	MHNG	Araguaia	OK	-	-

O gene nuclear escolhido para as análises foi o F-Reticulon 4 (MONTROYA- BURGOS, comunicação pessoal) (Figura 8A), que varia de 1900 pb a 2300 pb, e as seqüências mitocondriais foram as dos genes 12S rRNA (12S) e 16S rRNA com a seqüência do RNA transportador da Valina que existe entre eles (16S), totalizando aproximadamente 2400 pb, mais a seqüência parcial do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI) (Figura 8B), com aproximadamente 700 pb (porção final de 700 pb que corresponde à região utilizada nos projetos de *Barcoding* do gene COI que possui aproximadamente 1000pb). Essas regiões gênicas foram escolhidas por já terem sido testadas para alguns grupos da família Loricariidae, com excelentes resultados (COVAIN *et al.*, 2008; CHIACHIO *et al.*, 2008). Além disso, esses mesmos genes estão sendo analisados para outros representantes de Loricariinae por pesquisadores do Muséum d'Histoire Naturelle (MHNG), Genève, Suíça, com os quais estamos trabalhando em conjunto. Todas as amostras que tiveram essas regiões seqüenciadas e foram utilizadas nas análises estão representadas na Tabela 2.

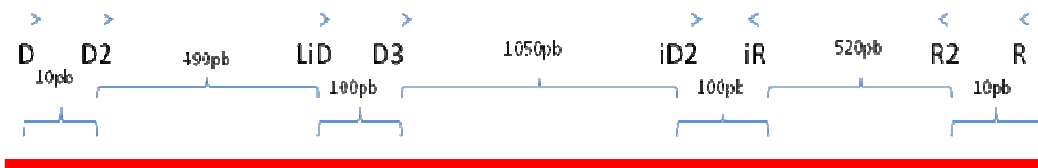


FIGURA 8A: representação do gene F-reticulon 4, com a região de anelamento dos primers que foram utilizados para amplificação e posterior seqüenciamento desse gene. (Primers Diretos: D,D2,LiD, D3 e iD2; Primers Reversos: iR, R2 e R).

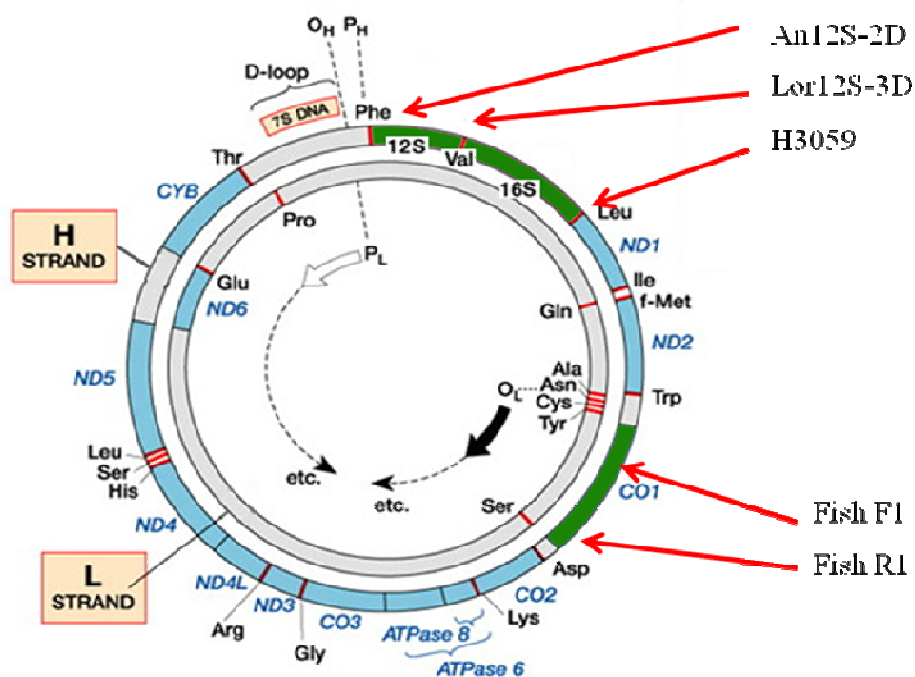


FIGURA 8B: representação do genoma mitocondrial com destaque dos genes mitocondriais utilizados em nossas análises(verdes) com os sítios de ligação dos primers utilizados nas ampliações (An12S-2D, Lor12S-3D, H3059, Fish F1 e Fish R1)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Extração de DNA Genômico

O DNA foi obtido a partir de amostras de músculo ou nadadeiras preservadas em etanol 95%, seguindo diferentes metodologias:

3.2.1.1 Extração por fenol-clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 2001)

1. Prepara-se uma solução MIX contendo:

Soluções	Volume / 1 amostra
EDTA 0,5M	25,0 µl
SDS 10%	25,0 µl
NaCl 5M	10,0 µl
Proteinase	5,0 µl
Tris HCl 2M	2,5 µl
H ₂ O (completar para 500 µl)	432,5 µl
Volume Final	500 µl

2. Em um cadinho, dissocia-se a amostra juntamente com a solução MIX e transfere-se a solução obtida para um tubo tipo *ependorf*.

3. Deixa-se em banho-maria (50°C) por 2 horas, vertendo-os esporadicamente.

4. Em uma capela, realiza-se a primeira lavagem com fenol, adicionando 500 µl de Fenol em cada tubo, dobrando o volume inicial.

5. Verte-se o tubo por aproximadamente 15 minutos.

6. Centrifuga-se por 15 minutos a 14000 rpm.

7. Com cuidado, retira-se o sobrenadante e transfere-se para outro tubo e então se realiza a segunda lavagem repetindo os passos 5, 6 e 7.

8. Na terceira lavagem, adiciona-se 250 μ l de fenol e 250 μ l de clorofórmio.
9. Centrifuga-se por 15 minutos a 14000 rpm.
10. Precipita-se com 1/10 do volume inicial (50 μ l) de NaCl 5M + 2X o volume (1000 μ l) de etanol gelado 100%.
11. Se houver a formação de nuvens, coleta-se o material e coloca-se em outro tubo com 1000 μ l de etanol 70% gelado ou deixa-se a noite toda no freezer -20°C .
12. Centrifuga-se por 30 minutos e descarta-se o sobrenadante.
13. Adiciona-se 800 μ l de Etanol 70% gelado.
14. Centrifuga-se por 15 minutos e descarta-se o sobrenadante.
15. Deixa-se secar durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente.
16. Elui-se com TE ou H₂O adicionando cerca de 300 μ l, de acordo com o tamanho do pellet formado no fundo do tubo.
17. Trata-se com 1,5 μ l de RNase em banho-maria 1h à 37°C, depois novamente por 10 minutos à 65°C.

3.2.1.2 Extração por Tampão de extração (ALJANABI & MARTINEZ, 2001)

1. Prepara-se uma solução MIX contendo:

Soluções	Volume / amostra
Tampão de Extração (Tris-HCl + EDTA + SDS 1%)	290,0 μ l
Proteinase K (10 mg/ml)	10,0 μ l

2. Em um cadinho, dissocia-se a amostra juntamente com a solução MIX (sem a Proteinase K) e transfere-se a solução obtida para um tubo tipo *ependorf* 1,5 ml.

3. Adiciona-se a Proteinase K e deixa-se em banho-maria (55°C) de 2 a 3 horas, vertendo-os esporadicamente.
4. Coloca-se 100 µl de solução de NaCl 5M e mistura-se bem vertendo o tubo vagarosamente.
5. Centrifuga-se a 10.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente.
6. Remove-se 300 µl de sobrenadante e transfere-se para um novo tubo de 1,5 ml.
7. Adiciona-se 600 µl de etanol 100% gelado.
8. Deixa-se no ultrafreezer (-70°C) por 20 minutos.
9. Centrifuga-se a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C.
10. Remove-se o sobrenadante.
11. Seca-se bem (pode deixar em estufa a 37°C por até 30 minutos ou então a noite toda em temperatura ambiente).
12. Adiciona-se 200 µl de água ultrapura autoclavada. Deixa-se na bancada ou na geladeira por pelo menos 24 horas para hidratação.
13. Alíquota-se o DNA e guarda-se cerca de 150 µl no freezer (-20°C) para solução estoque e o restante na geladeira (4°C) para a solução de trabalho.

3.2.1.3 Extração por Kit Comercial (“DNeasy Tissue Kit” – Qiagen Peqlab)

1. Coloca-se a amostra em um tubo tipo *ependorf* 1,5 ml e transfere-se o mesmo a um “banho seco” (Block) à 55°C por cerca de 25 minutos até a secagem completa de todo o álcool presente na amostra;
2. Com o auxílio de um *piston* macera-se toda a amostra;

3. Adiciona-se à amostra 200 µl de Tampão de Extração (Tris HCl pH8.0 10mM + EDTA pH 8.0 10 mM + NaCl 50 mM + SDS 0,5%);
4. Adiciona-se 25 µl de Proteinase K (20 mg/ml) e coloca-se o tubo no vórtex ligeiramente;
5. Coloca-se o tubo num block aquecido a 55°C e deixa-se por uma 2 horas ou a noite toda para a digestão completa do tecido;
7. Após a digestão retira-se o tubo do Block e centrifuga-se por 5 segundos (*spin*);
8. Adiciona-se 220 µl de Tampão BL e coloca-se no vórtex ligeiramente;
9. Transfere-se o tubo para um block programado a 70°C e deixe por 10 minutos;
10. Centrifuga-se o tubo por 5 segundos a 3000 rpm;
11. Adiciona-se 220 µl de EtOH 100% e coloca-se no vórtex;
12. Centrifuga-se o tubo por 5 segundos 3000 rpm;
13. Transfere-se o conteúdo do tubo (digestão) para uma coluna acoplada a um tubo coletor, ambos devidamente identificados;
14. Centrifuga-se por 1 minuto a 10.000 rpm;
15. Transfere-se a coluna para um novo tubo coletor e descarte-se o anterior;
16. Adiciona-se 600 µl de Wash Buffer (preparado com EtOH) na coluna;
17. Centrifuga-se por 1 minuto a 10.000 rpm. Descarta-se o líquido do tubo coletor e o acopla-se novamente à coluna;
18. Adiciona-se novamente 600 µl de Wash Buffer (preparado com EtOH) na coluna;
19. Centrifuga-se por 1 minuto a 10.000 rpm. Descarta-se o líquido do tubo coletor e o acopla-se novamente à coluna;
20. Pré-aquecimento do Elution Buffer à 70°C;

21. Centrifuga-se a coluna (vazia) acoplada ao mesmo tubo coletor por 2 minutos a 13.000 rpm, para a secagem completa da coluna;
22. Transfere-se a coluna para um novo tubo tipo *ependorf* 1,5 ml e descarta-se o tubo coletor;
23. Adiciona-se à coluna 200 µl de Elution Buffer pré-aquecido;
24. Coloca-se o tubo 1,5 ml com a coluna num block a 70°C por 3 minutos;
25. Centrifuga-se por 1 minuto a 10.000 rpm;

3.2.2 Amplificação dos Segmentos de DNA

Para as reações foi utilizado o kit GoTaq Promega como enzima responsável pela polimerização. Nesse kit a A taqpolimerase já vem com o tampão *Buffer* e dNTP em concentrações ótimas para a reação.

