



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO (PPGGBC)

ANÁLISE FILOGENÉTICA DA FAMÍLIA HEPTAPTERIDAE (TELEOSTEI:
SILURIFORMES) UTILIZANDO SEQUÊNCIAS DE GENES NUCLEARES E
MITOCONDRIAIS

RAMON ALMEIDA SANTOS



JEQUIÉ - BA
2021

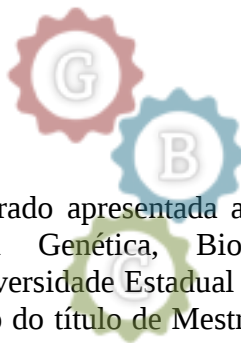


RAMON ALMEIDA SANTOS



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DA FAMÍLIA HEPTAPTERIDAE (TELEOSTEI:
SILURIFORMES) UTILIZANDO SEQUÊNCIAS DE GENES NUCLEARES E
MITOCONDRIAIS**



Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para obtenção do título de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Orientadora: Profa. Dra. Caroline Garcia

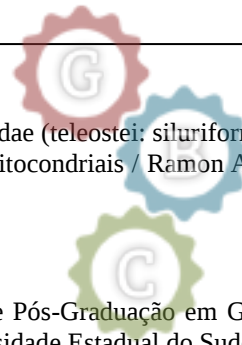
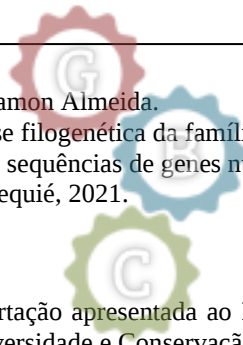
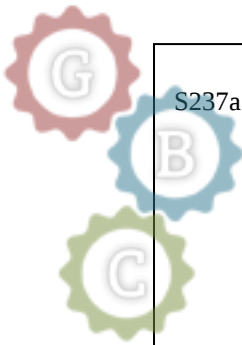


**Jequié - BA
2021**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

S237a Santos, Ramon Almeida.
Análise filogenética da família heptapteridae (teleostei: siluriformes)
utilizando sequências de genes nucleares e mitocondriais / Ramon Almeida
Santos.- Jequié, 2021.
57f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética,
Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da
Bahia - UESB, sob orientação da Profa. Dra. Ana Caroline Garcia)

1.Bagres 2.MtDNA II 3.Monofilia I.Universidade Estadual do Sudoeste
da Bahia II.Título

CDD – 617.7

Rafaella Cância Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual
Nº 16.825, de 04.07.2016

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “Análise filogenética da Família Heptapteridae (Teleostei: Siluriformes) utilizando sequências de genes nucleares e mitocondriais”.

Autor (a): Ramon Almeida Santos

Orientador (a): Profa. Dra. Caroline Garcia

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, pela Banca Examinadora:



Prof. Dr. Caroline Garcia – UESB / Jequié-BA



Prof. Dr. Marcelo Cervini – UESB / Jequié-BA



Prof. Dr. Karine Frehner Kavalco – UFV / Rio Paranaíba, MG

Campus de Jequié

(73) 3528-9725 | ppggbc@uesb.edu.br



Programa de Pós-Graduação em
Genética, Biodiversidade e Conservação



UESB



Governo do
Estado da Bahia

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual
Nº 16.825, de 04.07.2016

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Data de realização: 11 de junho de 2021.



Campus de Jequié

(73) 3528-9725 | ppggbc@uesb.edu.br

Campus de Itapetinga
Praça da Primavera, 40
Bairro Primavera
CEP 45.700-000
PABX.: (77) 3261-8600

Campus de Jequié
Rua José Moreira Sobrinho, s/n
Bairro Jequiezinho
CEP 45.200-000
PABX.: (73) 3528-9600

Campus de Vitória da Conquista
Estrada do Bem Querer, km 4
Bairro Universitário
CEP: 45031-300
PABX.: (77) 3424-8600

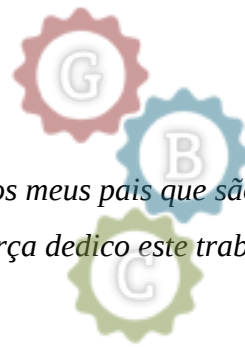
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



*Aos meus pais que são exemplos de
força dedico este trabalho!*

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



AGRADECIMENTOS

Ao *Aba* que me colocou em seu colo em todos os momentos, sem Ele não seria nada.

Aos meus pais Edna e Mauro que são meus pilares e meu motivo de maior orgulho e amor, sem a força deles eu seria quem sou e não chegaria até aqui.

Aos meus irmãos Romário e Rebeca que me guardam em suas orações e estão sempre disponíveis para me ajudar.

Aos meus familiares que sempre acreditaram em mim e me impulsionam a ir além!

Aos amigos que UESB me deu e que me animavam e estavam ali sempre que eu precisei.

A galera do Interlabão! Vocês são incríveis e nunca soltaram as minhas mãos.

A minha orientadora Caroline Garcia, a quem eu não palavras para agradecer por TUDO que fez por mim e pela pessoa forte e competente que é; uma amizade que a graduação me trouxe e que me aquece o coração. Carol amo sua vida e sua família: JP, Migles e o *little king* Tutu! Obrigado pelo incentivo, por cada conselho e correção que me nortearam até aqui.

Leydi, Marcelle e Marcia muito obrigado pelo apoio e ajuda durante essa caminhada, por cada contribuição extremamente válida ao meu trabalho, saibam que nunca vou esquecer.

Agradeço à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e ao Programa de Pós Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação (PPGGBC), pelo apoio e estrutura concedidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida.

Nada se constroi sozinho e sou muito grato por Deus sempre colocar pessoas em meu caminho que somam e multiplicam conhecimento, obrigado a cada um de vocês!



BIOGRAFIA

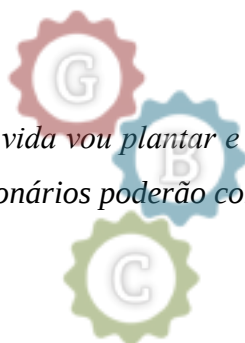
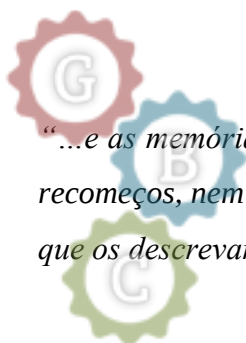
Eu, Ramon Almeida Santos, filho de Mauro Souza Santos e Edna Almeida Santos, nasci em Jequié no interior do estado da Bahia em 24 de abril de 1993. Cursei Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Genética pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Campus Jequié, de 2012 a 2016. Durante a graduação iniciei no segundo semestre de 2012 o estágio da iniciação científica sob a tutoria da professora Dr.^a Ana Lúcia Biggi de Souza no laboratório de Biologia Geral. Para o desenvolvimento das atividades do projeto a minha orientadora solicitou à professora Dr.^a Caroline Garcia então coordenadora do Laboratório de Citogenética a permissão para o uso do mesmo para preparação e análise das lâminas com os cromossomos das formigas. No segundo semestre de 2013 dei continuidade ao projeto que se tornou tema da monografia, projeto este que utilizava as formigas como bioindicadores de contaminação ambiental. Para auxiliar com a genética molecular minha orientadora convidou a professora Dr.^a Ana Maria Waldschmidt que também era coordenadora do Laboratório de Biologia Molecular, a professora Ana Maria posteriormente veio a ser coorientadora do meu projeto de monografia. Durante toda iniciação científica não tive auxílio de bolsas de iniciação o que não foi motivo para o desenvolvimento dos trabalhos com excelência. Ao longo do andamento do projeto realizei um estágio no Laboratório de Biologia Geral e no Núcleo de Microscopia e Microanálise na Universidade Federal de Viçosa. Concluí a graduação dentro dos quatro anos propostos para o curso e após a conclusão me distanciei por quase dois das atividades acadêmicas atuando como voluntário em um projeto social. Ao final desse período, no fim do segundo semestre de 2018 fiz a seleção para o mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação, ingressando no ano seguinte ao programa. Iniciei as atividades em março de 2019 sob a orientação da professora Dr.^a Caroline Garcia que desenvolve pesquisa em citogenética de peixes e da herpetofauna da Caatinga. Logo, mudei o objeto de estudo, passando a trabalhar com filogenia molecular da família Heptapteridae, um grupo de pequenos bagres encontrados ao longo da Região Neotropical. A minha orientadora possui um vasto conhecimento dentro da área na qual trabalha e muita disponibilidade como tutora para auxiliar o desenvolvimento do trabalho.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



*“...e as memórias desta vida vou plantar e as regar com
recomeços, nem mil dicionários poderão conter adjetivos
que os descrevam...”*

Os Arrais

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



RESUMO

A família Heptapteridae, endêmica da região Neotropical, é uma das famílias mais representativas dentro da ordem Siluriformes contando com 23 gêneros mais *Incertae sedis* (Ferraris, 2007) e 222 espécies validadas e 304 em avaliação (Eschmeyer, 2019). As relações filogenéticas e sistemática da família Heptapteridae apresentam problemas, principalmente na taxonomia a nível de espécie o que ainda desperta interesse em taxonomistas e geneticistas que buscam melhorar o conhecimento a respeito do grupo. O presente estudo foi conduzido visando testar a hipótese de monofilia tendo em vista os conflitos sobre a família Heptapteridae e sua importância evolutiva e a hipótese de relacionamento intergenérico proposta em estudos morfológicos. Os resultados deste estudo corroboram a monofilia da Família Heptapteridae proposta por Bockmann (1998), além da sua divisão em duas subfamílias: Rhamdiinae e Heptapterinae. Esta última ainda se subdivide em dois clados denominados tribo Brachyglaniini e tribo Heptapterini. Dos 23 gêneros considerados válidos para a família, 17 foram utilizados no presente estudo, sendo as informações aqui produzidas utilizadas como base para análises a respeito das relações entre os gêneros da família bem como sua relação com outras famílias da Ordem do Siluriformes.

Palavras chave: bagres, mtDNA, nDNA, monofilia



ABSTRACT

The Heptapteridae family, endemic to the Neotropical region, is one of the most representative families within the order Siluriformes, with 23 genera plus *Incertae sedis* (Ferraris, 2007) and 222 validated and 304 species under evaluation (Eschmeyer, 2019). Phylogenetic and systematic relations Heptapteridae family present problems, particularly in taxonomy to species level which still arouses interest in taxonomists and geneticists seeking to improve the knowledge of the group. This study was conducted to test the hypothesis of monophyly in view of the conflict on Heptapteridae family and its evolutionary importance and the hypothesis of intergeneric relationship proposed in morphological studies. The results of this study support the monophyly of the Heptapteridae Family proposed by Bockmann (1998), in addition to its division into two subfamilies: Rhamdiinae and Heptapterinae. The latter is further subdivided into two clades called Tribe Brachyglaniini and Tribe Heptapterini. 23 genera are considered valid for the family, of these, 17 were used in this study, and the information produced here used as a basis for analysis about the relationship between the family genre and its relationship with other families of the Order Siluriformes.

Key words: phylogeny, multilocus analysis, heptapterids, catfish

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore filogenética para a Família Heptapteridae obtida através da Máxima Verossimilhança acessada através de marcadores mitocondriais (ATPase 6 e 8, Citocromo b e 16S) concatenados. O valor máximo de suporte dos ramos está representado pelos círculos pretos (●); valores de *bootstrap* entre de 70 - 90 % estão representados pelos círculos cinzas (●).....35

Figura 2: Árvore filogenética para a Família Heptapteridae obtida através da Inferência Bayesiana acessada através de marcadores mitocondriais (ATPase 6 e 8, Citocromo b e 16S) concatenados. A *probabilidade a posteriori* está representada pelos círculos pretos (●); e de *probabilidade a posteriori* entre de 0,7 e 0,8 estão representados pelos círculos cinzas (●).....36

Figura 3: Árvore filogenética para a Família Heptapteridae obtida através da Máxima Verossimilhança acessada através de marcadores nucleares (RAG1 e RAG2) concatenados. O valor máximo de suporte dos ramos está representado pelos círculos pretos (●); valores de *bootstrap* entre de 70 - 90 % estão representados pelos círculos cinzas (●).....37

Figura 4: Árvore filogenética para a Família Heptapteridae obtida através da Inferência Bayesiana acessada através de marcadores nucleares (RAG1 e RAG2) concatenados. A *probabilidade a posteriori* está representada pelos círculos pretos (●); e de *probabilidade a posteriori* entre de 0,7 e 0,8 estão representados pelos círculos cinzas (●).....38



LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Gêneros e espécies analisados no presente estudo.....30

Tabela 2: Caracterização das regiões mitocondriais e nucleares das amostras analisadas no presente estudo.....33



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



LISTAS DE ABREVIATURAS

ATP: Adenisona Trifosfato

BEAST: *Bayesian Evolutionary Analysis Samling Trees*

BI: Inferência Baeyiana

BLAST: *Basic Alignment Search Tool*

CIPRES: *Cyber Infrastructure for Phylogenetic Research*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: *deoxyribonucleotide triphosphates* - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EXO: Exonuclease I

GenBank: *Genoma Bank*

MEGA: *Molecular Evolutionary Generics Analysis*

ML: Máxima Verossimilhança

MrBayes: *Bayesian Inference of Phylogeny*

mtDNA: DNA mitocondrial

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial Hidrogeniônico

RAxML: *Randomized Axelerated Maximum Likelihood*

RNA: Ácido ribonucleico

rRNA: RNA ribossômico

SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

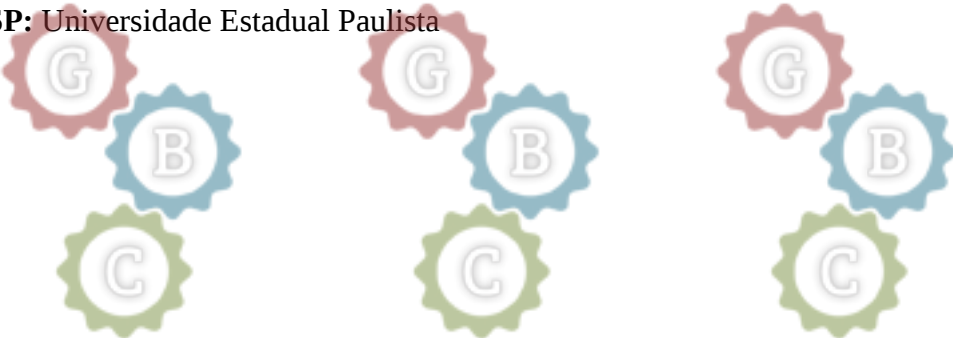
Taq DNA: *Thermus aquaticus DNA polimerase*

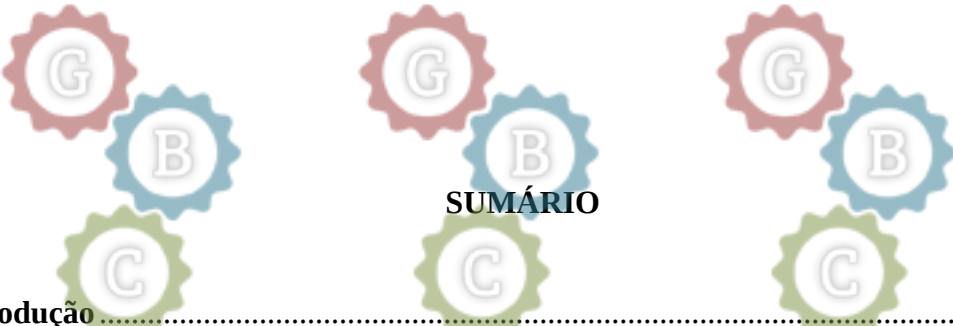
TE: solução de Tris-HCl e EDTA

tRNA: RNA transportador

UESB: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

UNESP: Universidade Estadual Paulista





SUMÁRIO

1.Introdução	11
2.Referencial Teórico	13
2.1. Características gerais da Ordem Siluriformes.....	13
2.2. A família Heptapteridae	15
2.3. Uso de marcadores mitocondriais e nucleares para o estabelecimento das relações filogenéticas em peixes, com ênfase em Siluriformes.....	19
3.Objetivos	23
3.1. Geral	23
3.2. Específicos	23
4.Material e Métodos	24
4.1. Obtenção e acondicionamento das amostras	24
4.2. Extração do material genético	24
4.3. Amplificação e purificação das amostras	25
4.4. Sequenciamento das amostras utilizadas.....	25
4.5. Edição das sequências	26
4.6 Análise das sequências	27
5.Resultados	31
5.1. Análises dos genes mitocondriais.....	32
5.2. Análises dos genes nucleares	34
5.Discussão	37
6.Considerações Finais	41
Referências Bibliográficas	42

1. Introdução

A Região Neotropical apresenta uma biodiversidade excepcional, rica em espécies endêmicas. Isso pode ser percebido, por exemplo, pela riqueza da ictiofauna dulcícola encontrada nessa região. A ordem dos Siluriformes, uma das mais representativas dos peixes de água doce dessa região, compõe uma parcela importante dessa fauna com 3.953 espécies reconhecidas, alocadas em 39 famílias (Eschmeyer, 2019).

A família Heptapteridae, endêmica da região Neotropical, é uma das famílias mais representativas dentro da ordem Siluriformes. Na filogenia morfológica proposta por de Pinna (1993) a família Heptapteridae foi confirmada como uma unidade monofilética, mostrando-se mais relacionada com a família de bagres asiáticos Bagridae do que com Pimelodidae e Pseudopimelodidae, até então consideradas como suas famílias irmãs.

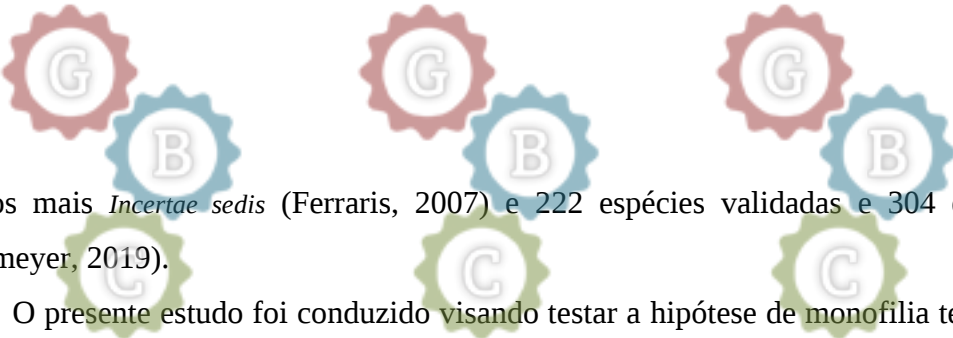
Os componentes da família Heptapteridae foram revistos por Bockmann (1998) de forma que a família passou a ser composta por 31 gêneros, sendo subdividida em duas tribos monofiléticas: Phreatobiini (que inclui os gêneros *Phreatobius*, *Gladioglanis* e os demais gêneros que possuem os músculos *adductor mandibulae* hipertrofiados) e Heptapterini (que inclui os demais gêneros e a maior parte das espécies de pequeno porte).

Bockmann e Guazzelli (2003) revisaram mais uma vez a família, que passou a ser composta por 26 gêneros e 186 espécies válidas, sendo ainda citada a existência de cerca de 50 espécies já conhecidas, porém não descritas (Bockmann e Guazzelli, 2003).

O número de gêneros e espécies dentro de Heptapteridae ainda é uma questão a ser elucidada, muitos dos gêneros propostos por Bockmann (1998) e Bockmann e Guazzelli (2003) foram sinonimizados e incluídos em gêneros validados para o grupo ou retirado. A exemplo de *Imparales* e *Medemichthys* incluídos em *Nemuroglanis* (Bockmann e Ferraris, 2005), e *Phreatobius* - gênero que fora considerado conflitante dentro dos Siluriformes.

Phreatobius, antes incluído em Heptapteridae (de Pinna, 1998; Bockmann, 1998), não foi mais considerado como parte da família em estudos moleculares mais recentes (Ferraris, 2007), mas como grupo-irmão de Pimelodidae e Pseudopimelodidae (Sullivan et al., 2013). Divergências com a resolução dos táxons dentro da família permanecem devido a conflitos entre identificação morfológica e as evidências genéticas disponíveis. Informações recentes a respeito da família Heptapteridae e suas relações intergenéricas e interespecíficas são descritas por Silva et al., (2021) e ajudam a compreender melhor a filogenia do grupo.

Em paralelo aos problemas que envolvem a taxonomia dos gêneros de Heptapteridae, estão aqueles referentes à taxonomia de suas espécies. A família Heptapteridae conta com 23



gêneros mais *Incertae sedis* (Ferraris, 2007) e 222 espécies validadas e 304 em avaliação (Eschmeyer, 2019).

O presente estudo foi conduzido visando testar a hipótese de monofilia tendo em vista os conflitos sobre a família Heptapteridae e sua importância evolutiva e a hipótese de relacionamento intergenérico proposta em estudos morfológicos recentes, para tanto, serão utilizados dados de sequenciamento de genes mitocondriais e nucleares. Associando a filogenia molecular obtida com a filogenia morfológica disponível, numa tentativa de melhor resolver as relações evolutivas entre os heptapterídeos, e se for o caso, indicar a necessidade de revisão na sistemática nomenclatural de possíveis gêneros e espécies conflituosos.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação

2. Referencial Teórico

2.1. Características gerais da Ordem Siluriformes

As bacias e rios da Região Neotropical abarcam cerca de 20% a 25% de toda a diversidade mundial de peixes, isto inclui atualmente mais de 6.000 espécies, podendo variar entre 8.000 e 9.000 espécies em estimativas recentes (Reis et al., 2016). Ao todo, 28 Ordens de peixes de água doce são descritas para o neotropico, sendo que Characiformes, Cypriniformes, Cichliformes, Gymnotiformes e Siluriformes compõem 94% da fauna de peixes dessa região (Malabarba & Malabarba, 2020).

Os Siluriformes, popularmente conhecidos como peixes de couro são um grupo de peixes predominantemente de água doce, onde as famílias Ariidae e Plotosidae, podem também apresentar representantes marinhos ou de água salobra. São encontrados em quase todos os continentes exceto na Antártida (Malabarba & Malabarba, 2020).

Apesar de sua ampla distribuição, das 39 famílias que compõem ordem, 15 têm ocorrência exclusiva nas Américas Central e do Sul (Ferraris, 2007, atualizadas em Eschmeyer et al., 2019). São estimadas mais 3.000 espécies apenas para a Região Neotropical, porém este valor é subestimado visto que mais da metade ainda não foram formalmente descritas (Ota et al., 2015). Entre as famílias de Siluriformes que ocorrem na Região Neotropical, cinco delas são responsáveis por cerca de 80% dessa riqueza, sendo essas: Callichthyidae, Heptapteridae, Loricariidae, Pimelodidae e Trichomycteridae.

Os Siluriformes apresentam um quadro estrutural, histórico e filogenético servindo como objeto de estudo para diversos trabalhos. Esse grupo de peixes é considerado uma fonte informativa sobre evolução morfológica e molecular devido ao elevado número de espécies, com uma ampla diversidade morfológica e ecológica (Muriel-Cunha, 2008).

Os peixes da Ordem Siluriformes compartilham algumas características como ossos simpléticos, suboperculares, basal e intermuscular ausentes; parietais aparentemente fundidos ao supraoccipital; mesoptergoide muito reduzido; preopérculo (sem membro horizontal) e interopérculo relativamente pequeno; pós-temporal presumivelmente fundido ao supracleithrum; vômer frequentemente dentado; barbatana adiposa geralmente presente; raios semelhantes a espinhos frequentemente presentes na frente das barbatanas dorsal e peitorais (mencionadas como espinhos nas descrições familiares), na maioria dos bagres a barbatana dorsal tem tecnicamente dois espinhos - o primeiro é muito curto e forma um mecanismo de bloqueio para a segunda coluna, que geralmente é a única referida nas descrições familiares; corpo nu ou coberto com placas ósseas; normalmente até quatro pares de barbilhos na cabeça,

um nasal, um maxilar e dois na mandíbula, os barbilhos nasais e queixo podem estar ausentes; maxila pequena e com ausência de dentes, funcionando com pequeno autopalatino para movimentação precisa do barbilho maxilar (Nelson, 2016).

Em alguns estudos a respeito dos Siluriformes foram propostas filogenias com base em caracteres morfológicos (de Pinna, 1993; Diogo, 2003), porém muitas delas apontavam divergência no que diz respeito ao posicionamento do grupo e as relações entre algumas famílias, mas suportavam a monofilia dos Siluriformes considerando semelhança para um conjunto de sinapormofias anatômicas (Arratia *et al.*, 2003).

A sistemática dos Siluriformes sempre foi bastante discutida, as relações entre as famílias e gêneros da ordem passam por constante revisão e muitas informações ainda permanecem conflituosas (de Pinna, 1998; Wang *et al.*, 2010; Malabarba & Malabarba 2020). Embora seja considerado como grupo monofilético reconhecido e amplamente estudado, muitas questões ainda precisam de respostas a respeito da classificação e relação entre famílias e dentro das mesmas (de Pinna, 1998; Diogo, 2003; Malabarba & Malabarba, 2020). Os estudos filogenéticos para os Siluriformes mais recentes também suportam a monofilia do grupo, mas ainda assim não compreendem todas as relações intergenéricas dentro das famílias e entre elas (Sullivan *et al.*, 2013).