TABELA 3: Primers que foram utilizados.

Região e tamanho do fragmento	Nome	Referência	Seqüência do Primer
12S rDNA 1200 pb	An12S-2D	Covain (2008)	5'-GCC AGC TTA CCC TGT GAA GG-3'
	Lor12S-3D		5'-CCT CGT ACC TTT TGC ATC ATG-3'
16S rRNA 1100 pb	H3059	Covain (2008)	5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3'
COI 700 pb	Fish F1	WARD <i>et al.</i> , 2005	5' TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC 3'
	Fish R1		5' TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG GAA TCA 3'
	Freticul4-D	Dr. Juan Montoya-	5' - AGG CTA ACT CGC TYT SGG CTT TG - 3'
	Freticul4-R		5' - GGC AVA GRG CRA ART CCA TCT C - 3'
	Freticul4 D2		5'- CTT TGG TTC GGA ATG GAA AC - 3'
	Freticul4 R2		5'- AAR TCC ATC TCA CGC AGG A - 3'

F-Reticulon 4 1900 pb	Freticul4 iR	Burgos	5' -AGG CTC TGC AGT TTC TCT AG -3'
	Freticul4 LiD		5' - ATG ACC GTG AGC TGC CAG GC - 3'
	Freticul4 iD2		5'- CAA CAT CAC YTG GAT TGA GG - 3'
	Freticul4 D3		5' - ACA KTG GCA AGG AAA ACT CC - 3'

3.2.2.1 Amplificação dos genes mitocondriais

O processo utilizado na amplificação do fragmento do gene COI contém os seguintes volumes:

Soluções	Volume
GoTaq	6,5 µl
Primer Fish F	1,0 µl
Primer Fish R	1,0 µl
H ₂ O Autoclavada	5,5 µl
DNA genômico	1,0 µl
Volume Final	15,0 µl

Levam-se os *ependorfs* a um termociclador e realiza-se o seguinte programa:

Passo	Processo	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação Inicial	94º C	3'
2	Desnaturação	94°C	30'x2
3	Anelamento	48-56°C	1'
4	Extensão	68°C	2'
5	Volta para o passo 2	-	35X
6	Extensão Final	72°C	5'

As amostras, após a amplificação, são checadas em gel de agarose 1%.

Já no processo utilizado para o seqüenciamento do gene 12S, 16S mais o RNA

Transportador de Valina existente entre eles foram utilizados:

Soluções	Volume
GoTaq	6,5 µl
Primer L941-PHE	1,0 µl
Primer 16S R	1,0 µl
H ₂ O Autoclavada	5,5 µl
DNA genômico	1,0 µl
Volume Final	15,0 µl

Levam-se os *ependorfs* a um termociclador e realiza-se o seguinte programa:

Passo	Processo	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação Inicial	94º C	30
2	Desnaturação	94°C	30
3	Anelamento	48-56°C	1
4	Extensão	68°C	230
5	Volta para o passo 2	-	35X
6	Extensão Final	72°C	5

As regiões de anelamento de cada primer esta representada na Figura 8B. Após a reação de amplificação as amostras, são checadas em gel de agarose 1%.

3.2.2.2 Amplificação do gene nuclear

Como mostrados nos materiais o segmento do gene F-Reticulon 4 utilizado possui um tamanho bastante elevado para que seja seqüenciado em apenas uma reação. Além disso, a reação de amplificação foi realizada em duas etapas, uma primeira utilizando os primers mais externos D e R (representados em suas regiões de anelamento na Figura 8A. Nessa reação ocorre a amplificação de fragmentos bastante variados dentro de Loricariinae) seguindo o seguinte protocolo de reação.

Soluções	Volume
GoTaq	6,5 µl
Primer D	1,0 µl
Primer R	1,0 µl
H ₂ O Autoclavada	5,5 µl
DNA genômico	1,0 µl
Volume Final	15,0 µl

O programa realizado no termociclador nessa etapa foi o seguinte:

Passo	Processo	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação Inicial	95° C	3'
2	Desnaturação	95°C	30''
3	Anelamento	48°C	30''
4	Extensão	72°C	2':15''
5	Volta para o passo 2	-	37-45X
6	Extensão Final	72°C	5'

O resultado dessa amplificação está apresentado na figura 9 A,

Após essa etapa uma nova amplificação foi realizada com temperatura de anelamento mais elevada, utilizando-se os *primers* D2 e R2 (representados em suas regiões de anelamento na Figura 8A Nessa reação ocorre a amplificação de fragmentos bastante variados dentro de Loricariinae, porém com um tamanho de aproximadamente 40 pb menor do que os gerados da reação anterior), seguindo o seguinte protocolo de reação:

Soluções	Volume
GoTaq	6,5 µl
Primer D	1,0 µl
Primer R	1,0 µl
H ₂ O Autoclavada	5,5 µl
Produto de PCR da primeira reação diluído 1/20	1µl
Volume Final	15,0 µl

O programa executado no termociclador para essa etapa foi:

Passo	Processo	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação Inicial	95° C	3'
2	Desnaturação	95°C	30''
3	Anelamento	53-54°C	30''
4	Extensão	72°C	2':15''
5	Volta para o passo 2	-	37-45X
6	Extensão Final	72°C	5'

O resultado dessa amplificação está apresentado na Figura 9 B, em gel de agarose 1.0%.

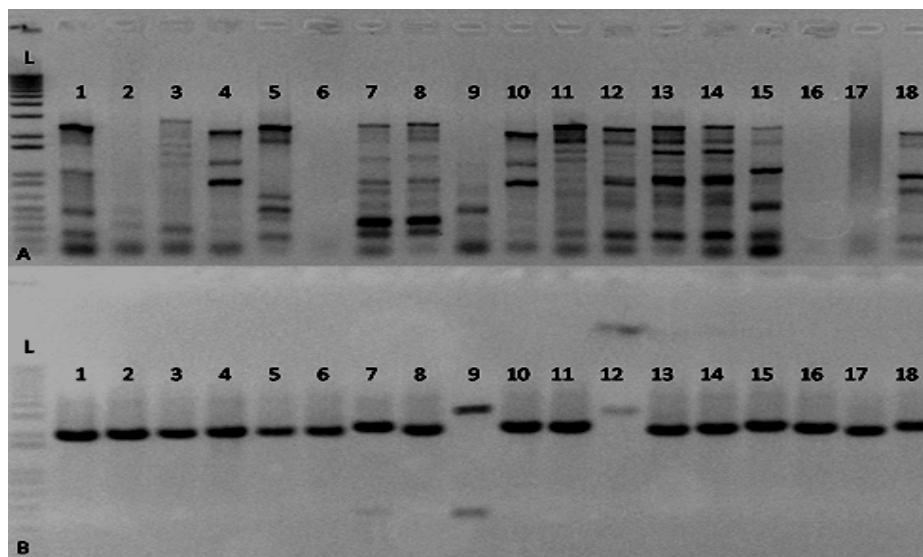


FIGURA 9: Fotografia do gel de agarose 1.0% após a eletroforese, representando com bandas o resultado positivo de ampliações: “L” representa a região de “corrida” do Ladder. “A” representa gel da primeira reação de amplificação do gene nuclear F-Reticulon 4, onde se apresentou muitas ampliações inespecíficas. “B” representa gel da segunda reação de amplificação do gene nuclear F-Reticulon 4, onde se apresentou ampliações específicas, com bandas de aproximadamente 2000 pb. Os números representam as amostras após cada reação

3.2.3 Purificação das Amostras Amplificadas

Após checagem da amplificação, o produto de PCR passou por reação de limpeza através do kit ExoSap-IT[®] (USB Corporation) seguindo o seguinte procedimento ou utilizando o kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche):

Limpeza com Exosap:

1: Em um tubo *ependorf* prepara-se uma reação contendo **5,0 µl** do DNA amplificado juntamente com **2,0 µl** da solução de ExoSap e leva-se para o termociclador para a realização do seguinte programa:

Passo	Temperatura	Tempo
1	37° C	15'
2	80°C	15'

As ampliações das regiões nucleares purificadas utilizando-se também o Kit comercial *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche) seguiram o seguinte procedimento:

1. Transfere-se 15 µl de produto de PCR amplificado para a coluna (*High Pure Filter Tube*) e acopla-se a coluna num tubo coletor (*Collection Tube*);
2. Adiciona-se em cada coluna 80 µl de *Binding Buffer* (Tampão de captura);
3. Centrifuga-se por 1 minuto em 13.000 rpm em temperatura ambiente;
4. Descarta-se o líquido do tubo coletor e acopla-se o mesmo novamente a coluna;
5. Adiciona-se 175 µl de *Wash Buffer* (Tampão de Lavagem);
6. Centrifuga-se por 1 minuto em 13.000 rpm em temperatura ambiente;
7. Descarta-se o líquido do tubo coletor e acopla-se o mesmo novamente a coluna;
8. Adiciona-se 70 µl de *Wash Buffer* (Tampão de Lavagem);
9. Centrifuga-se por 1 minuto em 13.000 rpm em temperatura ambiente;
10. Descarta-se o líquido do tubo coletor e acopla-se a coluna num tubo *eppendorf* 1,5ml;
11. Adiciona-se 15 µl de *Elution Buffer* (Tampão de Eluição);
12. Centrifuga-se por 1 minuto em 13.000 rpm em temperatura ambiente.

3.2.4 Reação de PCR para Seqüenciamento

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

1. Prepara-se uma amostra e duas réplicas para cada e para tanto, prepara-se uma solução MIX, para cada uma das amostras, contendo:

Soluções	Volume
DNA (Amplificado e limpo pela ExoSap-IT ou pelo kit de <i>Primer</i> (Diluído na proporção 3:1)	2,0 µl
Solução Pré-MIX (nucleotídeos marcados com fluorescência)	2,0 µl
H ₂ O Autoclavada	3,0 µl
Volume Final	9,0 µl

OBS: para o gene nuclear F-Reticulon 4 o produto da segunda reação de amplificação e limpo pela Exosap foi diluído novamente 1/20 para fazer a reação de seqüenciamento.

2. Levam-se os *ependorfs* a um termociclador e realiza-se o seguinte programa:

Passo	Processo	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação Inicial	94º C	3
2	Desnaturação	94°C	30
3	Anelamento	56°C	1
4	Extensão	72°C	2
5	Volta para o passo 2		30X
6	Extensão Final	68°C	4

Para o gene F-Reticulon 4 foram realizadas as reações de seqüenciamento utilizando de forma individual os primers F-Reticul 4 D2, F-Reticul 4 R2, e mais um outro escolhido entre F-Reticul 4 iR, F-Reticuln 4 LiD e F-Reticul 4 iD2, buscando encontrar a melhor combinação. Essa combinação variou de gênero para gênero.