As características morfológicas serviram de base para boa parte dos estudos filogenéticos para os Siluriformes, ao longo das últimas quatro décadas muitos trabalhos apresentaram propostas para as relações evolutivas entre as famílias do grupo, como visto em Howes (1983), Grande (1987), Schaefer (1990), Mo (1991), Arratia (1992), de Pinna (1991), Lundberg (1993), de Pinna (1995), de Pinna (1998) e He *et al.* (1999).

Ao se retirar as análises baseadas na morfologia, o que se sabe atualmente a respeito da filogenia para os Siluriformes pode ser encontrado em estudos moleculares como em Hardman (2005), onde ele analisou 170 espécies de bagres de 29 famílias utilizando sequencias do citocromo b, já o trabalho de Sullivan *et al.* (2006) analisou 110 espécies de 36 famílias com sequencias dos genes nucleares rag1 e rag2. Em um trabalho mais recente, Betancur-R *et al.* (2013) produziram uma análise ampla das principais linhagens de peixes ósseos o que incluiu 32 famílias de Siluriformes, utilizando marcadores moleculares, sendo 20 nucleares e 1 mitocondrial.

Muitas questões a respeito das relações filogenéticas entre as famílias dos Siluriformes ainda não estão resolvidas, além disso posicionamento de algumas delas dentro do grupo ainda não estão solucionados, como: Ancharidae, Austroglanididae, Bagridae, Chacidae, Claroteidae,

Cranoglanididae, Heptapteridae, Ictaluridae, Pangasidae, Pimelodidae, Plotosidae, Phreatobiidae, Pseudopimelodidae, Schilbiidae e Siluridae (Muriel-Cunha, 2008).

2.2. A família Heptapteridae

Dentre os Siluriformes, a família Heptapteridae, considerada endêmica da região Neotropical é uma das mais representativas dentro da ordem com 226 espécies válidas (Eschmeyer, 2020), alocadas em 24 gêneros (Ferraris, 2007; Eschmeyer, 2019). Os peixes dessa família habitam pequenos corpos d'água desde o México ao sul da Argentina (Bockmann & Guazzelli, 2003).

No Brasil, os peixes da família são popularmente conhecidos como bagres, bagres-da-pedra, bagrinhos, chicotes, cobrissas, guascas, jundiás, lobós, mandis, mandis-chorões, mandizinhos e manés-compridos (Bockmann & Slobodian, 2013). De modo geral, os heptapterídeos são peixes de pequeno porte, alguns sendo caracterizados como miniaturas, apresentando geralmente menos de 3 cm de comprimento padrão como espécies do gênero *Horiomyzon* Stewart (1986), porém algumas espécies podem ultrapassar os 30 cm de comprimento padrão, como algumas dos gêneros *Pimelodella* Eigenmann & Eigenmann (1888) e *Rhamdia* Bleeker (1858). Algumas espécies de heptapterídeos são troglomórficas, além de apresentarem hábitos alimentares diversificados, mas em sua maioria são onívoros ou carnívoros (Bockmann & Guazzelli, 2003).

Os peixes da família Heptapteridae tem pouca representatividade para pesca comercial e esportiva, isso pode estar associado pequeno porte e o hábito da maioria dos membros da família. De uma maneira geral não apresentam dimorfismo sexual, são peixes de hábitos solitários e uma dieta mais variada, a maioria carnívoros. Dessa forma alguns poucos peixes da família são utilizados como peixes ornamentais, como muitas espécies de *Brachyrhamdia* Myers (1927) e *Pimelodella* (Bockmann & Guazzelli, 2003).

Algumas características morfológicas são essenciais para definição de famílias ou clados superiores. A família Heptapteridae apresentam cinco sinapomorfias que a caracterizam e todas associadas ao esqueleto (Lundberg & McDade, 1986; Ferraris, 1988; Lundberg et al., 1991): 1) o ramo posterior do processo transversal da quarta vértebra é expandido lateralmente sobre a bexiga natatória e entalhado uma ou várias vezes; 2) os espinhos neurais do centro complexo de Weber estão co-ossificados, constituindo uma lâmina óssea reta ou, às vezes, suavemente arqueada; 3) o processo para inserção do músculo *levator operculi* na região póstero-dorsal da hiomandíbula é muito amplo; 4) o quadrado possui a borda dorsal livre, com

seus ramos anterior e posterior articulando separadamente com o metapterigoide e a hiomandíbula, respectivamente; e 5) o ângulo ventrolateral do mesetmoide é curvado anteriormente, formando um processo chamado de “gancho do mesetmoide”.

Apesar de apresentarem muitas estruturas que os diferenciem das demais famílias, ainda existem muitos problemas taxonômicos dentro do grupo que são principalmente causados devido à falta de características diagnósticas externas importantes para a identificação dos peixes dessa família, onde muitos desses caracteres são variáveis ou até mesmo se sobrepõem as características de Pimelodidae e Pseudopimelodidae (Bockmann & Guazzelli, 2003; Nelson, 2016).

A sistemática da família Heptapteridae é complexa e desde a década de 90 vêm sendo alvo de estudos e modificações por parte de taxonomistas e geneticistas (de Pinna, 1998; Diogo, 2003; Bockmann e Guazzelli, 2003; Bockmann e Ferraris, 2005; Ferraris, 2007). Antes de ser elevada à condição de família (de Pinna, 1993), Heptapteridae já foi considerada uma unidade natural dentro de Pimelodidae (Howes, 1983).

Por um certo período a família Pimelodidae abarcou um grupo de espécies, porém sem alguma sinapomorfia conhecida que pudesse a sustentar. Nesse conjunto estavam incluídas espécies que hoje estão alocadas dentro de Heptapteridae e Pseudopimelodidae e que representam grupos com monofilia reconhecida e distintas dos Pimelodidae *sensu stricto* (Sullivan et al. 2006). Nas últimas duas décadas a divisão de Pimelodidae em três clados distintos geraram discussões a respeito do suporte sustentado como conflitante para ambas as famílias (Rocha & Zuanon, 2013).

Em seu trabalho baseado na morfologia da bexiga natatória e aparelho de Weber, Howes (1983) divide Pimelodidae em três grupos, sendo um deles formado por *Rhamdia*, *Pimelodella* e *Heptapterus*. O trabalho de Lundberg & McDade (1986) foi o primeiro a reconhecer a existência de um grupo monofilético não-nomeado dentro de Pimelodidae. Posteriormente, esse clado foi chamado de “grupo *Heptapterus*” por Stewart (1986), sendo nomeado como subfamília Rhamdiinae (Lundberg et al. 1991).

A família Heptapteridae, até então tratada como uma subfamília dentro de Pimelodidae foi elevada à condição de família e confirmada como uma unidade monofilética após o trabalho de de Pinna (1993). Previamente a este trabalho, o clado denominado Rhamdiinae era composto pelos seguintes gêneros: *Acentronichthys*, *Brachyglanis*, *Brachyrhamdia*, *Caecorhamdella*, *Caecorhamdia*, *Chasmocranus*, *Cetopsorhamdia*, *Gladioglanis*, *Goeldiella*, *Heptapterus*, *Horiomyzon*, *Imparales*, *Imparfinis*, *Leptorhamdia*, *Medemichthys*, *Myoglanis*, *Nannorhamdia*,

Nemuroglanis, *Pariolius*, *Pimelodella*, *Pimelodus heteropleura*, *Phenacorhamdia*, *Phreatobius*, *Rhamdiopsis*, *Rhamdella*, *Rhamdia*, *Typhlobagrus* (Lundberg et al. 1991).

Bockmann (1998) numa abordagem cladística, realiza um estudo filogenético baseado em caracteres morfológicos para a família Heptapteridae. Nesse trabalho o monofiletismo da família é corroborado e o gênero *Goeldiella* é recuperado como o gênero mais basal. Os gêneros sem a margem orbital livre foram inseridos em um grupo monofilético bem sustentado chamado de subfamília Heptapterinae, a qual, por sua vez é subdividida em dois grupos categorizados como tribos: a tribo Phreatobiini (que inclui os gêneros *Phreatobius*, *Gladioglanis* e os membros da família Heptapteridae com músculos *adductor mandibulae* hipertrofiados) e a tribo Heptapteriini (um grupo que equivale a "sub-clado *Nemuroglanis*", o qual inclui os gêneros *Heptapterus*, *Horiomyzon*, *Imparfinis* e *Phenacorhamdia* e os demais gêneros que compõe a família). O gênero *Gladioglanis* é indicado como grupo-irmão do gênero *Phreatobius* e *Cetopsorhamdia* gênero-irmão dos demais membros da subfamília Heptapterinae.

Com base na proposta de Bockmann (1998) composição genérica de Heptapteridae passou por modificações, mantiveram-se os gêneros: *Acentronichthys*, *Brachyglanis*, *Cetopsorhamdia*, *Chasmocranus*, *Gladioglanis*, *Goeldiella*, *Heptapterus*, *Horiomyzon*, *Imparfinis*, *Leptorhamdia*, *Mastiglanis*, *Myoglanis*, *Nannoglanis*, *Nemuroglanis*, *Pariolius*, *Phenacorhamdia*, *Phreatobius*, *Pimelodella*, *Rhamdella*, *Rhamdia*, *Rhamdioglanis*, *Rhamdiopsis* e *Taunayia*. Outros gêneros foram sinonimizados, a saber: *Pimelenotus* e *Caecorhamdia* como sinônimos de *Rhamdia*; *Brachyrhamdia*, *Caecorhamdella* e *Typhlobagrus* sinônimos de *Pimelodella*; *Nannorhamdia* de *Imparfinis*; *Imparales* e *Medemichthys* são introduzidos como novos sinônimos juniores de *Nemuroglanis*. Neste mesmo trabalho Bockmann propõe 11 novos gêneros (*Callimorhamdia*, *Dolichorhamdia*, *Maculirhamdia*, *Microrhamdia*, *Psedeptapterus*, *Pseudocetopsorhamdia*, *Pseudochamocranus*, *Pseudoleptorhamdia*, *Pseudoimparales*, *Pseudorhamdioglanis* e *Stewartglanis*) para melhor refletir os grupos na análise cladística realizada no estudo, dessa maneira a família passa a contar com 31 gêneros.

Bockmann e Guazzelli (2003) revisaram mais uma vez a família, utilizando caracteres morfológicos, sendo então listados 26 gêneros e 186 espécies conhecidas, sendo citada ainda a existência de cerca de 50 espécies já conhecidas, porém não descritas. O número de gêneros e espécies dentro de Heptapteridae ainda é muito inconsistente, muitos dos gêneros propostos por Bockmann (1998) e Bockmann e Guazzelli (2003) foram sinonimizados e incluídos em gêneros validados ou retirados, a exemplo de *Imparales* e *Medemichthys* incluídos em *Nemuroglanis*

(Bockmann e Ferraris, 2005), e *Phreatobius* gênero que era considerado conflitante dentro dos Siluriformes (Bockmann e Guazzelli, 2003).

O gênero *Phreatobius*, antes incluído em Heptapteridae (de Pinna, 1998; Bockmann, 1998; Bockmann e Guazzelli, 2003), não foi mais considerado como parte do clado (Ferraris, 2007), mas como grupo-irmão de Pimelodidae e Pseudopimelodidae, sendo confirmado através de análise molecular como uma unidade monofilética e tratado como família Phreatobiidae, nomenclatura inicialmente empregada na Tese de Doutorado de Muriel-Cunha (2008); posteriormente sustentado também com dados moleculares por Sullivan et al., (2013).

Em paralelo aos problemas que envolvem a taxonomia dos gêneros de Heptapteridae, estão aqueles referentes à taxonomia de suas espécies. A família Heptapteridae conta com 23 gêneros mais 1 *Incertae sedis* (Ferraris, 2007), 222 espécies validadas e 304 em avaliação (Eschmeyer, 2019). Ao longo das últimas duas décadas alguns estudos analisaram as relações filogenéticas da família e de alguns de seus gêneros (Bockmann, 1998; Guazzelli, 2003; Muriel-Cunha, 2008; Garcia, 2009; Peixoto, 2011; Masson, 2007) todos são teses e dissertação não publicadas.

Problemas nas relações filogenéticas e na sistemática da família Heptapteridae persistem, principalmente na taxonomia a nível de espécie o que ainda desperta interesse em taxonomistas e geneticistas com intuito de melhorar o conhecimento a respeito desse grupo (Hardman, 2005). Por outro lado, a relação do clado com outras famílias dentro de Siluriformes tem se tornado menos conflitante, tratada inicialmente como um clado não nomeado dentro de Pimelodidae por Lundberg (1988) é vista em estudos mais recentes como clado irmão de Pseudopimelodidae e Pimelodidae compondo a superfamília Pimelodoidea (Sullivan et al. 2006; Sullivan et al. 2013).

Apesar de muitos conflitos em relação a sistemática e a filogenia dos heptapterídeos, novas hipóteses a respeito da construção da história evolutiva do grupo tem se mostrado bastante consistentes e permitem compreender melhor as relações filogenéticas intergenéricas e interespecíficas. Em estudo publicado recentemente Silva et al., (2021) utilizando elementos ultraconservados (UCEs) obtidos através de sequenciamento de última geração, apresentaram uma filogenia com base molecular que permite compreender as relações dos grupos dentro da família Heptapteridae, além de como visto em trabalhos anteriores com dados morfológicos e moleculares, sustentar a monofilia do grupo e de alguns de seus gêneros como o clado composto por *Brachyglanis*, *Gladioglanis*, *Leptorhamdia* e *Myoglanis*. Este é o primeiro estudo molecular

que apresenta dados congruentes às informações do trabalho de Bockmann (1998) onde é possível recuperar algumas relações propostas pela filogenia baseada em dados morfológicos.

Silva et al., (2021) recuperam dois clados dentro de Heptapteridae denominados de subfamília Rhamdiinae, antigo subclado Brachyrhamdia (Ferraris, 1988) e Rhamdiinae II (de Pinna, 1993). Esta subfamília é composta por *Brachyrhamdia*, *Goeldiella*, *Pimelodella*, *Rhamdia* e *Rhamdella*, sendo este último não incluído nas análises moleculares e apenas assinalado como parte da subfamília de acordo Briñoccoli et al., (2018). A subfamília Heptapterinae, assim como vista nas análises morfológicas de Bockmann (1998) é dividida em duas tribos a saber: tribo Brachyglaniini, denominada anteriormente de tribo Phreatobiini. A nova tribo é composta pelos mesmos gêneros sugeridos por Bockmann (1998) exceto os gêneros *Phreatobius* já excluído de Heptapteridae e *Pseudoleptorhamdia* gênero não recuperado em estudo posteriores. A tribo Heptapterini é composta pelos demais gêneros da subfamília Heptapterinae.

2.3. Uso de marcadores mitocondriais e nucleares para o estabelecimento das relações filogenéticas em peixes, com ênfase em Siluriformes

Estudos baseado em dados moleculares em Siluriformes através do sequenciamento do DNA com uso de genes mitocondriais e nucleares trouxeram novas perspectivas e ideias a respeito das relações entre seus grupos, além de servir como um adicional aos clados baseados em dados morfológicos (Hardman, 2005; Sullivan et al., 2006; Sullivan et al., 2013).

O uso de marcadores moleculares permite uma melhor compreensão das relações genéticas e históricas do grupo em análise. Dentre os muitos marcadores moleculares utilizados, genes do DNA mitocondrial (mtDNA) e do DNA nuclear tem se mostrado promissores e permitem inferir as relações filogenéticas de maneira mais robusta morfológicos (Hardman, 2005; Sullivan et al., 2013).

Análises com mtDNA têm fornecido valiosas contribuições para a sistemática filogenética dos Siluriformes, bem como na resolução ou na identificação de conflitos taxonômicos (Hardman, 2005; Sullivan et al., 2006; Lundberg et al., 2011; Sullivan et al., 2013). As mitocôndrias são verdadeiras usinas de energia da célula, responsável pela fosforilação oxidativa que lhes permite produzir um suprimento constante de adenosina trifosfato (ATP). Essas organelas assim como os cloroplastos tiveram sua origem através de uma possível relação simbiótica com a célula hospedeira (Campbell et al., 2008).

O DNA mitocondrial (mtDNA) é uma molécula extra cromossômica encontrado em grande número de cópias por unidade celular. Este se constitui em uma dupla cadeia circular,

apresentando aproximadamente 16.569 pares de base e somente 10% de sua totalidade é não codificante. O mtDNA possui uma região codificante com 37 genes, os quais correspondem a 13 polipeptídios, 2 moléculas de rRNA e 22 tipos de tRNA; também apresenta uma região não codificante, denominada região controle ou *D-Loop*, possuindo cerca de 1122 pares de bases e dividida em regiões hipervariáveis I, II e III (HV I, II e III). A região *D-loop* não codifica produtos gênicos e apresenta abundantes polimorfismos entre indivíduos, sendo a região inicial do processo de duplicação do material genético está mais susceptível a ocorrência de mutações, além disso responsável pela regulação da replicação e transcrição de todo o mtDNA (Anderson et al., 1981, Andrews et al., 1999; Bluter, 2010).

O desenvolvimento desses marcadores, em especial dos baseados em sequências de genes de mtDNA ou até mesmo genomas mitocondriais completos trouxe uma nova visão a respeito dos relacionamentos para os peixes ósseos, além de fornecido conjunto vasto de informações filogenéticas em diversas escalas taxonômicas (Greenwood et al., 1966). O uso do mtDNA como marcador se mostra muito eficiente para análises intraespecíficas e interespecíficas, sabendo-se que este apresenta algumas características únicas como herança materna, organização compacta, eventualmente não sofre recombinação e seus RNAs transportadores codificam completamente seus RNAs mensageiros (Garesse et al., 1997).

Análises com mtDNA se mostram eficientes e fornecem contribuições valiosas em estudos da sistemática filogenética dos Siluriformes e também em resolução de conflitos taxonômicos (Perdices et al., 2002; Shimabukuro-Dias et al., 2004; Hardman, 2005; Hardman e Lundberg, 2006; Sullivan et al., 2006; Koblmüller et al., 2006; An et al., 2012 Lujan et al. 2015). Além disso podem ser aplicados diversos outros estudos como identificação de espécies, a inferência de relações filogenéticas, estudos de biogeografia histórica, caracterização de estrutura populacional e variabilidade genética (Vergara et al., 2008; Bignotto et al., 2009; Prado et al., 2012; Ferreira et al., 2014; Samani et al., 2016; Carvalho e Beheregaray, 2018).

Marcadores baseados em genes nucleares são utilizados em estudos filogenéticos reside no fato de esses genes proporcionarem uma estimativa independente da história evolutiva da espécie em estudo (Pereira *et al.*, 2002). A maior parte dos genes nucleares são de cópia única e evoluem lentamente, são potenciais fontes em estudos de resolução de filogenias, diversos marcadores moleculares são utilizados estudos que testam as relações genéticas de diferentes grupos de peixes, como os Siluriformes (Hardman e Lundberg, 2006; Alonso et al., 2011; Cramer et al., 2011; Tavera et al., 2012; Morando et al., 2013; Lu et al., 2014; Katz et al., 2018).

Estudos combinando a análise de sequências mitocondriais e nucleares em Siluriformes são bastante utilizados na determinação das relações filogenéticas (Sullivan et al., 2013; M. Arce H. et al., 2013; Calegari et al., 2019); aplicados em estudos que testam as relações genéticas em populações naturais (Marková et al., 2010; Habib et al., 2010; Prado et al., 2012) e em populações cultivadas de peixes (Hashimoto et al., 2016).

Para os Siluriformes, os dados morfológicos e moleculares suportam claramente a sua monofilia e apesar da diversidade de bagres, as relações entre suas famílias e gêneros ainda permanecem controversas e não estão totalmente resolvidas (Diogo, 2003; Hardman, 2005; Sullivan et al., 2006; Sullivan et al., 2013; Kappas et al., 2016). Em seu trabalho sobre o grupo Diogo & Peng (2009) apresentaram uma revisão abrangente das relações Siluriformes; excluindo análises cladísticas baseadas em caracteres morfológicos, o que se sabe atualmente a respeito da filogenia desse clado é sustentado por dois estudos com grupo de peixes, a saber: o estudo de Hardman (2005), que analisou sequências de citocromo b de 170 espécies de bagres em 29 de 33 famílias; e Sullivan et al. (2006) que utilizara sequências dos genes nucleares rag1 e rag2 em 110 espécies de bagres representando 36 de 37 famílias. O trabalho realizado por Betancur-R et al. (2013) 21 marcadores moleculares foram utilizados para produzir uma filogenia molecular abrangente das principais linhagens de peixes ósseos, o que incluiu 32 famílias dos Siluriformes. Além destes, o estudo realizado por Sullivan et al. (2013) com bases em dados moleculares sustentam a monofilia da família Heptapteridae, Pimelodidae, Pseudopimelodidae.

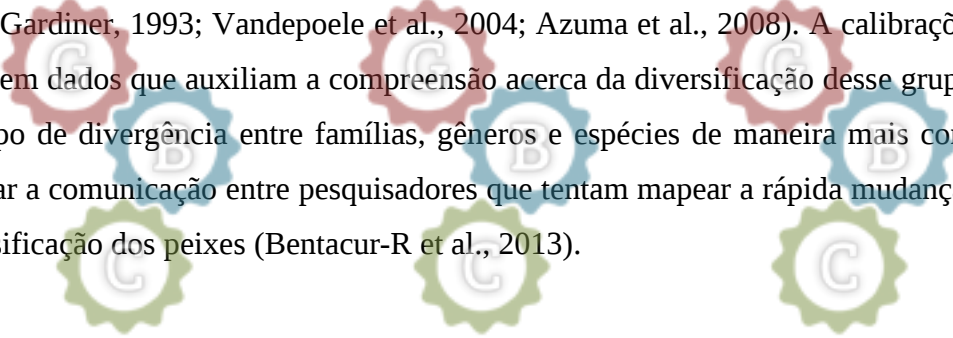
A diversificação dos Siluriformes ainda não está bem resolvida e muitos cenários biogeográficos descrevem a sequência de eventos que moldaram a distribuição moderna das diferentes famílias, uma consequência disso é a linha do tempo e o modo da radiação dos Siluriformes ainda são incertos (Hardman, 2005; Lundberg et al., 2007; Diogo, 2004; Nakatani et al., 2011; Chen et al., 2013). Na hipótese tradicional, a origem dos Siluriformes seria o Gondwana e sua distribuição seria o resultado da dispersão através de conexões disponíveis e passagens continentais para a Laurasia durante o Paleoceno e o Eoceno (Diogo, 2004).

Uma outra hipótese diz que a origem e dispersão marinha foi responsável pela distribuição mundial das espécies de bagres, outras hipóteses apontam um complexo arranjo biogeográfico envolvendo dispersões pré e pós-deriva, eventos vicariantes e possíveis migrações marinhas. Mais importante ainda, ele identifica a América do Sul como o berço de todo o clado e estende sua origem ao Cretáceo Inferior (Diogo, 2004).



Atualmente, os fósseis são importantes objetos de estudo, não apenas por permitirem estimar tempos de divergência através da calibração do relógio molecular (Matsuura e Nishida, 2006; Bentacur-R et al., 2013), como o modelo relaxado utilizado em estudos recentes em Siluriformes (Kappas et al., 2016; Bentacur-R et al., 2013 e Sullivan et al., 2013). Além disso, está cada vez mais claro que a integração de dados paleontológicos e de espécies ainda existentes melhora a compreensão a respeito da “árvore da vida” dos peixes e sua história macroevolutiva (Gauthier et al., 1988; Arratia, 2000; Albert et al., 2009; Dornburg et al., 2015).

Métodos filogenéticos moleculares como por exemplo, BEAST (Drummond e Rambaut, 2007) combinados a evidências fósseis trouxeram uma nova perspectiva temporal para melhor entender a diversificação de peixes ósseos. Muitas tentativas para estimar o tempo de divergência entre as linhagens acabaram por produzir conflitos com os estudos paleontológicos, implicando muitas vezes em imensas lacunas no registro fóssil (Gardiner, 1984; Gardiner, 1993; Vandepoele et al., 2004; Azuma et al., 2008). A calibrações adequadas fornecem dados que auxiliam a compreensão acerca da diversificação desse grupo de peixes e o tempo de divergência entre famílias, gêneros e espécies de maneira mais concisa visando facilitar a comunicação entre pesquisadores que tentam mapear a rápida mudança da filogenia e classificação dos peixes (Bentacur-R et al., 2013).





3. Objetivos

3.1. Geral

Através do sequenciamento de genes mitocondriais e nucleares obter uma filogenia molecular para Heptapteridae testando sua monofilia e a hipótese de relacionamento intergenérico proposta por Bockmann (1998).

3.2. Específicos

- Associar a filogenia molecular obtida com a filogenia morfológica disponível, numa tentativa de melhor resolver as relações evolutivas entre os heptapterídeos;
- Indicar a necessidade de revisão na sistemática nomenclatural de possíveis gêneros e espécies conflituosos.

4. Material e Métodos

4.1. Obtenção e acondicionamento das amostras

São descritos para a família Heptapteridae, até o presente estudo, 24 gêneros, sendo um deste um *incertae sedis* (Ferraris, 2007; Eschmeyer, 2019), dos gêneros validados utilizamos 17 em nosso estudo (tabela 1). As amostras foram obtidas através de parceria com o prof. Dr. Claudio Oliveira/UNESP e doação de tecidos por Instituições de Pesquisa nacionais e internacionais, além de sequencias depositadas em bancos de dados. Os tecidos obtidos foram acondicionados em freezers no Laboratório de Citogenética (UESB) sob a tutela da prof^a. dr^a Caroline Garcia.