Já para o seqüenciamento dos genes 12S+ 16S foram preparadas reações contendo os primers An12S-2D, Lor12S-3D e H3059 de forma independente. para podermos obter seqüências desses genes inteiros mais a seqüência molde do RNA transportador da Valina que existe entre eles.

3.2.5 Limpeza do PCR de Seqüenciamento

1. Adiciona-se em cada tubo: 0.7 µl de EDTA (125mM);
2. Adiciona-se em cada tubo: 0.7 µl de Acetato de Sódio (3 M)
3. Homogeneizar e passar no spin brevemente;
4. Adicionar 17,5 µl de Etanol 100%;
5. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente;
6. Centrifuga-se por 15 min a 13000 rpm à 25°C;
7. Descartar o Etanol em papel toalha;
8. Adiciona-se 24,5 µl de Etanol 70% Gelado;
9. Centrifuga-se por 10':15" a 13000 rpm à 20°C;
10. Descartar o Etanol em papel toalha;
11. Repetir passo 8 a 10 (lavagem com etanol 70%);

12. Secar em termociclador por 2 minutos a 96°C sem tampa e com o termociclador aberto;
13. Guarda-se os tubos, já secos, no freezer à 4°C envolto em papel alumínio, até o momento do seqüenciamento;

3.2.6 Seqüenciamento de DNA

As seqüências do gene nuclear F-Reticulon 4 e dos genes mitocondriais 12S rRNA e 16S rRNA utilizados na análise dos gêneros foram obtidas através da técnica de seqüenciamento por capilaridade realizadas pelo *MolBioAni Laboratory* – Molecular Systematic Group (Université de Genève – Faculté des Sciences). Já as seqüências do gene nuclear e parte das seqüências do gene mitocondrial COI utilizados nas análises das espécies do gênero *Harttia* (com exceção da *Harttia guianensis*) foram também obtidas através de seqüenciamento por capilaridade no seqüenciador ABI3130 do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu.

Parte das seqüências do gene COI foi determinada em seqüenciador automático ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Perking-Elmer), no Laboratório de Biologia e Genética de peixes do departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu.

3.2.7. Obtenção de seqüências consenso

Após o seqüenciamento, as seqüências do conjunto de primers do gene F-Reticulon 4 foram analisadas no programa ATGC (Genetix Inc.), onde as seqüências podem ser analisadas com a visualização simultânea do eletroferograma originário do processo de seqüenciamento automático. Esse fato possibilita que as seqüências consenso do gene sejam obtidas com um grau de precisão maior. Após essa etapa, as seqüências consenso de cada indivíduo foram então passadas para um editor de texto, nomeadas separadamente e salvas em um único arquivo em formato de texto (extensão txt).

3.2.8 Alinhamento das seqüências e Análise dos dados

3.2.8.1 Alinhamento das seqüências

Vários programas e algoritmos foram testados para se obter um alinhamento mais próximo do final, para que a matriz sofresse a menor interferência possível. Foram testados o programa DAMBE 4.1.27(XIA e XIE, 2001), BioEdit (HALL, 1999), e Geneious 3.8.5 (Biomatters Ltd.) e CLC Sequencer Viewer 5.0 (CLC Bio A/S) com o algoritmo ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). No Geneious e CLC também foi testado o alinhamento a partir dos algoritmos dos próprios programas. O algoritmo que gerou os melhores resultados foi o MUSCLE tanto acoplado aos programas CLC e Geneious quanto o disponível no link "<http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html>", que foi o utilizado na análise final pela sua praticidade. Após esse alinhamento o arquivo originado foi salvo em formato Fasta para que pudesse ser analisado no editor de seqüências BioEdit, efetuando as correções manuais do alinhamento.

É importante ressaltar que as correções foram as menores possíveis e realizadas

apenas antes que essa matriz fosse utilizada nas análises filogenéticas. Isso para que ocorresse a menor manipulação possível garantindo assim a repetibilidade da hipótese de homologia originária do processo de alinhamento.

3.2.8.2 Análise dos dados

Foram elaboradas quatro matrizes independentes contendo seqüências de genes diferentes. Duas matrizes foram construídas contendo seqüências dos genes individualizados, uma com o segmento do COI (12 gêneros, 32 espécies e 47 táxons terminais de Loricariinae com 622 pb cada. Desse total de bases 344 são constantes, 55 são variáveis porém não informativos para análise de Máxima Parcimônia e 223 são variáveis e informativos para análise de Máxima Parcimônia) e outra com o F-Reticulon 4 (20 gêneros, 46 espécies e 52 táxons terminais de Loricariidae com 2108 pb cada. Desse total de bases 983 são constantes, 460 são variáveis porém não informativos para análise de Máxima Parcimônia e 665 são variáveis e informativos para análise de Máxima Parcimônia). Uma terceira matriz foi elaborada contendo seqüências do gene COI mais as seqüências do gene nuclear F-Reticulon 4 (3 gêneros 18 espécies e 26 táxons terminais com 2674 pb. Desse total de bases 1798 são constantes, 435 são variáveis porém não informativos para análise de Máxima Parcimônia e 441 são variáveis e informativos para análise de Máxima Parcimônia) para analisar as relações entre 16 espécies de *Harttia*, *Neoplecostomus microps* e *Hempsilichthys gobio*. A última matriz contém seqüências dos genes mitocondriais, 12S e 16S mais o gene nuclear F-Reticulon 4 (4467 pb. Desse total de bases 2963 são constantes, 764 são variáveis porém não informativos para análise de Máxima Parcimônia e 758 são variáveis e informativos para análise de Máxima Parcimônia) de 14 gêneros de Loricariinae e do gênero *Ancistrus*, totalizando 19 táxons terminais.

A escolha do melhor modelo de distância genética para cada matriz foi realizada com o programa Modeltest 3.06 (POSADA e CRANDALL, 1998) e estão listados na tabela abaixo (Tabela 4).

TABELA 4: Resultado das análises efetuadas com o programa Modeltest.

Matriz	Modelo de distância
Matriz COI	GTR- General time-reversible model (Lanave <i>et al.</i> 1984, and Rodriquez <i>et al.</i> 1990) + invariantes e distribuição gama
Matriz F-Reticulon-4	TVM - Transversional model + invariantes e distribuição gama
Matriz COI + F-Reticulon-4	K81 - Kimura (1981) + distribuição gama
Matriz 12S + 16S + F-Reticulon-4	GTR- General time-reversible model (Lanave <i>et al.</i> 1984, and Rodriquez <i>et al.</i> 1990)

As análises filogenéticas foram efetuadas utilizando-se basicamente métodos de Máxima Parcimônia, Probabilísticos (Máxima Verossimilhança) e de distância (Neighbour-Joining), como implementados nos programas Paup*4.0b10 (Swofford, 2002).

Seguindo as recomendações de Swofford *et al.* (1996), Nei e Kumar (2000) e Felsenstein (2004), uma vez obtidos os dados moleculares, foram construídas filogenias testando o maior número possível de variáveis (como ordenamento ou não dos dados, inclusão ou não de *gaps*, excluindo ou não regiões de difícil alinhamento, etc.). Todas as filogenias obtidas foram testadas utilizando métodos estatísticos, de *bootstrap*(1000 replicas) (FELSENSTEIN, 1985), e índice de decaimento de Bremer (BREMER, 1988) (para parcimônia). Ao final das análises a filogenia final foi construída com o método de consenso por maioria, conforme tem sido feito nos estudos utilizando dados moleculares.

Nas análises onde seqüências do gene nuclear F-Reticulon 4 foram utilizadas as regiões de íntrons muito extensas e particulares foram removidas das análises, para evitar alguns problemas como a atração de ramos longos, característico da análise de máxima

parcimônia, onde as seqüências com íntrons grandes e particulares tendem a formar um grupamento artificial.

4. RESULTADOS

A análise da matriz com apenas seqüências do gene nuclear F-Reticulon 4 foi realizada para testar três hipóteses. O primeiro teste seria avaliar se o gênero *Harttia* é mesmo um grupo monofilético. A segunda, se *Harttia guianensis* é mesmo uma espécie pertencente ao gênero *Harttia*. Esse segundo teste foi realizado porque *Harttia guianensis* foi a única espécie representante do gênero utilizada numa análise recente entre os gêneros de Loricariinae (COVAIN *et al.*, 2008). A terceira análise foi realizada para testar o monofiletismo de Loricariinae. A Figura 10 representa a topologia consenso por maioria das 2337 árvores igualmente parcimoniosa, obtida a partir da busca heurística para cada uma das 1000 replicas do teste de *Bootstrap*. A análise onde os *gaps* foram considerados como dados perdidos demonstrou-se mais resolutiva. Nessa análise as topologias mais parcimoniosas apresentaram o comprimento de árvore (TL) = 2337, índice de consistência (CI) = 0.6829, índice de Homoplasia (HI) = 0.3171 e índice de retenção (RI) = 0.7952. As topologias consenso resultantes das análises de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança apresentaram-se idênticas, divergindo apenas quanto a valores de *bootstrap*. Na análise de distância de Neighbour-Joining o gênero *Harttia* aparece como irmão de *Lamontichthys* + *Sturisomatichthys* + *Farlowella* + *Sturisoma*, reforçando a hipótese do monofiletismo da tribo Harttiini, porém o método de Neighbour-Joining não parece ser o melhor para as análises de nossas matrizes que contém regiões intrônicas. Uma vez que nos métodos fenéticos (Neighbour Joining) não se distingue entre plesio e apormofia, e que nos íntrons a quantidade de modificações é bem maior quando

comparados aos éxons, todas as modificações são tratadas como informativas. Tal indistinção pode originar agrupamentos artificiais. Por isso as árvores apresentadas são as concordantes com as análises de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança.

A matriz que foi utilizada para analisar a relação entre os gêneros de Loricariinae contém seqüências completas dos genes mitocondriais 12S, do RNA transportador da Valina, 16S e parte do gene nuclear F-Reticulon 4. Esses genes foram utilizados por apresentarem além de um grande número de caracteres, uma taxa de mutação interessante para uma análise em nível de gênero. Nessa análise *Ancistrus cirrhosus* foi utilizado com grupo externo. A partir da análise dessa matriz podem-se avaliar as relações entre os gêneros de Loricariinae e, além disso, permitiu-se a seleção dos melhores grupos externos que seriam utilizados nas análises entre as espécies do gênero *Harttia*. A Figura 11 representa a topologia consenso por maioria das 5059 árvores igualmente parcimoniosa, obtida a partir da busca heurística para cada uma das 1000 replicas do teste de *Bootstrap*. A análise onde os *gaps* foram considerados como dados perdidos demonstrou-se mais resolutive. Nessa análise as topologias mais parcimoniosas apresentaram o comprimento de árvore (TL) = 3059, índice de consistência (CI) = 0.6283 índice de homoplasia (HI) = 0.3717 e índice de retenção (RI) = 0.5280. A partir dos métodos de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança obteve-se a mesma topologia, que divergiram novamente da análise de Neighbour-Joining quanto à posição do gênero *Harttia*.