Sempre que possível utilizamos mais do que uma espécie por gênero e dois ou três exemplares de cada espécie para as análises. Como grupos externos, utilizamos representantes das famílias Pimelodidae, Pseudopimelodidae, Bagridae, Siluridae e da espécie *Conorhynchos conirostris*, uma espécie “*incertae sedis*” em Siluriformes (Ferraris, 2003).

4.2. Extração do material genético

A extração do DNA foi realizada seguindo o protocolo proposto por Aljanabi e Martinez (1997); retiramos uma amostra de tecido e colocando em microtubos (*ependorf*) estéreis, deixando secar em estufa a 37°C até a evaporação do álcool (5 a 10 min); com auxílio de uma tesoura ou pinça a amostra foi homogeneizada em 400µL de tampão salino (6,66ml de NaCl 6M; 1 ml de Tris-HCl 1M, pH 8,0; 0,4ml de EDTA 0,5M, pH 8,0; completar para 100 ml com água destilada.). Seguindo o procedimento, adicionamos 40µL de SDS 20% (concentração final 2%) e 8µL de proteinase K (10mg/mL) misturando bem; logo após deve-se incubar por cerca de 1 hora a 65°C ou overnight.

Após o período de incubação esperamos a amostra atingir a temperatura ambiente e adicionamos 10µL de RNase (10mg/mL) e deixando cerca de 1 hora a 37°C; logo após, adicionamos 300µL de NaCl 6M e agitamos com auxílio de um vórtex em alta velocidade por cerca de 1 minuto. As amostras foram centrifugadas a 10.000G por 30min e o sobrenadante foi transferido para microtubos estéreis.

Em cada uma das amostras foram adicionados 600µL de isopropanol gelado e misturando bem, vertendo o tubo delicadamente; logo após foram incubadas a -20°C por 1 hora ou overnight; as amostras, foram então centrifugadas 20 minutos a 10.000G (4°C). O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado em 600µL de etanol 70%, centrifugando por 10 minutos a 10.000G (4°C); o pellet foi acondicionado em estufa até evaporação do álcool,

podendo também deixar em temperatura ambiente overnight; Ao fim desse processo foi adicionado em cada amostra 50µL de TE (5 ml de Tris-HCl 1M, pH 8,0; 1 ml de EDTA 0,5M, pH 8,0; Completar para 50 ml com água destilada.) ou água estéril.; as amostras devem ficar por 24h a 4°C e logo após serem armazenadas em freezer (-20°C).

4.3. Amplificação e purificação das amostras

No presente estudo amplificamos genes mitocondriais e um par de gene nuclear, sendo estes: ATPase 6 e 8 ATP8.2-L8331 + CO3.2-H9236 (Sivasundar *et al.*, 2001); Citocromo b: GluDG.L + H16460 (Perdices *et al.*, 2002), 16S: 16AR + 16BR (Palumbi, 1996), gene ativador de recombinação *rag 2*: (Hardman e Page, 2003) e gene ativador de recombinação *rag 1* (Sullivan *et al.*, 2006).

Cada reação de PCR apresentou um volume final de 12,5 µl (0,50µl de DNA molde [10ng/µl], 1µl de cada primer [10pM], 0,75 µl de MgCl₂ [25mM], 1,25µl de tampão [10x], 1,25µl de dNTP [10µM], 0,125µl [5U] de Taq polimerase - Fermentas, 7,7µl de água destilada). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Applied BioSystems Veriti, com as seguintes condições: 94°C (4 min), cinco ciclos de: 92°C (30 seg), 50-53°C (30 seg), 72°C (90 seg), 40 ciclos de: 92°C (30 seg), 56-58°C (30 seg), 72°C (90 seg), seguidos por uma elongação final a 72°C (10min) e um período de resfriamento a 4°C.

Os produtos das PCR foram aplicados em gel de agarose 0,8% e corados com uma solução de azul de bromofenol e *GelRed Nucleic Acid* (Biotium) e foram visualizados em *L-PIX Transilluminator Molecular Imaging* (Loccus Biotecnologia), para confirmação da amplificação e da qualidade dos produtos de PCR. Para a purificação das amostras utilizamos um “mix” com as enzimas exonuclease I (ExoI - Fermentas) e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP – Fermentas) na proporção de: 0,5µl de ExoI; 2µl SAP, para cada 5µl amostra amplificada, sendo então expostas por 50 minutos a 37°C e 15 minutos a 80°C, e posteriormente armazenado em freezer.

4.4. Sequenciamento das amostras utilizadas

A reação de sequenciamento foi feita de acordo com o método de dideoxinucleotídeos terminais (Sanger *et al.*, 1977) utilizando o kit *BigDye Sequence Terminator* v.3.1 (*Applied Biosystems*). As seguintes condições utilizadas foram: 1µl de produto de PCR (produto purificado); 2µL 1X *Sequencing Buffer*; 0,5µL de cada primer (mesma concentração utilizada para a realização da PCR original); 1µL *BigDye® Terminator* v3.1. As condições de

amplificação foram as seguintes: 25 ciclos a 96°C por 30 segundos; 15 segundos a 50°C; 4 minutos a 60°C.

Após terminada a reação, os produtos foram precipitados seguindo o seguinte protocolo: em cada amostra adicionamos os 80µL do mix (3µL de acetato de sódio 3M; 62,5µL de etanol 95%; 14,5µL de água bidestilada); as amostras foram então homogeneizadas cuidadosamente com auxílio de uma micropipeta e alocados os tubos no escuro por 15 minutos; após esse período centrifugamos as amostras por 20 minutos a 13000 rpm em temperatura ambiente; cuidadosamente o sobrenadante foi retirado com auxílio de micropipeta e adicionamos 200 µL de etanol 70% gelado e as amostras centrifugadas por 5 minutos a 13000 rpm em temperatura ambiente; mais uma vez cuidadosamente o sobrenadante foi retirado com auxílio de micropipeta e os tubos foram dispostos durante 3 minutos a 95°C (com a tampa aberta) para evaporação do álcool.

As amostras foram mantidas a -20°C até o momento da aplicação das amostras no sequenciador. As amostras foram entregues a técnica especializada responsável pelo manuseio do sequenciador (modelo ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer da Applied Biosystems/fabricado pela HITACHI) no Instituto de Química-USP.

4.5. Edição das sequências

As sequências obtidas foram, então, visualizadas, editadas e alinhadas com auxílio da versão “trial” do programa *Geneious* 4.0 (Drummond et al. 2008 - disponível para “download” no site <http://www.geneious.com/>) para obtenção da sequência consenso. As sequências foram traduzidas pelo programa *MEGA* v6 (Tamura et al., 2007) para a verificação da presença de códons de parada e do padrão de variação da posição dos códons; em seguida verificadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através do programa “BLASTn”, com o objetivo de confirmar sua similaridade com sequências de outros peixes. Os arquivos de entrada gerados no *MEGA* v6 foram utilizados para as análises de máxima verossimilhança e inferência bayesiana.

Sequências de gêneros da família Heptapteridae foram obtidas através do GenBank e foram alinhadas juntamente com as sequências obtidas no presente estudo. Foram acrescentadas também sequências de gêneros que foram considerados como grupos externos (pertencentes às famílias Pimelodidae, Pseudopimelodidae, Phreatobiidae, Siluridae e Bagridae), além de sequências do gênero *Phreatobius*, que já fora considerado parte de Heptapteridae (Bockmann, 1998; Bockmann & Guazzelli, 2003).



4.6 Análise das sequências

Foram realizadas inferências por análise Bayesiana (BI) e de Máxima Verossimilhança (ML) para verificar os agrupamentos entre sequências e o grau de confiabilidade utilizando os programas MrBayes on XSEDE e o RAxML-HPX BlackBox, respectivamente, disponíveis no CIPRES (<https://www.phylo.org/>). O modelo para os critérios de análise da BI foram determinados e obtidos pelo programa Kakusan3 (Tanabe, 2007), o arquivo de entrada para a ML foi obtido através do programa MEGA v. 6 (Tamura et al., 2011). Todas as filogenias obtidas serão testadas utilizando métodos estatísticos, como *bootstrap* (Felsenstein, 1985).



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação

Tabela 1: Gêneros e espécies analisados no presente estudo.

Família	Subfamília/Tribo	Gênero/Espécie	Código	Catálogo	ATPase 6 e 8	Citocromo b	16S	RAG1	RAG2
Heptapteridae	Heptapterinae								
	Heptapterini	<i>Acentronichthys leptos</i>	Ale3446	Este estudo					
		<i>Acentronichthys leptos</i>	JX899756	GenBank					
		<i>Cetopsorhamdia iheringi</i>	Cih3597	Este estudo					
		<i>Cetopsorhamdia iheringi</i>	Cih4112	Este estudo					
		<i>Cetopsorhamdia indiosa</i>	JX899758	GenBank					
		<i>Cetopsorhamdia</i> sp.	DQ990502	GenBank					
		<i>Cetopsorhamdia</i> sp.4	Csp7947	Este estudo					
		<i>Cetopsorhamdia</i> sp.5	Csp7972	Este estudo					
		<i>Cetopsorhamdia</i> sp.6	Csp4473	Este estudo					
		<i>Chasmocranus brevior</i>	JX899759	GenBank					
		<i>Chasmocranus truncatorostris</i>	Ctr3364	Este estudo					
		<i>Chasmocranus truncatorostris</i>	Ctr734	Este estudo					
		<i>Heptapterus sympterigium</i>	JX899756	GenBank					
		<i>Heptapterus</i> sp.2	Hsp2914	Este estudo					
		<i>Heptapterus</i> sp.3	Hsp3290	Este estudo					
		<i>Heptapterus</i> sp.4	Hsp4313	Este estudo					
		<i>Imparfinis</i> cf. <i>cochabambae</i>	DQ492369	GenBank					
		<i>Imparfinis</i> cf. <i>cochabambae</i>	DQ492481	GenBank					
		<i>Imparfinis minutus</i>	Imi3015	Este estudo					
		<i>Imparfinis mirini</i>	Imr3670	Este estudo					
		<i>Imparfinis schubarti</i>	Isc5222	Este estudo					
		<i>Imparfinis stictonotus</i>	DQ492370	GenBank					
		<i>Imparfinis stictonotus</i>	DQ492482	GenBank					
		<i>Imparfinis stictonotus</i>	DQ492483	GenBank					
		<i>Imparfinis</i> sp.1	Isp1445	Este estudo					
		<i>Imparfinis</i> sp.2	Isp1563	Este estudo					
		<i>Imparfinis</i> sp.4	Isp3473	Este estudo					
		<i>Imparfinis</i> sp.5	Isp5718	Este estudo					
		<i>Mastiglanis asopos</i>	Mas3168	Este estudo					
		<i>Mastiglanis asopos</i>	Mas5715	Este estudo					



Msp6951	Este estudo
Psp5550	Este estudo
Psp5717	Este estudo
Psp2361	Este estudo
Rsp1657	Este estudo
Rfr8176	Este estudo
Rmi6212	Este estudo
Rsp4113	Este estudo
Tma826	Este estudo
Tsp703	Este estudo

[illegible]

Gladioglanis machadoi

JX899765 GenBank

Genética, Biodiversidade e Conservação

Gsp7031	Este estudo
JX899760	GenBank
Msp8165	Este estudo
Bsp6866	Este estudo
Geq5515	Este estudo
DQ492368	GenBank
DQ492480	GenBank
JF898644	GenBank
Pbo3508	Este estudo
DQ492366	GenBank
DQ492478	GenBank
Pgr3904	Este estudo
Pkr4276	Este estudo
Pla3861	Este estudo
Pme3590	Este estudo
Pmu3963	Este estudo
Pse3795	Este estudo
DQ486779	GenBank
Ptr4598	Este estudo
Ren3811	Este estudo
Rit86796	Este estudo
Rla32751	Este estudo
Rqu3104	Este estudo
Rqu97373	Este estudo

[illegible]

		Grupo Externo			
		<i>Conorhynchus conirostris</i>	Cco119	Este estudo	
		<i>Conorhynchus conirostris</i>	DQ492477	GenBank	
		<i>Lophiosilurus alexandri</i>	Lal15528	Este estudo	
		<i>Microglanis cottoides</i>	Mco3375	Este estudo	
		<i>Microglanis iheringi</i>	JX470049	GenBank	
		<i>Pseudopimelodus zungaru</i>	Pzu15578	Este estudo	
		<i>Pimelodus maculatus</i>	Pma3375	Este estudo	
		<i>Phractocephalus hemeliopterus</i>	Phe4095	Este estudo	
		<i>Pseudobagrus tokiensis</i>	FJ650410	GenBank	
		<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	Pco4094	Este estudo	
		<i>Olyra longicauda</i>	DQ492459	GenBank	
		<i>Pseudobagrus tokiensis</i>	Ptogen	Este estudo	
		<i>Phreatobius dracunculus</i>	DQ492363	GenBank	
		<i>Silurus glanis</i>	Sglgen	Este estudo	
Pseudopimelodidae					
Pseudopimelodidae					
Pseudopimelodidae					
Pseudopimelodidae					
Pimelodidae					
Pimelodidae					
Pimelodidae					
Pimelodidae					
Bagridae					
Bagridae					
Phreatobiidae					
Siluridae					

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

5. Resultados

O conjunto de dados final incluiu 79 terminais, destes 65 são gêneros da família Heptapteridae e 14 *outgroups* com representantes de Pimelodidae, Pseudopimelodidae, Bagridae, Siluridae, Phreatobiidae e *Conorhynchus conirostris*; até o presente estudo 23 gêneros são considerados válidos para a família Heptapteridae, a saber: *Acentronichthys*, *Brachyglanis*, *Brachyrhamdia*, *Cetopsorhamdia*, *Chasmocranus*, *Gladioglanis*, *Goeldiella*, *Heptapterus*, *Horiomyzon*, *Imparfinis*, *Leptorhamdia*, *Mastiglanis*, *Myoglanis*, *Nannoglanis*, *Nemuroglanis*, *Pariolius*, *Phenacorhamdia*, *Pimelodella*, *Rhamdella*, *Rhamdia*, *Rhamdioglanis*, *Rhamdiopsis* e *Taunayia* (Ferraris, 2007; Eschmeyer, 2019). Segundo Ferraris (2007), são 23 três gêneros mais um “*insertis sedis*” indicados para a família. Destes, contamos com 17 gêneros válidos com resultados para os marcadores mitocondriais e 15 para os marcadores nucleares representando 69% dos gêneros da família Heptapteridae.

As informações a respeito da composição nucleotídica bem como o número de sítios conservados para cada um dos cinco genes estudados (três mitocondriais e dois nucleares) estão dispostas na tabela 2. Estão descritos os valores para cada um dos genes em separado e também para as regiões concatenadas.

Tabela 2: Caracterização das regiões mitocondriais e nucleares das amostras analisadas no presente estudo.

	Regiões Mitocondriais e Nucleares					Regiões Concatenadas	
	ATPase 6 e 8	Citocromo b	16S	RAG1	RAG2	M	N
Nº total de sítios	792	754	501	1422	946	2047	2368
Nº de sítios conservados	332	369	319	945	593	1024	1573
Composição Nucleotídica							
% A	31,0	27,5	32,2	27,5	26,2	30,0	26,9
% T	27,7	29,1	22,9	24,6	24,8	27,0	24,7
% C	29,0	28,8	22,9	22,0	25,0	27,5	23,3
% G	12,3	14,5	22,1	25,9	24,1	15,5	25,1
Total	791,9	751,9	487,0	739,4	563,3	1928,8	1306,1

5.1. Análises dos genes mitocondriais

O conjunto de dados para os genes mitocondriais incluiu 56 terminais (dos 79 utilizados), destes 47 são gêneros representantes de Heptapteridae e nove *outgroups*.

As topologias da ML e BI recuperam dois grandes clados (figuras 1 e 2), sustentada com valores altos de suporte (ML) e probabilidade *a posteriori* (BI). O primeiro denominado subfamília Rhamdiinae composta pelos gêneros *Brachyrhamdia*, *Goeldiella*, *Pimelodella* e *Rhamdia*. O gênero *Rhamdella* não se inseriu na subfamília sendo alocado no clado maior de Heptapteridae.

A subfamília Heptapterinae, cuja monofilia é recuperada compõe o maior grupo dentro de Heptapteridae e se subdivide em dois clados: tribo Brachyglaniini, representada pelos gêneros *Myoglanis* e *Gladioglanis*; e tribo Heptapterini, representada pelos seguintes gêneros *Acentronichthys*, *Cetopsorhamdia*, *Chasmocranus*, *Heptapterus*, *Imparfinis*, *Mastiglanis*, *Pseudepterus*, *Rhamdella*, *Rhamdioglanis*, *Rhamdiopsis* e *Taunayia*. O gênero *Mastiglanis* é recuperado como grupo-irmão dos demais que compõe a tribo. *Goeldiella* é recuperado como mais basal a esta subfamília.

Dentro da tribo Heptapterini foram recuperados alguns subclados com alto suporte; (1) composto pelos gêneros *Cetopsorhamdia*, *Phenacorhamdia* e *Rhamdella*; (2) composto por *Imparfinis* e (3) composto por *Acentronichthys*, *Chasmocranus*, *Heptapterus*, *Pseudepterus*, *Rhamdioglanis*, *Rhamdiopsis*, *Taunayia*.

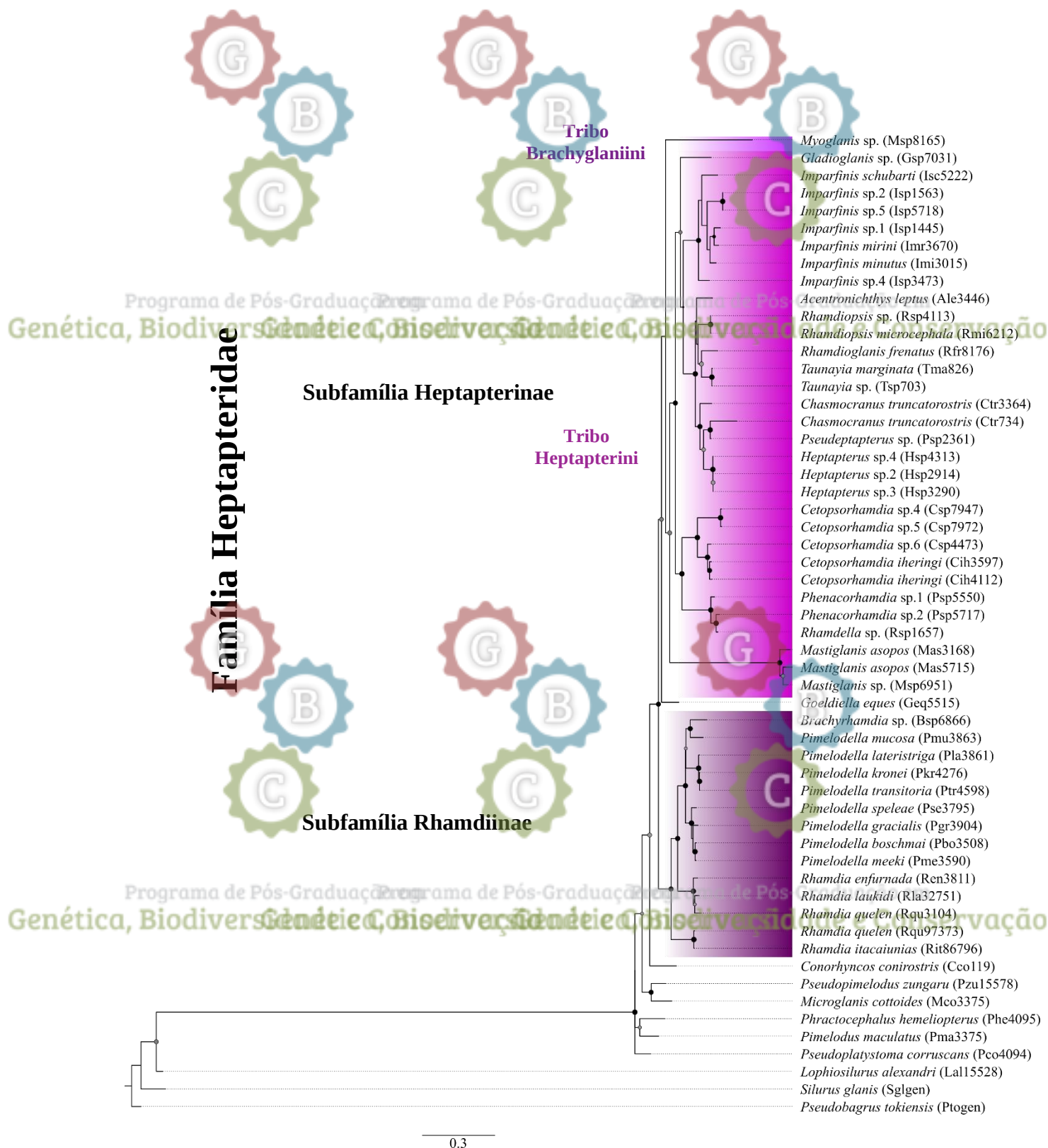


Figura 1: Árvore filogenética para a Família Heptapteridae obtida através da Máxima Verossimilhança acessada através de marcadores mitocondriais (ATPase 6 e 8, Citocromo b e 16S) concatenados. O valor máximo de suporte dos ramos está representado pelos círculos pretos (●); valores de *bootstrap* entre de 70 - 90 % estão representados pelos círculos cinzas (◐).