Para analisar as relações entre as espécies do gênero *Harttia* foi utilizada a matriz com seqüências do gene nuclear F-Reticulon 4 mais as seqüências do gene mitocondrial COI. Essas seqüências foram escolhidas por também apresentam uma taxa de mutação interessante para análises a nível específico. A Figura 12 representa a topologia consenso

por maioria das 1457 árvores igualmente parcimoniosa, obtida a partir da busca heurística para cada uma das 1000 réplicas do teste de *Bootstrap*. A análise onde os *gaps* foram considerados como dados perdidos demonstrou-se mais resolutiva. Nessa análise as topologias mais parcimoniosas apresentaram o comprimento de árvore (TL) = 1457, índice de consistência (CI) = 0.7255 índice de homoplasia (HI) = 0.4065 e índice de retenção (RI) = 0.7637. A partir dos métodos de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança obteve-se a mesma topologia, que divergiram novamente da análise de Neighbour-Joining, nesse caso, quanto à posição de *Harttia guianensis*.

Com o intuito de avaliar a distância genética entre as espécies de *Harttia* e de outros gêneros de Loricariinae foi utilizada a matriz com apenas as seqüências parciais do gene mitocondrial COI. Essa análise foi realizada no programa MEGA versão 4.0 (TAMURA K *et al*- 2007) pelo método de Neighbour-Joining

Como as análises que se demonstraram mais resolutiva foram aquelas onde as posições com *gaps* foram retiradas, e dessa forma houve a diminuição esperada do nível de saturação das matrizes. Os gráficos representativos do grau de saturação de cada matriz estão representados nos gráficos a seguir elaborados a partir do modelo de Kimura 2 parâmetros (Gráficos 1 a 3).

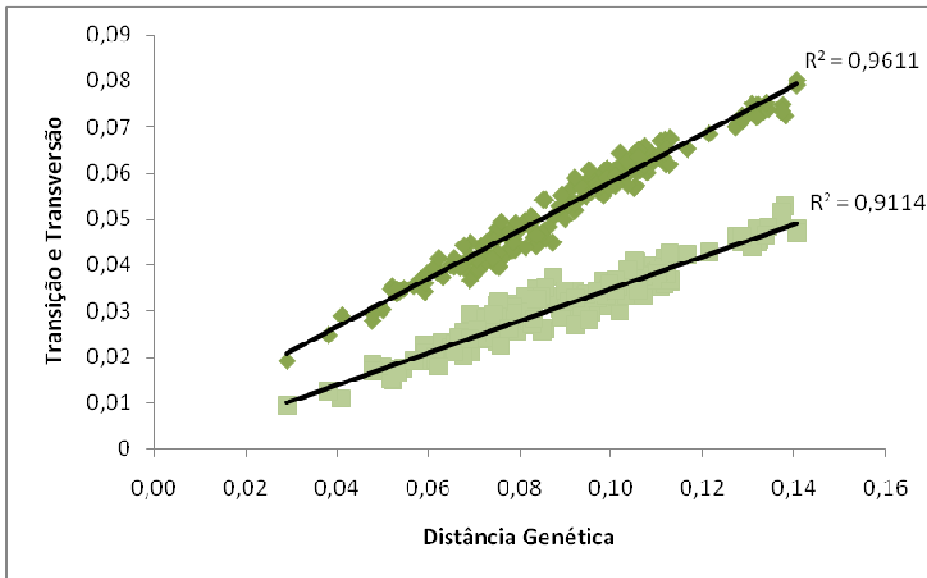


GRÁFICO 1: Análise de saturação das seqüências do gene nuclear F-reticulon 4 e dos genes mitocondriais 12S e 16S. Calculado a parti do modelo de Kimura 2 parametros, e a freqüência de Transições (losangulos) e Transversões (quadrados).

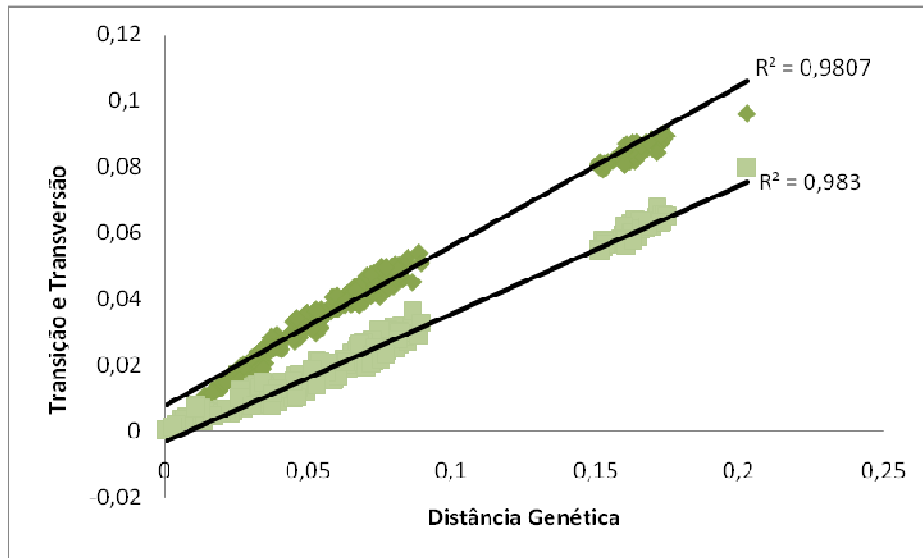


GRÁFICO 2: Análise de saturação das seqüências do gene nuclear F-reticulon 4 e do gene mitocondrial COI. Calculado a parti do modelo de Kimura 2 parametros, e a freqüência de Transições (losangulos) e Transversões (quadrados).

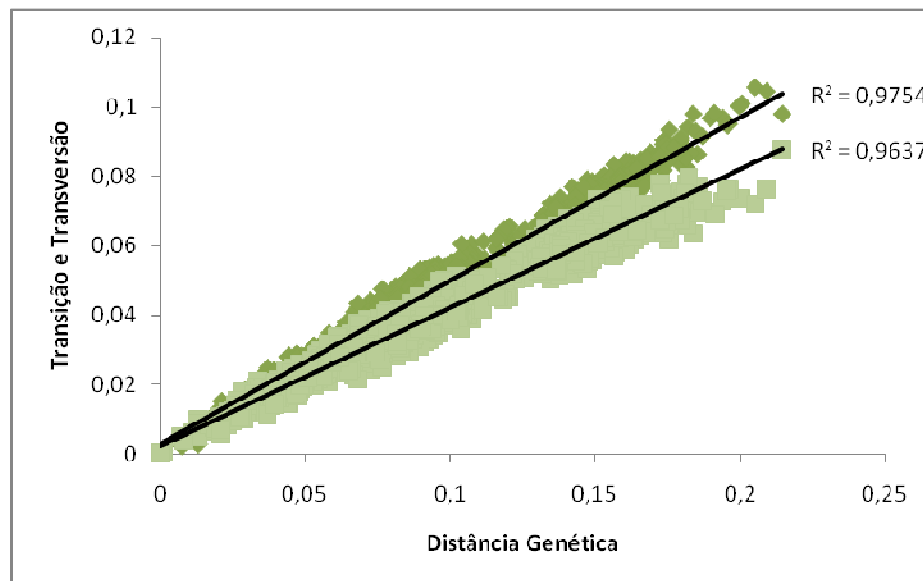


GRÁFICO 3: Análise de saturação das seqüências do gene nuclear F-reticulon 4. Calculado a parti do modelo de Kimura 2 parametros, e a freqüência de Transições (losangulos) e Transversões (quadrados).

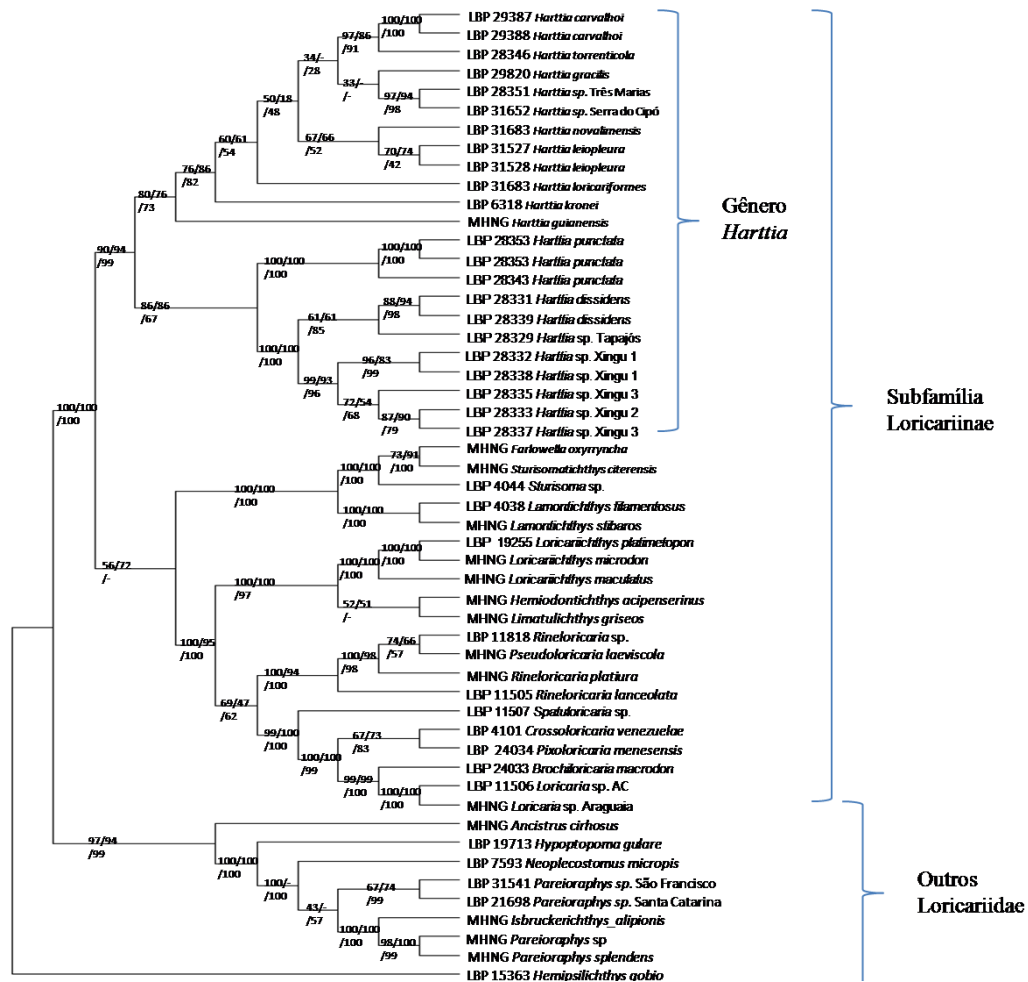


FIGURA 10. Topologia consenso por maioria encontrada a partir da análise de Máxima Parcimônia das relações entre espécies das subfamílias Loricariinae com base em caracteres moleculares de seqüências do gene F-Reticulon 4. Os valores acima dos ramos representam os valores de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) para a análise de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança respectivamente, e o número abaixo representa o valor de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) da análise de Neighbour-Joining.