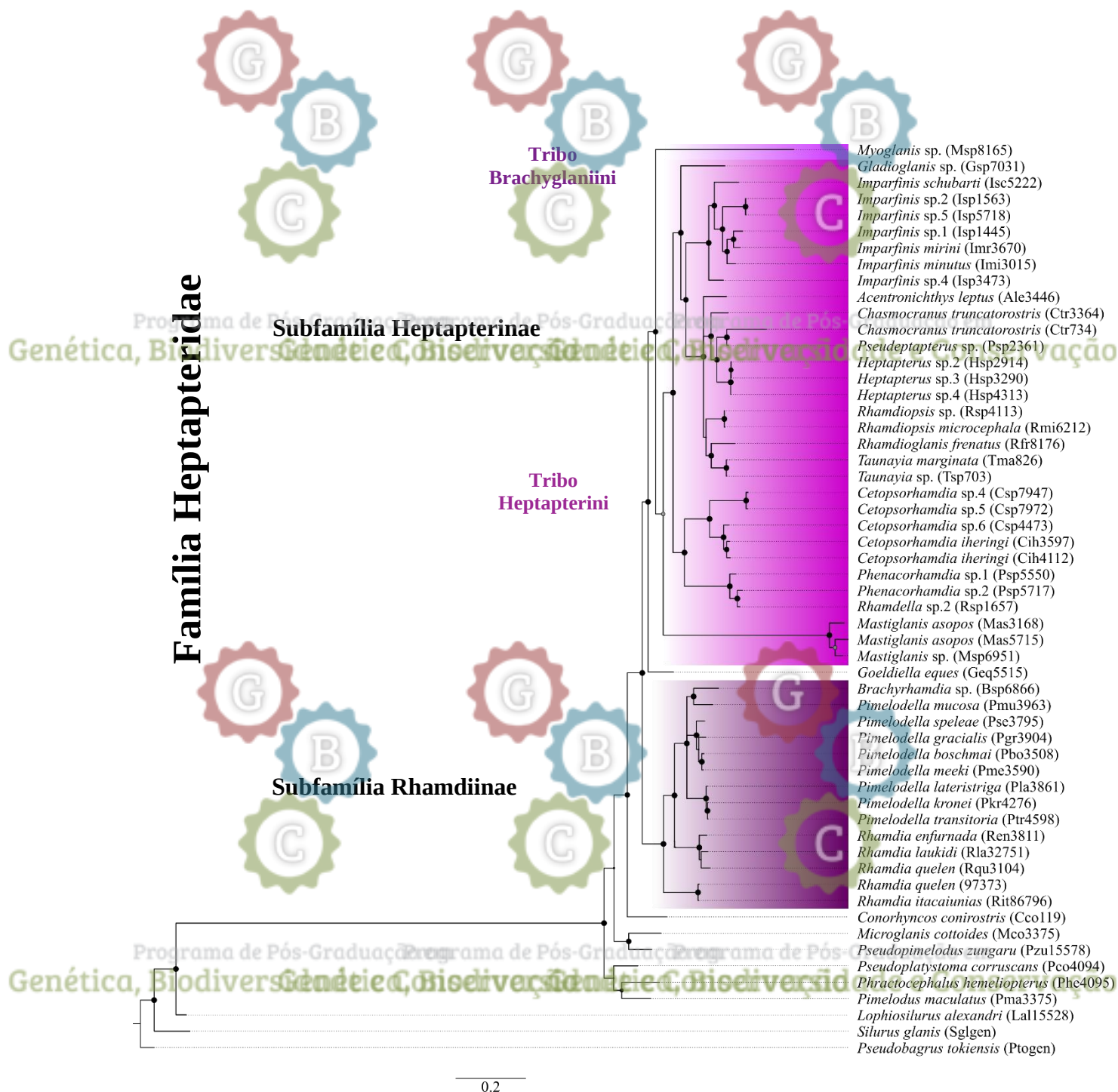


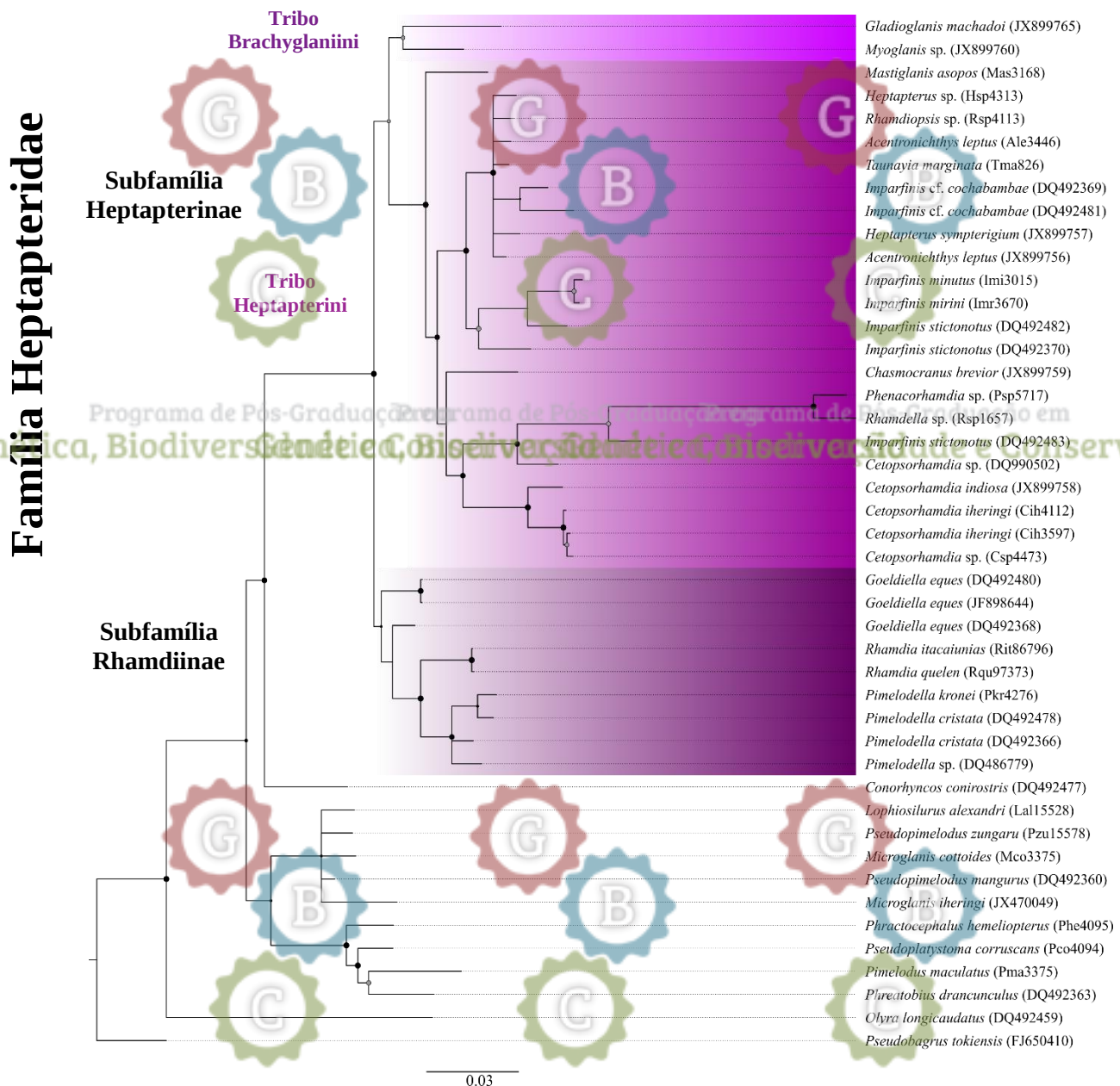
Figura 2: Árvore filogenética para a Família Heptapteridae obtida através da Inferência Bayesiana acessada através de marcadores mitocondriais (ATPase 6 e 8, Citocromo b e 16S) concatenados. A probabilidade *a posteriori* está representada pelos círculos pretos (●); e de probabilidade *a posteriori* entre de 0,7 e 0,8 estão representados pelos círculos cinzas (◐).

5.2. Análises dos genes nucleares

O conjunto de dados para os genes nucleares incluiu 45 terminais (dos 79 utilizados), destes, 33 são gêneros representantes de Heptapteridae e 12 *outgroups*. Os marcadores nucleares recuperam a monofilia da Família Heptapteridae com altos valores de suporte (ML) e probabilidade *a posteriori* (BI) composta por dois clados denominados de subfamília Heptapterinae e subfamília Rhamdiinae (figuras 3 e 4).

A subfamília Rhamdiinae é composta pelos gêneros *Goeldiella*, *Pimelodella* e *Rhamdia*. A subfamília Heptapterinae se subdivide em dois clados, as tribos Brachyglaniini (*Gladioglanis* e *Myoglanis*) e Heptapterini (*Acentronichthys*, *Cetopsorhamdia*, *Chasmocranus*, *Heptapterus*, *Imparfinis*, *Mastiglanis*, *Rhamdella*, *Rhamdiopsis*, *Phenacorhamdia* e *Taunayia*).

O gênero *Mastiglanis* é recuperado como gênero mais basal à tribo Heptapterini. Os gêneros *Imparfinis* e *Cetopsorhamdia* não são recuperados como monofiléticos. A posição de *Rhamdella* dentro da tribo Heptapterini é sustentada com os marcadores nucleares. O clado composto por *Cetopsorhamdia*, *Rhamdella* e *Phenacorhamdia* é grupo irmão dos demais gêneros da tribo Heptapterini. O clado composto por *Acentronichthys*, *Chasmocranus*, *Heptapterus*, *Rhamdiopsis* e *Taunayia* apresentam baixos valores de suporte.



Família Heptapteridae

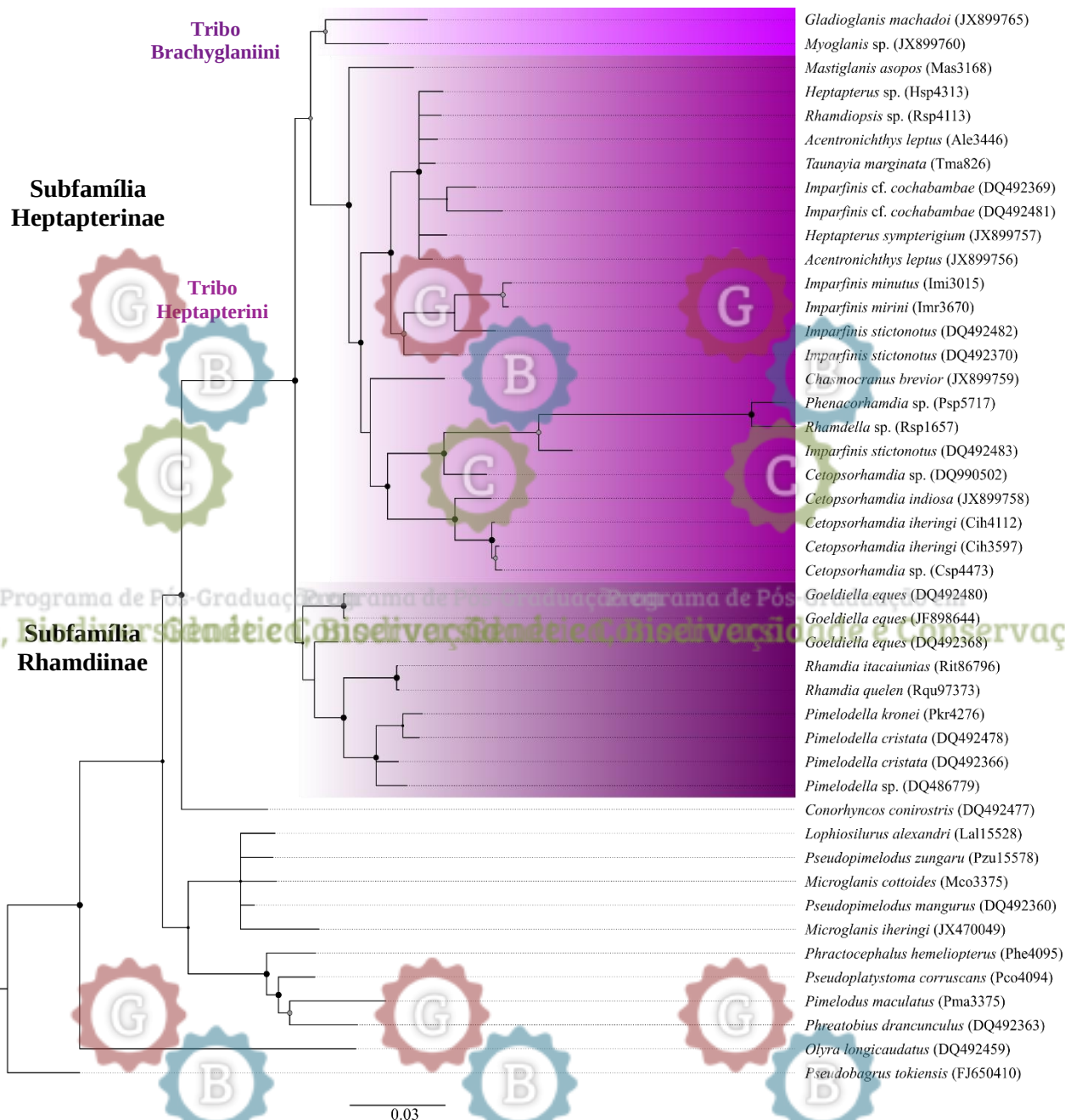


Figura 4: Árvore filogenética para a Família Heptapteridae obtida através da Inferência Bayesiana acessada através de marcadores nucleares (RAG1 e RAG2) concatenados. A probabilidade a posteriori está representada pelos círculos pretos (●); e de probabilidade a posteriori entre de 0,7 e 0,8 estão representados pelos círculos cinzas (●).

5. Discussão

Ao longo das últimas três décadas as informações acerca da Família Heptapteridae foram debatidas para se chegar a um entendimento das relações entre os gêneros que a compõe e sua relação com os demais siluriformes. Inicialmente considerada como subfamília dentro de Pimelodidae, tratada como “terminal B” e sendo aparentada ao clado “terminal C” (=Pseudopimelodidae) da família (Lundberg et al. 1988). Somente em 1993, após extensa análise cladística feita por Pinna que o então denominado clado Rhamdiinae de Pimelodidae foi elevado à família. Em seu trabalho Bockmann (1998) seguiu a nomenclatura apontada por Silfvegrip (1996) para o clado que dali por diante passou a ser denominado Família Heptapteridae.

Por muito tempo o gênero *Phreatobius* foi considerado como parte da família Heptapteridae com base em dados morfológicos (Bockmann & Guazzelli, 2003). Muriel-Cunha (2008) assinala com dados moleculares que o gênero não é recuperado como membro da família. Em suas análises moleculares a respeito da Superfamília Pimelodoidea Sullivan et al. (2013) sustentam a posição de *Phreatobius* como clado à parte de Heptapteridae o incluído em sua própria família Phreatobiidae. Nossos dados corroboram a posição de *Phreatobius* como membro externo à família Heptapteridae.

A monofilia proposta para a Família Heptapteridae foi recuperada em todas as reconstruções filogenéticas, corroborando tanto os dados moleculares obtidos para a família em trabalhos anteriores (Hardman, 2005; Sullivan et al., 2006; Sullivan et al., 2013; Fuster et al. 2021), quanto a proposta morfológica de Bockmann (1998). Em recente estudo Silva et al. (2021) também recuperam essa estrutura, propondo dois clados: as subfamílias Rhamdiinae e Heptapterinae, essa subdividida nas tribos Brachyglaniini apresentada pela primeira vez e tribo Heptapterini.

A subfamília Heptapterinae é recuperada com os clados que a compunha, denominado por Bockmann (1998) como: tribo Phreatobiini (*Brachyglanis*, *Gladioglanis*, *Leptorhamdia*, *Myoglanis*, *Phreatobius* e *Pseudoleptorhamdia*) e tribo Heptapterini: (*Acentronichthys*, *Callimorhamdia*, gen. n., *Cetopsorhamdia*, *Chasmocranus*, *Dolichorhamdia*, gen. n., *Heptapterus*, *Horiomyzon*, *Imparfinis*, *Maculirhamdia*, gen. n., *Mastiglanis*, *Microrhamdia*, gen. n., *Nannoglanis*, *Nemuroglanis*, *Pariolius*, *Phenacorhamdia*, *Pseudeptapterus*, gen. n., *Pseudocetopsorhamdia*, gen. n., *Pseudochasmocranus*, gen. n., *Pseudoimparales*, gen. n., *Pseudorhamdioglanis*, gen. n., *Rhamdioglanis*, *Rhamdiopsis*, *Stewartglanis*, gen. n. e

Taunayia). Com *Phreatobius* alocado dentro de sua própria família a revisão molecular proposta por Silva et al. (2021) inclui em Brachyglaniini os gêneros: *Brachyglanis*, *Gladioglanis*, *Leptorhamdia* e *Myoglanis* como recuperado no presente estudo, embora representada apenas pelos gêneros: *Myoglanis* e *Gladioglanis*. A monofilia dessa tribo foi recuperada somente com os genes nucleares devido a uma alocação do gênero *Gladioglanis* para tribo Heptapterini com base nos dados mitocondriais. Essa divergência entre os marcadores pode ser explicada com base na história evolutiva dos genes em questão, sendo que o genoma mitocondrial apresenta taxas de mutação mais altas do que as do genoma nuclear (Brown et al., 1979).