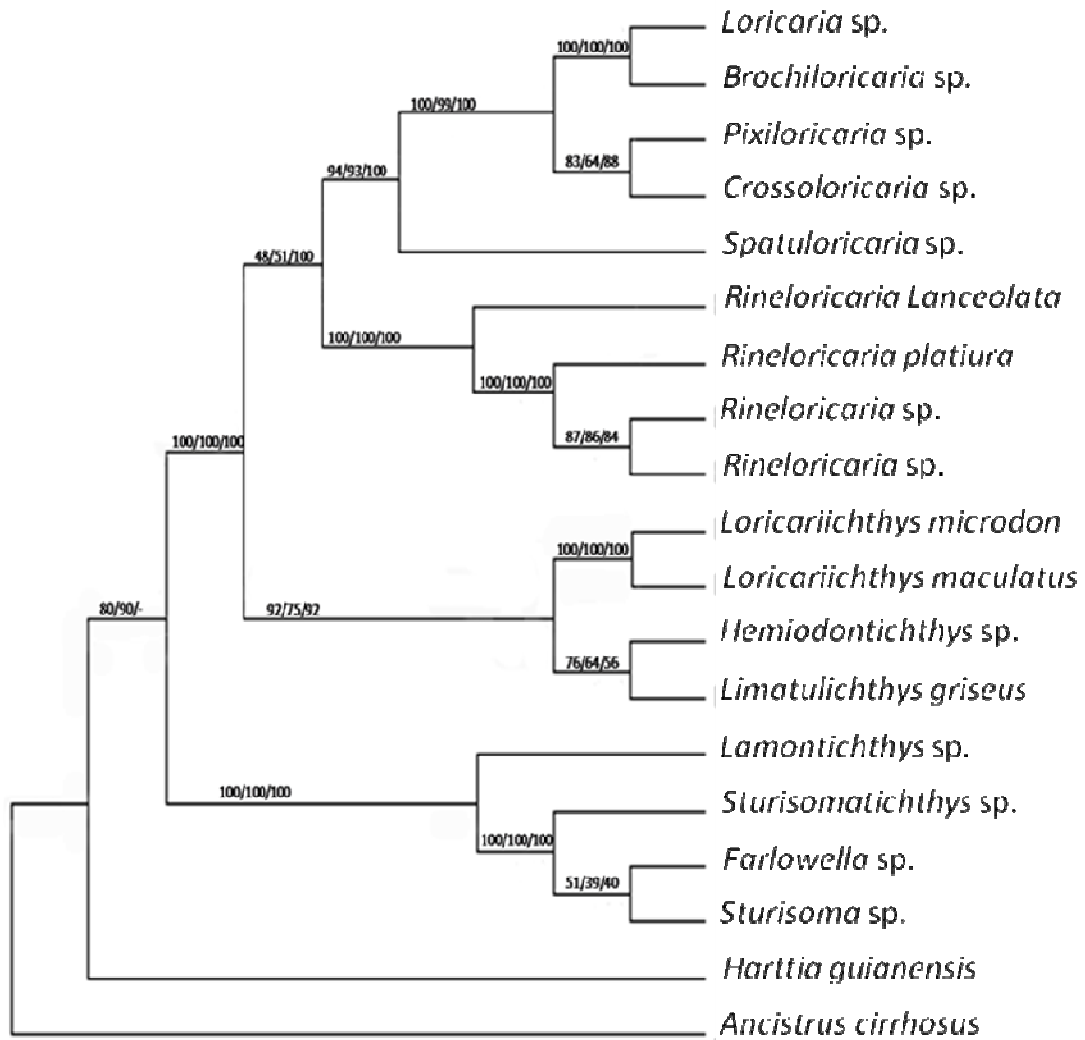


FIGURA 11: Topologia consenso por maioria encontrada a partir da análise de Máxima Parcimônia das relações entre gêneros da subfamília Loricariinae com base em caracteres moleculares de seqüências dos genes 12S, 16S e F-Reticulon 4. Os valores acima dos ramos representam os valores de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) para a análise de Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Neighbour-Joining, respectivamente.

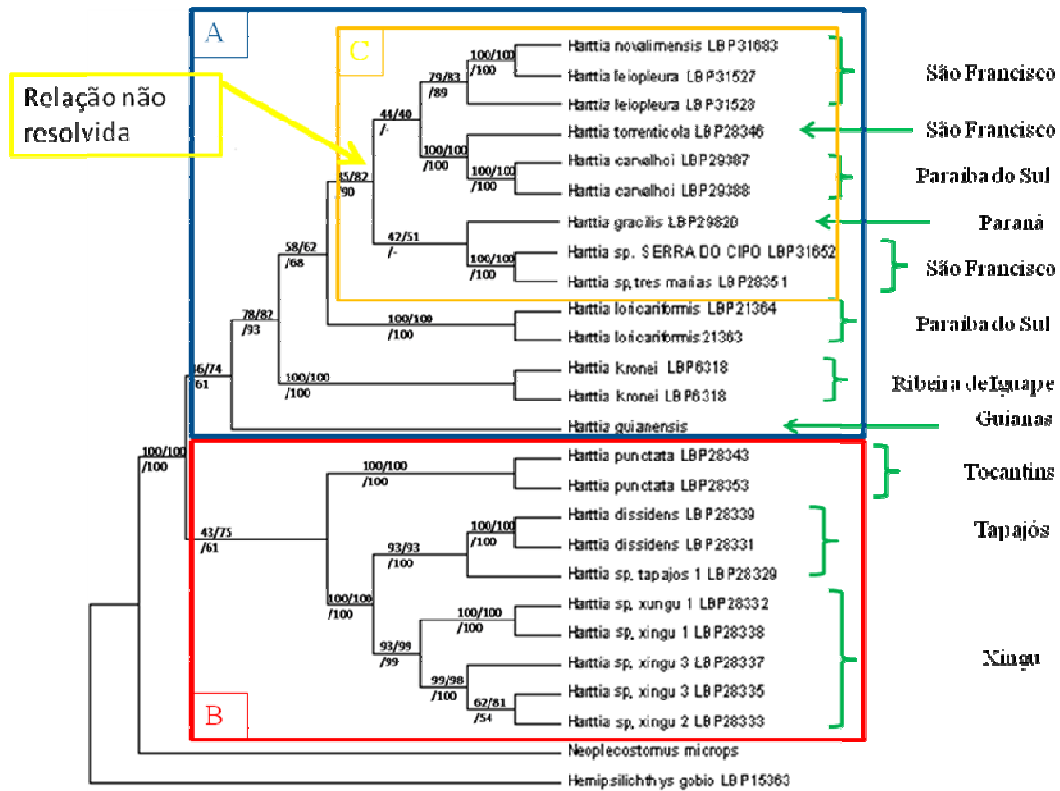


FIGURA 12: Topologia consenso por maioria encontrada a partir da análise de Máxima Parcimônia das relações entre as espécies de *Harttia*, com base em caracteres moleculares de seqüências dos genes COI e F-Reticulon -4 com a identificação das bacias onde elas ocorrem. “A” representa o grupo de espécies do sudeste do Brasil mais a *Harttia* das guianas; “B” representa o grupo de espécies que ocorrem nos afluentes da margem esquerda do amazonas; “C” Representa um grupo de espécies cuja relação não foi resolvida. Os valores acima dos ramos representam os valores de bootstrap (1000 replicas) para a análise de Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança respectivamente, e o número abaixo representa o valor de *bootstrap* (1000 replicas) da análise de Neigbor-Joining.

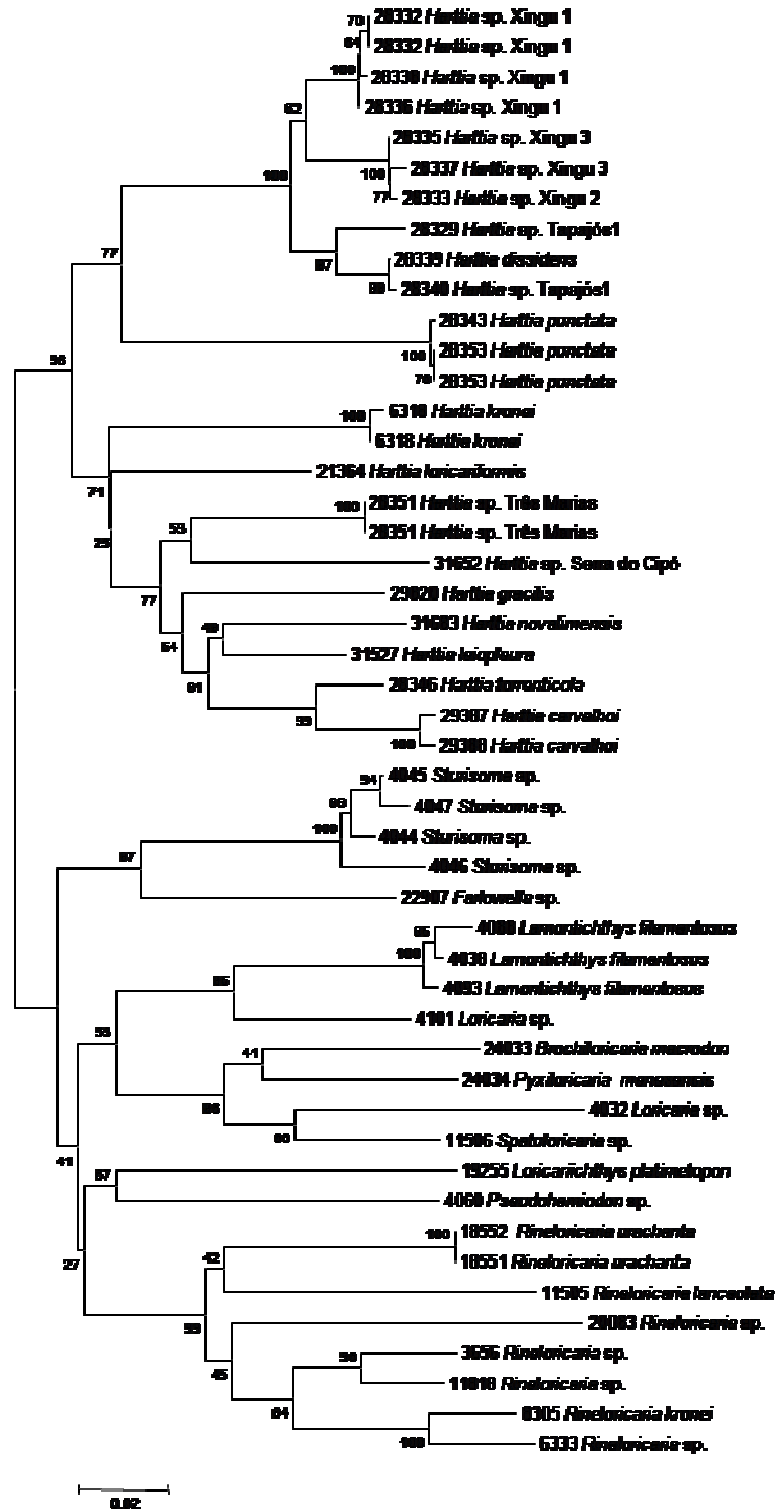


FIGURA 13: Árvore de distância genética pelo método de Neighbour-Joining com base em caracteres moleculares de seqüências parciais do gene COI demonstrando a distância relativa entre espécies da subfamília Loricariinae. Os valores indicados acima dos ramos representam o valor de *bootstrap* encontrado no consenso de 1000 réplicas.

5. DISCUSSÃO

5.1. Relação entre os gêneros de Loricariinae

Numa primeira análise buscou-se testar três hipóteses a partir da filogenia baseada em caracteres moleculares oriundos de seqüências parciais do gene nuclear F-Reticulon-4. A topologia resultante está representada na Figura 10. Nessa análise, como mencionado anteriormente, foram removidas as regiões de íntrons que eram particulares de algumas espécies. Os *gaps* não foram considerados como quinta base. Essa árvore foi enraizada em *Hemipsilichthys gobio*, uma vez que essa espécie pertence à subfamília Delturinae, uma das mais basais em Loricariidae (Arbruster *et al* 2004 e Reis *et al.* 2005).

Nessa árvore (Figura 10) pode-se observar, dentre outros aspectos, a relação entre os grandes grupos de Loricariidae, onde Loricariinae aparece monofilética e como grupo-irmão de Hypostominae, Neoplecostominae e Hypoptopomatinae. Esse fato corrobora a filogenia proposta por Py-Daniel (1997) e Chiachio *et al.* (2008), mas não concorda com a hipótese de Armbruster (2004), onde Loricariinae aparece como irmã de Hypostominae e esse grupo irmão do composto por Hypoptopomatinae e Neoplecostominae.

Nota-se nessa topologia que o gênero *Pareiorhaphys* aparece como parafilético apresentando *Isbrueckerichthys alipionis* em posição interna. Essa relação estreita entre *Pareiorhaphys* e *Isbrueckerichthys* também pode ser observada em Chiachio *et al.* (2008), porém nesse trabalho *Isbrueckerichthys* é parafilético.

Outro aspecto observado é o monofiletismo da subfamília Loricariinae com um alto suporte estatístico para todos os métodos de análises. Esse fato corrobora as filogenias

apresentadas em Py-Daniel (1997), Montoya-Burgos *et al.* (1998), Armbruster (2004) e Chiachio *et al.* (2008).

Nessa mesma filogenia (Figura 10) é importante notar a posição do gênero *Harttia* que aparece como grupo-irmão de todos os demais loricariíneos analisados, como também foi observado por Montoya-Burgos *et al.* (1998) e Covain *et al.* (2008). Mais importante ainda para essa análise é observar o monofiletismo do gênero, incluindo *Harttia guianensis* como espécie integrante do gênero *Harttia*. Esse fato é importante para nossas análises seguintes, pois *Harttia guianensis* é a espécie que representa o gênero *Harttia* na análise das relações entre gêneros da subfamília Loricariinae.

Para análise das relações ditas anteriormente, foi utilizada uma matriz com seqüências parciais do gene nuclear F-Reticulon 4 (removidos os íntrons) mais as seqüências dos genes mitocondriais 12S e 16S com o RNA transportador da Valina que existe entre eles. Intencionou-se montar uma matriz com grande número de caracteres conservados o bastante para não apresentarem alto valor de saturação em grupos antigos como os gêneros da subfamília Loricariinae. A partir dessa análise obteve-se a topologia apresentada na Figura 11. Na árvore resultante *Ancistrus cirrosus* foi utilizado como grupo externo a Loricariinae. *Harttia* foi o primeiro gênero a divergir em nossa análise. Esse nó possui alto suporte estatístico e reduz a tribo Harttiini apenas ao gênero *Harttia* e porventura algum outro gênero por nós não analisado como, por exemplo, *Harttiella*, *Pterosturisoma* e *Cteniloricaria*. Isso implicaria numa elevação da subtribo Sturisomina a tribo Sturisomini ou incorporação dessa subtribo na tribo Loricariini. É importante notar que nas análises filogenéticas desse grupo realizadas a partir de dados moleculares que estão presentes na literatura também apontaram para a posição basal do gênero *Harttia*

(MONTROYA-BURGOS *et al.*, 1998; COVAIN *et al.*, 2008), enquanto que nas filogenias baseadas em dados morfológicos sustentam a validade da tribo Hartiini abrangendo *Sturisoma*, *Sturisomatichthys*, *Farlowella*, *Lamontichthys*, *Harttiella*, *Cteniloricaria* e *Pterosturisoma*. Entretanto, em nenhuma das análises morfológicas as posições desses gêneros são congruentes, o que pode indicar, entre outras coisas, uma falta de caracteres que elucidem tais relações.

No próximo nó a subtribo Sturisomina é sustentada em nossa análise por um grande suporte estatístico, sendo que nessa tribo o primeiro gênero a se divergir é *Lamontichthys*. Esse dado corrobora os resultados obtidos por Covain *et al.* (2008). Nota-se também um alto valor de *bootstrap* no grupo irmão de *Lamontichthys* formado por *Sturisomatichthys*, *Sturisoma* e *Farlowella*, porém a relação interna desse último grupamento permaneceu pouco resolvida.

Tal problema também foi notado em Covain *et al.* (2008), onde *Farlowella* apresentou-se como parafilético com uma espécie irmã de *Sturisoma* e outra de *Sturisomatichthys* (Figura 6). Entretanto na análise onde apenas genes nucleares foram usados essa relação foi bem resolvida, *Farlowella* aparecendo como irmã de *Sturisomatichthys* e esses irmãos de *Sturisoma*.

A próxima dicotomia separa a tribo Loricariini dos demais representantes de Loricariinae, sendo que dentro da tribo o primeiro grupo a derivar é o composto por *Loricariichthys*, *Hemiodontichthys* e *Limatulichthys*. Esse grupamento é concordante com todas as topologias presentes na literatura em que esses gêneros foram utilizados.

Em nossos resultados *Loricariichthys* aparece como basal clado *Limatulichthys* + *Hemiodontichthys*, concordando com os resultados obtidos em Covain *et al.* (2008) e em

contrapartida discordando de Py-Daniel (1997) e Covain *et al.* (2007), que agrupam *Loricariichthys* e *Hemiodontichthys* tendo *Limatulichthys* como basal. Isso sugere que um estudo mais amplo das relações dentro desses grupos deva ser realizado.

O próximo agrupamento a se derivar possui como grupo mais basal o composto por *Rineloricaria* e *Pseudoloricaria*, tendo *Rineloricaria* como parafilético, irmão do grupo composto por (*Spatuloricaria*, ((*Crossoloricaria*, *Pixyloricaria*), (*Loricaria* e *Brochiloricaria*))). Isso é parcialmente coerente com as topologias apresentadas em Py-Daniel (1997), Montoya-Burgos *et al.* (1998), Armbruster (2004) e Covain *et al.* (2008), porém discordante da apresentada em Covain *et al.* (2007).

5.2 Relação entre as espécies de *Harttia* e implicações biogeográficas.

A partir da análise realizada com seqüências do gene F-Reticulon 4 foi confirmado o monofiletismo do gênero *Harttia*, sendo também reafirmada a posição basal desse gênero em relação aos gêneros analisados a partir de seqüências de 12S-16S e F-Reticulon 4. Com isso a matriz que busca entender as relações internas no gênero foi confeccionada com 26 amostras, sendo 24 do gênero *Harttia* pertencentes a 16 espécies diferentes (Figura 12). *Hemipsilichthys gobio* e *Neoplecostomus microps* foram tratados como grupos externos.

Nota-se nessa topologia a divisão do gênero *Harttia* em dois grandes grupos: um grupo de espécies pertencente às bacias do Sudeste mais uma espécie do escudo das Guianas (Grupo A) e outro das espécies pertencentes aos afluentes da margem direita do rio Amazonas (Grupo B) (Figura 12). No Grupo A, o agrupamento entre espécies das bacias

do sudeste com espécies representantes das Guianas parece estranho, uma vez que uma espécie de regiões extremas da distribuição de *Harttia*. Entretanto, em Montoya-Burgos (2003) a estreita relação entre espécies de *Hypostomus* das Guianas e do Sudeste do Brasil também foi constatada (Figura 14). Inclusive pode-se observar nesse trabalho que no grupo de espécies apontado como irmão do grupamento Sudeste do Brasil-Guiana aparecem as espécies do Tocantins, o que reforça a hipótese de que o evento vicariante que ocorreu separando populações ancestrais de *Harttia* do Grupo A das do Grupo B ocorreu anteriormente ao evento que dividiu o Grupo A em um grupo das Guianas e um grupo do sudeste do Brasil.

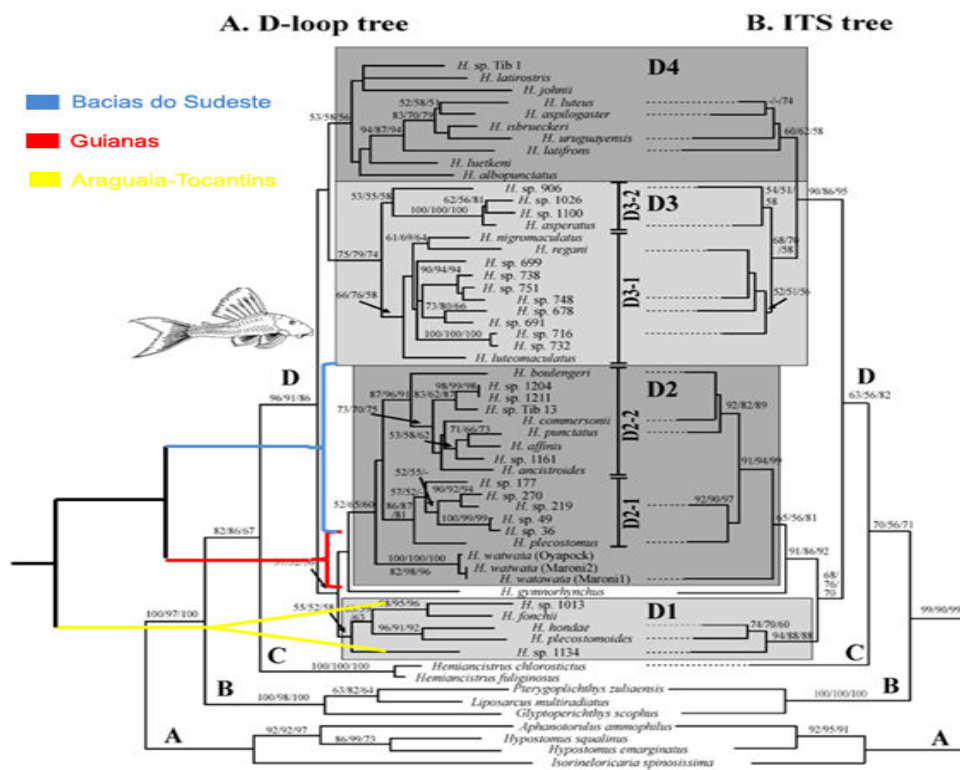


FIGURA 14: (A) árvore de Máxima Verossimilhança baseada em seqüências D-loop para as espécies de *Hypostomus* utilizando o modelo GTR + Γ_4 (ln L = -6726.965). Acima dos ramos estão representados os valores de suporte de *bootstrap* superiores à 50% para as análises de ML, MP e NJ respectivamente. (B) árvore de Máxima Verossimilhança baseada em seqüências da região ITS para 21 espécies de *Hypostomus* utilizando o modelo GTR + Γ_4 (ln L = -4748.709). Acima dos ramos estão representados os valores de suporte de *bootstrap* superiores à 50% para as análises de ML, MP e NJ respectivamente (Modificado de Montoya-Burgos 2003)

Segundo Lundberg *et al.* (1998), a inversão do sentido das águas do Paleo-Amazonas-Orinoco ocorreu há cerca de 8 milhões de anos, dando origem ao leito “moderno” do rio Amazonas. A partir desse evento o leste da América do Sul foi dividido em duas partes, uma das Guianas e outra do Leste do Brasil. Essa inversão no sentido do Paleo-Amazonas-Orinoco pode ter sido um dos eventos que teriam levado à primeira cladogênese observada nas *Harttia* do Grupo A em nossas análises. Levando-se em conta o hábito de vida das espécies de *Harttia* de ocupar regiões de cabeceira (COVAIN, 2007), seria pouco parcimonioso admitir que o ancestral que ocupava a porção Leste da América do Sul pudesse ser capaz de ocupar o leito de grandes rios. Por esse motivo o leito do Amazonas funcionaria como uma barreira, isolando as populações presentes em cada margem do Amazonas. Pela somatória desses fatos, a mudança do leito do Paleo-Amazonas-Orinoco dataria o tempo mínimo de divergência entre os dois grupos.

Contudo, em Montoya-Burgos (2003) a partir do uso de técnicas de relógios moleculares, é datado que o evento que separou as espécies de *Hypostomus* do Sudeste do Brasil das espécies das Guianas ocorreu em aproximadamente 5.5 milhões de anos, divergindo bastante dos 8 milhões de anos da inversão do sentido das águas do Paleo-Amazonas-Orinoco. Isso sugere que não tenha sido o mesmo evento que separou as espécies de *Hypostomus* e *Harttia* dessas regiões, ou talvez essa discordância temporal possa ter ocorrido devido a um erro de calibração do relógio molecular, onde apenas um evento geológico conhecido foi usado para a calibração. Para se realizar essa calibração foi utilizado o soerguimento da porção norte dos Andes, responsável pela separação do lago Maracaibo da bacia do Orinoco, ocorrida a aproximadamente 8 milhões de anos. Esse evento levou à separação espacial dos ancestrais de *Hypostomus hondae* e de *Hypostomus*

plecostomoides. Porém o aparecimento de tal barreira não seria necessariamente o responsável por um processo de cladogênese entre os ancestrais de *Hypostomus hondae* de *Hypostomus plecostomoides*, a cladogênese poderia ter ocorrido anteriormente ao surgimento da barreira. Caso isso tenha ocorrido e o evento de surgimento de barreira fosse usado para calibrar o relógio molecular, esse iria subestimar o tempo de divergência do grupo em questão, o que por consequência, subestimaria o tempo de divergência de cada evento cladogenético onde esse relógio fosse utilizado.

O segundo evento cladogenético que ocorreu no grupo A separou *Harttia kronei* (Bacia do rio Ribeira de Iguape) do restante das espécies de *Harttia* mais derivadas desse grupo. Em Montoya-Burgos (2003) é estimado que a separação entre a bacia do rio Ribeira de Iguape da bacia do rio Paraíba do Sul tenha ocorrido em torno de 4 milhões de anos atrás, porém essa datação também pode estar subestimando tal evento. *Harttia loricariformis* é a próxima espécie a se derivar em nossa topologia aparecendo como irmã do grupo formado por *H. leiopleura*, *H. novalimensis*, *H. torrenticola*, *H. carvalhoi*, *H. sp. Serra do Cipó*, *H. sp. Três Marias* e *H. gracilis* (Grupo C) (Figura 12, Figura 16). Nota-se nesse ramo que os grupos por bacias não são monofiléticos, indicando uma mistura ictiofaunística entre as bacias do Sudeste do Brasil. Ribeiro (2008) encontrou um resultado que também indica tal mistura ictiofaunística entre essas bacias. Nesse mesmo trabalho é sugerido que tal mistura tenha ocorrido devido a eventos de neotectônica, que teriam proporcionado capturas de cabeceiras entre bacias vizinhas. Cordani *et al.* (2000) e Cordani & Sato (1999) apud Ribeiro (2008) apontam que na região de Ouro Preto (MG), onde há grande proximidade entre cabeceiras das bacias dos rios Paraná, São Francisco, Paraíba do Sul e Doce, existe uma formação geológica do tipo Cráton (Figura15). Sendo os Crátons

formações sujeitas a eventos de neotectônicas, essa região poderia ser uma possível região de mistura ictiofaunística entre as bacias do Sudeste Brasileiro.

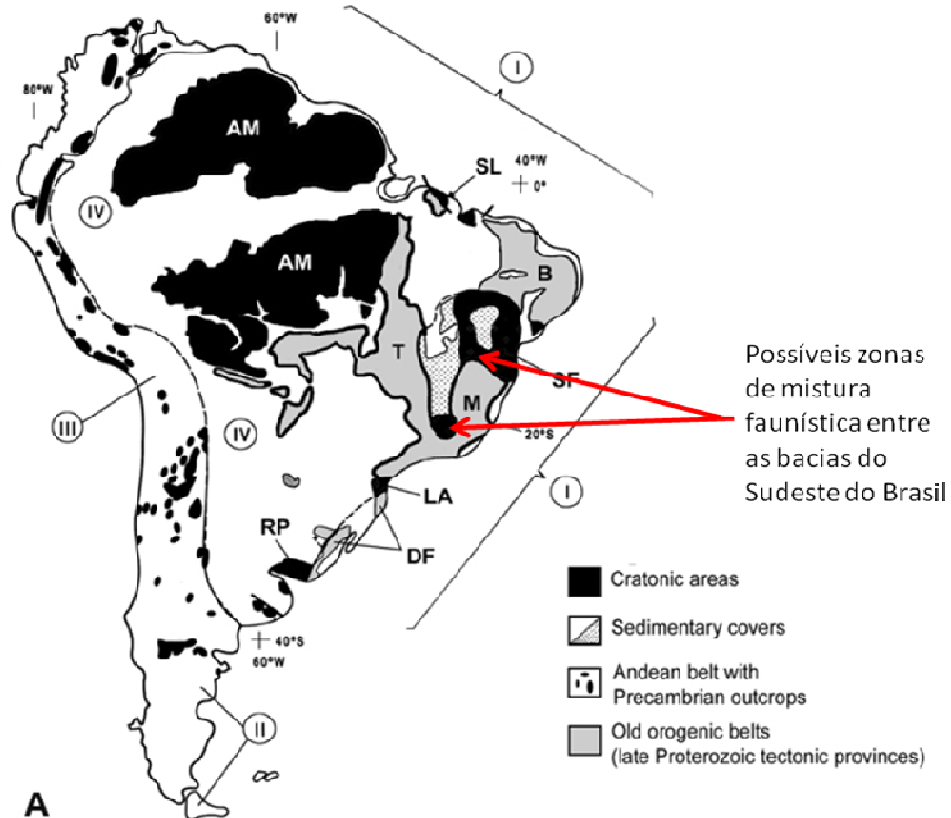


FIGURA 15: Províncias tectônicas do continente sul-americano com as possíveis zonas de mistura ictiofaunística entre as do Sudeste Brasileiro. I-Plataforma Sul Americana; II-Macício da Patagônia; III-Cinturão orogenético andino IV-Bacias sedimentares. AM – Cráton Amazônico; SF - Cráton do São Francisco; SL - Cráton São Luis; LA - Cráton Luiz Alves; RP – Cráton Rio de la Plata; B - Província Borborema; T- Província Tocantins; M -Província Mantiqueira; DF-Cinturão Don Feliciano. (Modificado de Cordani *et al.*, 2000 e Cordani & Sato, 1999).

Dentro do grupo C três grupos monofiléticos bem sustentados são observados. Um constituído por *H. torrenticola* e *H. carvalhoi*, outro agrupando *Harttia* sp. Três Marias com *Harttia* sp. Serra do Cipó e o agrupamento entre *H. novalimensis* e *H. leiopleura*. Dentro do

grupo C a posição de *H. gracilis* não pôde ser definida com nosso conjunto de dados (Figura 16).

É interessante notar a relação entre *H. torrenticola* e *H. carvalhoi*, sabendo-se que *H. torrenticola* está distribuída pelo alto São Francisco e *H. carvalhoi* é uma espécie do rio Paraíba do Sul. É possível que o evento que tenha separado os ancestrais dessas espécies possa ter ocorrido no médio São Francisco, que também é uma região de Cráton (Figura 15). Esse fato caracterizaria tal região como um possível segundo ponto de mistura ictiofaunística entre as bacias do Sudeste do Brasil. Uma vez que o Médio São Francisco não faz fronteira com o rio Paraíba do Sul, a rota de mistura entre essas faunas poderia ser: Médio São Francisco - Alto São Francisco – rio Paraíba do Sul ou Médio São Francisco – rio Doce – rio Paraíba do Sul. Assim, essa hipótese talvez pudesse ser testada acrescentando a espécie de *Harttia* da bacia do rio Doce em nossas análises.

Harttia sp. Três Marias e *Harttia* sp. Serra do Cipó são espécies que ainda não foram descritas e a partir da análise realizada com as seqüências parciais do gene mitocondrial COI (Figura 13) a divergência genética entre essas amostras apresentou-se bastante elevada (9,2% de divergência), próxima ao nível de divergência encontrada entre espécies diferentes, o que indicaria que essas amostras representariam indivíduos de espécies diferentes, porém intimamente aparentadas.

A confirmação de que *H. leiopleura* pertence ao gênero *Harttia* mostra que a hipótese de Isbrucker (2001) de que essa espécie devesse ser transferida para o gênero *Qiritichthys* não é válida.

O clado B da nossa topologia agrupa as espécies pertencentes aos rios afluentes da margem direita do rio Amazonas, tendo como primeira espécie a se divergir *Harttia*

punctata, da bacia do Araguaia-Tocantins. O grupo irmão de *H. punctata* é composto pelas espécies do rio Tapajós e do rio Xingu, cada rio contendo seu grupo monofilético de espécies.

O grupo do rio Tapajós é composto por *Harttia dissidens* e *Harttia. sp. Tapajós 1*, que ainda não foi descrita. Entretanto na análise de distância genética realizada com o gene COI (Figura 13) podemos constatar que as “espécies” não são monofiléticas e que a divergência genética entre essas duas é muito pequena, sugerindo que possam pertencer a mesma espécie.

Por outro lado o grupo do rio Xingu apresentou dois subgrupos, um composto por *Harttia. sp. Xingu 1* e outro composto por *Harttia. sp. Xingu 2* e *Harttia. sp. Xingu 3*, onde *Harttia. sp. Xingu 3* não é monofilética. Na análise de distância apresentada na (Figura 13) podemos observar que a divergência genética entre *Harttia. sp. Xingu 2* e *Harttia. sp. Xingu 3* é bastante pequena, sugerindo que possam pertencer a mesma espécie. Porém nenhuma espécie de *Harttia* foi descrita para o rio Xingu até o momento.

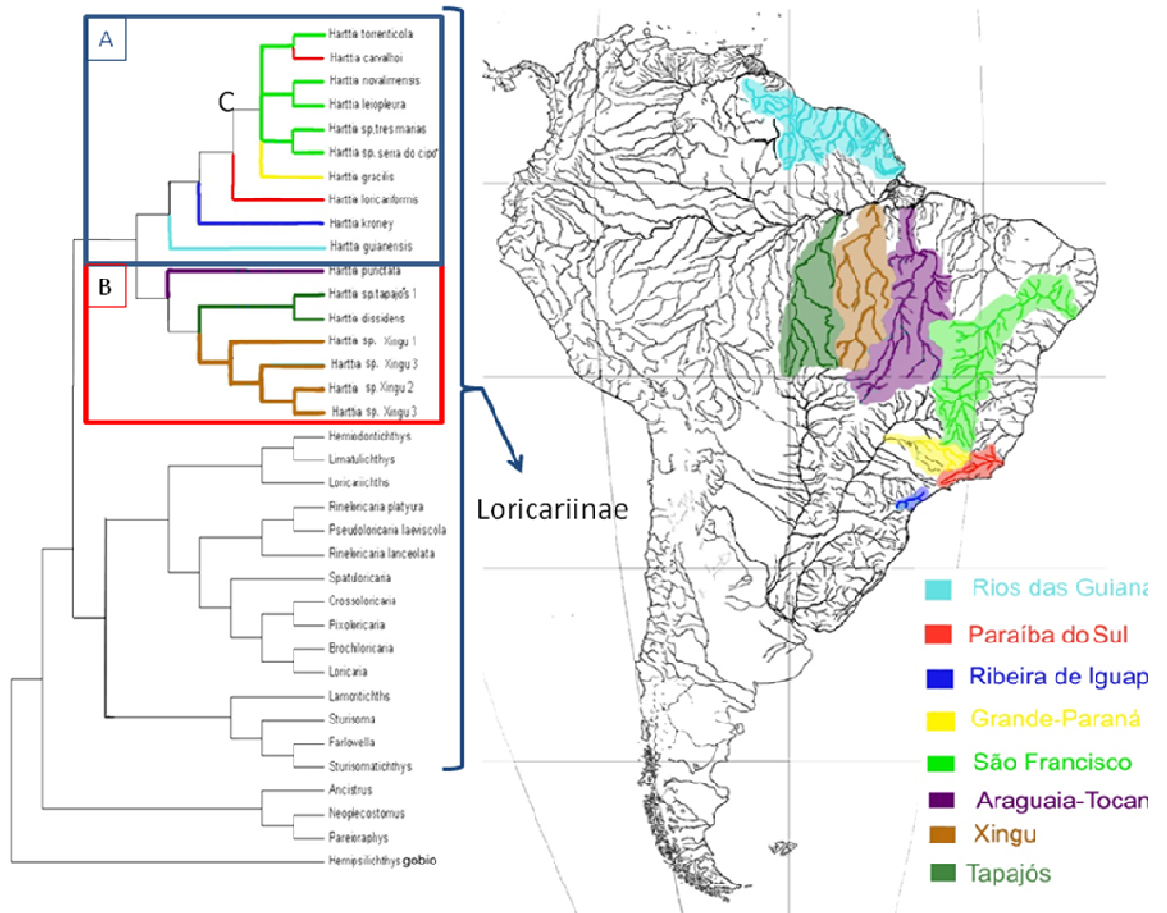


FIGURA 16. Hipótese resumida das relações filogenéticas entre gêneros da subfamília Loricariinae, baseada em caracteres moleculares de origem mitocondrial e nuclear com inferências biogeográficas entre espécies do gênero *Harttia* e mapa simbolizando as bacias de onde obtivemos amostras de *Harttia* analisadas.

6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir, a partir de nosso conjunto de dados e de nossas análises, que:

1. A Subfamília Loricariinae é um grupo monofilético ;
2. A tribo Loricariini representa um grupo monofilético;
3. Os gêneros *Sturisoma*, *Farlowella*, *Sturisomatichthys* e *Lamontichthys* não fazem parte da tribo Harttiini;
4. *Harttia* é um grupo natural;
5. A hipótese de Isbrucker (2001) incluindo *Harttia leiopleura* no gênero *Quirichthys* não é válida;
6. Eventos de captura de cabeceiras devem ter tido grande importância como evento vicariante responsável por processos cladogenéticos dentro do grupo de *Harttia* do Sudeste Brasileiro;
7. O grupo de *Harttia* ocupante dos afluentes da margem direita do rio Amazonas é irmão do composto pelas *Harttia* do Sudeste do Brasil mais a *Harttia* das Guianas analisada, repetindo o padrão de parentesco de áreas apontado em Montoya-Burgos (2003).
8. É necessária uma revisão do gênero *Harttia*, descrevendo as novas espécies descobertas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armbruster J.W. (2004).** Phylogenetic relationships of the sucker-mouth armored catfishes (Loricariidae) with particular emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 141, 1-80.
- Bremer K. (1988).** The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution*, 42: 795-803.
- Britto M. R. (2003).** Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysi). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 512 pp.
- Chiachio M. C. Oliveira C. and Montoya-Burgos J.I. (2008).** Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical, *Mol. Phylogenet. Evol.* (2008), doi:10.1016/j.ympev. 2008.08.013
- Covain R. (2005).** Etude Morphologique et Phylogenetique des poissons Chats cuirasses Neotropicaux de la sous-famille des Loricariinae. Tese de mestrado apresentado à univercidade de Genebra.
- Covain R. Le-Bail P. Sagnes P. and Fisch-Muller S. (2006).** Les espèces du genere *Harttia* (Siluriformes: Loricariidae) en Guyane française, taxinomie et distribution. *Cybium* 30(1): 3-18
- Covain R. and Fisch-Muller S. (2007).** The genera of the Neotropical armored catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes: Loricariidae): a practical key and synopsis *Zootaxa*, 1462 1-40.
- Covain R. and Fisch-Muller S. (2008).** Assessing phylogenetic dependence of morphological traits using *Mol. Phylogenet. Evol.* (2008), doi:10.1016/j.ympev.2007.12.015
- de-Pinna M.C. (1998).** Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. IN: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S., eds). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, 279-330 pp.

- Edgar R.C. (2004).** MUSCLE. multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput Nucleic Acids Research, 32: 1792-1797. evolutionary substitution rates. J. Mol. Evol. 20:86-93.
- Felsenstein J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39, 783-791.
- Felsenstein J. (2004).** Inferring phylogenies. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 664 pp.
- Ferraris C. J Jr (2007).** Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types Zootaxa 1418 628 pp.
- Hall T.A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- Isbrücker I. J. H. I., Seidel J.P., Michels E. Schraml and A. Werner. (2001).** Diagnose vierzehn neuer Gattungen der Familie Loricariidae Rafinesque, 1815 (Teleostei, Ostariophysi). Pp. 17-24, in: R. Stawikowski (ed.), Harnischwelse 2. Die Aquarien- und Terrarien Zeitschrift, Sonderheft, Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Kimura M. (1981).** Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide Lanave, C., G. Preparata, C. Saccone and G. Serio. 1984. A new method for calculating
- Lundberg G. J., Marshall G.L., Guerreiro J., Horton B. Malabarba M. C. S. L. and Wesselingh F. (1998).** The Stage for Neotropical Fish Diversification: A History of South American Rivers. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, C.A.S. eds. Phylogeny and classification of neotropical fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS, 363-374.
- Malabarba L.R., Reis R.E., Vari R.P., Lucena Z.M.S. and Lucena C.A.S. (1998).** Phylogeny and classification of neotropical fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS, 603 p.
- Mayr E. (1998).** O desenvolvimento do pensamento biológico: diversidade, evolução e herança. Editora Universidade de Brasília: Brasília, DF, 1998. 1107p. model of nucleotide substitution. J. Theor. Bio. 142:485-501.

- Montoya-burgos J.I. (2003).** Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology* 12, 1855–1867
- Montoya-Burgo J.I., Fisch-Muller S., Weber C. and Pawlowski J. (1998).** Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) basen on mitochondrial rRNA gene sequences. IN: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S., eds). Porto Alegre: EDIPUCRS, pp. 363-375.
- Nei M., Kumar S. (2000).** *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York, USA.
- Nelson J.S. (2006).** *Fishes of the world*. 4th ed., John Wiley e Sons, Inc. 601 pp.
- Posada D., Crandall K.A. (1998).** Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Provenzano R. F., Machado-Allison, Chernoff B., Willink P. and Petry P. (2005).** *Harttia marevari*, a new species of catfish (Siluriformes: Loricaridae) from Venezuela. *Neotropical Ichthyology*, 3(4):519-524.
- Py-Daniel L. R. (1997).** Phylogeny of the neotropical armored catfishes of the subfamily Loricariinae (Siluriformes; Loricariidae). Ph.D. Thesis. The University of Arizona, 280pp.
- Rapp Py-Daniel L. and Oliveira C. E. (2001).** Seven new species of *Harttia* from the Amazonian-Guyana region (Siluriformes: Loricariidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters*. Vol 12, No. 1,pp 79-96
- Reis R.E., Kullander S.O. and Ferraris-Jr., C.J. (2003).** Check list of the freshwater fishes of South and Central. Porto Alegre : EDIPUCRS. 742 p.
- Reis R.E., Pereira E.H.L. and Armbruster J.W. (2006).** Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 147: 277–299.

- Ribeiro C. A (2006).** Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin Neotrop. *Ichthyol.*, 4(2):225-246,
- Rodriguez R. J. L., Oliver A. Marin and J. R. Medina. (1990).** The general stochastic sequenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:454-458.
- Swofford D.L. (2002).** PAUP* - Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Swofford D.L., Olsen G.J., Waddell P.J. and Hillis D.M. (1996).** Phylogenetic inference. IN: *Molecular Systematics.* (Hillis, D.M, Moritz, C., Mable, B.K., eds). Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, USA, pp. 407-514.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S. (2007).** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0., *Mol Biol Evol.* (8):1596-9.
- Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22:4673-4680
- Xia X., Xie Z., (2001).** DAMBE. Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity* 92, 371-373.