A tribo Heptapterini é representada pelos gêneros: *Acentronichthys*, *Cetopsorhamdia*, *Chasmocranus*, *Heptapterus*, *Imparfinis*, *Mastiglanis*, *Pseudeptapterus*, *Rhamdella*, *Rhamdioglanis*, *Rhamdiopsis* e *Taunayia* de acordo com a proposta morfológica (Bockmann, 1998) e dados moleculares recentes (Silva et al. 2021).

O gênero *Cetopsorhamdia* é sugerido por Bockmann (1998) como mais basal à tribo Heptapterini, contudo nossos dados assim como Silva et al. (2021) recuperam *Mastiglanis* como sendo basal à tribo, também recuperando como gênero monofilético. No entanto, *Cetopsorhamdia* compõe um clado com *Phenacorhamdia* e *Rhamdella*, grupo irmão aos demais gêneros da tribo. Dentro deste, o gênero *Rhamdella* anteriormente com posição imprecisa em Rhamdiinae no presente estudo foi inserido a tribo Heptapterini com os gêneros acima citados.

O agrupamento que inclui o gênero *Imparfinis* apresenta conflito entre os marcadores mitocondriais e nucleares, sendo que no último o gênero não é recuperado como monofilético, corroborando os resultados de Silva et al. (2021). Essa incongruência entre os mitocondriais e nucleares de certa é esperada visto que Bockmann (1998) já descrevia o gênero como um dos mais confusos dentro da família, assim como Silva et al. (2021) exploram essa parafilia destacando especificamente “*Imparfinis*” *stictonotus* e “*Imparfinis*” *borodini*. Adicionalmente nossos dados nucleares recuperaram a relação entre gênero *Cetopsorhamdia* e um terminal de *Imparfinis* *stictonotus*. Essa relação já havia sido previamente descrita por Ferreira et al. (2014) com base em dados citogenéticos. As autoras propuseram o compartilhamento de uma sinapomorfia (localização da NOR intersticial no primeiro par metacêntrico) entre os dois gêneros.

Rhamdiopsis já foi considerado um táxon não resolvido dentro do subclado *Nemuroglanis* (= tribo Heptapterini), mas essa hipótese não foi corroborada por Bockmann &

Castro (2010) que sustenta o subclado *Nemuroglanis* como agrupamento bem suportado para Heptapteridae e confirma *Rhamdiopsis* como membro da família e parte da tribo Heptapterini, como também assinalado no presente trabalho e em estudos anteriores com base em dados morfológicos (e.g., Lundberg & McDade, 1986; Lundberg et al., 1991).

Em seu trabalho Bockmann (1998) sugere 11 novos gêneros sendo eles: *Callimorhamdia*, *Dolichorhamdia*, *Maculirhamdia*, *Microrhamdia*, *Pseudeptapterus*, *Pseudocetopsorhamdia*, *Pseudochamocranus*, *Pseudoleptorhamdia*, *Pseudoimparales*, *Pseudorhamdioglanis* e *Stewartglanis*. Os novos gêneros propostos não foram considerados por Bockmann & Guazzelli (2003), não sendo recuperados em trabalhos posteriores (Bockmann & Castro, 2010; Ferraris, 2007). Dos onze gêneros assinalados por Bockmann (1998), apenas *Pseudeptapterus*, foi posteriormente citado como possível espécie do gênero *Heptapterus* (Faustino-Fuster et al., 2019). No presente estudo o terminal correspondente a *Pseudeptapterus* está presente no mesmo clado que *Chasmocranus truncatorostris* e grupo irmão de *Heptapterus*.

O gênero *Heptapterus*, um dos primeiros a ser descrito para a atual família Heptapteridae, passou por diversas revisões que apontavam alterações em sua composição por exemplo *Acentronichthys*, *Chasmocranus*, *Imparales* e *Medemichthys* (sinônimos juniores de *Nemuroglanis*), *Nannoglanis*, *Pariolius* e *Phenacorhamdia* já foram considerados sinônimos para o gênero que hoje conta com doze espécies válidas (Bockmann, 1998; Bockmann & Guazzelli, 2003; Ferraris, 2007 e Faustino-Fuster, 2019). Nossos resultados recuperam o gênero agrupado com *Acentronichthys* e *Chasmocranus*, hoje considerados válidos, mais *Rhamdiopsis*, *Rhamdioglanis*, *Taunayia*, *Cetopsorhamdia*, *Imparfinis*, *Mastiglanis*, *Phenacorhamdia* e *Rhamdella* compondo a tribo Heptapterini, antigo subclado *Nemuroglanis* corroborando a proposta morfológica de Ferraris, 1988; Bockmann, 1994 e Bockmann, 1998; e também a proposta molecular mais recente de Silva et al. (2021).

Os gêneros *Brachyrhamdia*, *Pimelodella*, *Rhamdia* e *Goeldiella* foram recuperados em um clado basal em Heptapteridae como proposto por Bockmann (1998) e confirmado por Silva et al. (2021). Nesse trabalho os autores denominaram o clado de subfamília Rhamdiinae; na qual *Pimelodella* e *Rhamdia* se mostram relacionados como grupo irmão, carecendo de revisão das relações intergenéricas; por outro lado *Goeldiella* é recuperado como gênero basal dentro do clado nas análises com os genes nucleares como visto em Silva et al. (2021). Contudo os dados mitocondriais recuperam esse gênero como basal à subfamília Heptapterinae. Além disso Silva et al. (2021) discutem a necessidade de esclarecimento sobre as relações entre alguns

gêneros incluindo o posicionamento de *Goeldiella* em relação a família pois os resultados moleculares mostram diferenças em relação aos morfológicos. Adicionalmente o gênero *Brachyrhamdia* foi agrupado com *Pimelodella*. Essa relação é questionada em trabalhos anteriores (Bockmann & Miquelarena, 2008; Slobodian, 2013; Slobodian & Bockmann, 2013) devido à forte relação filogenética e semelhança morfológica entre esses dois gêneros levantando assim dúvidas quanto a validade de *Brachyrhamdia*.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação

6. Considerações Finais

A partir das análises das árvores acessadas através dos genes mitocondriais e nucleares foi possível considerar:

1. A monofilia da Família Heptapteridae dividida em duas subfamílias;
2. A subfamília Heptapterinae é recuperada como maior clado dentro de Heptapteridae e apresenta os gêneros mais controversos e dividida em duas tribos: Brachyglaniini e Heptapterini;
3. O posicionamento de alguns gêneros considerados basais tanto para a família quanto para as subfamílias ainda é considerado controverso mesmo com dados moleculares;
4. A parafilia foi observada para os gêneros *Imparfinis*, *Pimelodella* e *Rhamdia*;
5. No geral as reconstruções moleculares corroboraram as propostas morfológicas anteriores.

Referências Bibliográficas

Arce HM, Reis R, Geneva AJ, Pérez MHS. Molecular phylogeny of thorny catfishes (Siluriformes: Doradidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* Volume 67, Issue 3, June 2013, Pages 560-577.

Alonso, R., Crawford, A. J., & Bermingham, E. (2011). Molecular phylogeny of an endemic radiation of Cuban toads (Bufonidae: Peltophryne) based on mitochondrial and nuclear genes. *Journal of Biogeography*, 39(3), 434–451. doi:10.1111/j.13652699.2011.02594.x

Albert JS, Johnson DM, Knouft JH. Fossils provide better estimates of ancestral body size than do extant taxa in fishes. *Acta Zool.* 2009; 90:357–84.

Almeida, M. A. Tese. Revisão taxonômica e descrição da musculatura cefálica do gênero *Mastiglanis* Bockmann, (1994) Siluriformes: Heptapteridae. Ribeirão Preto, 2019. 139p

Aljanabi SM, Martinez I (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25:4692-4693.

An, H.S., Kim, M., Lee, J.W. et al. Molecular identification of Korean catfish (Siluriformes) based on two genetic markers. *Genes Genom* 34, 695–702 (2012).
<https://doi.org/10.1007/s13258-012-0131-8>

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981 Apr 9;290(5806):457–465.

Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*. 1999;23(2):147. doi:10.1038/13779

Arratia, G. 1992. Development and variation of the suspensorium of primitive catfishes (Teleostei: Ostariophysi) and their phylogenetic relationships. *Bonn. zool. Monogr.* 32: 1 – 148.

Arratia G. New teleostean fishes from southern Germany and the systematic problems concerning the 'pholidophoriforms'. 2000. *Paläontologische Zeitschrift* 74: 113-143.

Arratia G, Kapoor BG, Chardon M, Diogo R (2003) *Catfishes*. 2 vol., Plmouth: Science Publishers, 844pp.

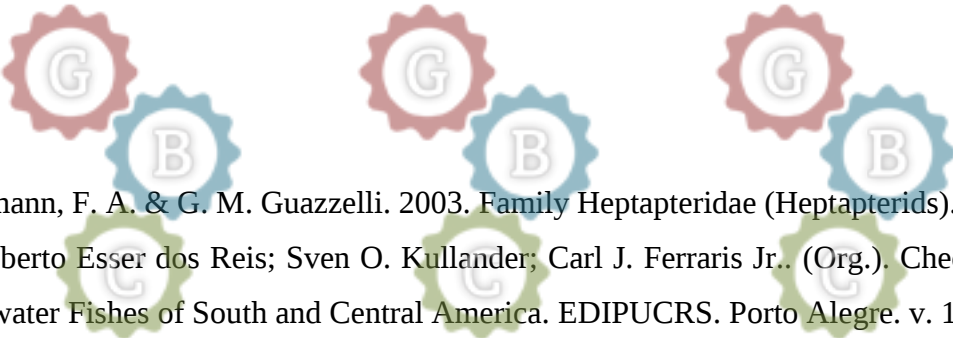
Azuma Y, Kumazawa Y, Miya M, Mabuchi K, Nishida M. Mitogenomic evaluation of the historical biogeography of cichlids toward reliable dating of teleostean divergences. *BMC Evolutionary Biology*. 2008 Jul 23;8:215. PubMed PMID:18651942.

Betancur-R, R., Broughton, R. E., Wiley, E. O., Carpenter, K., López, J. A., Li, C., Holcroft, N. I., Arcila, D., Sanciangco, M., Cureton Ii, J. C., Zhang, F., Buser, T., Campbell, M. A., Ballesteros, J. A., Roa-Varon, A., Willis, S., Borden, W. C., Rowley, T., Reneau, P. C., Hough, D. J., ... Ortí, G. (2013). The tree of life and a new classification of bony fishes. *PLoS currents*, 5, [ecurrents.tol.53ba26640df0ccae75bb165c8c26288](https://doi.org/10.1371/currents.tol.53ba26640df0ccae75bb165c8c26288).
<https://doi.org/10.1371/currents.tol.53ba26640df0ccae75bb165c8c26288>

Bignotto, TS., Prioli, AJ., Prioli, SMAP., Maniglia, TC., Boni, TA., Lucio, LC., Gomes, VN., Prioli, RA., Oliveira, AV., Júlio-Junior, HF., & Prioli, LM.. (2009). Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River Basin. *Brazilian Journal of Biology*, 69(2, Suppl.), 681-689. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842009000300022>

Bockmann, F. A. (1994). Description of *Mastiglanis asopos*, a new pimelodid catfish from northern Brazil, with comments on phylogenetic relationships inside the subfamily Rhamdiinae (Siluriformes: Pimelodidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 107, 760–777.

Bockmann, F. A. 1998. Análise filogenética da família Heptapteridae (Teleostei, Ostariophysi, Siluriformes) e redefinição de seus gêneros. Universidade de São Paulo, São Paulo. Tese de Doutorado não publicada. 599p.



Bockmann, F. A. & G. M. Guazzelli. 2003. Family Heptapteridae (Heptapterids). pp. 406-431. In: Roberto Esser dos Reis; Sven O. Kullander; Carl J. Ferraris Jr.. (Org.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS. Porto Alegre. v. 1. 729p.

Bockmann, F. A. & C. J. Ferraris Jr. 2005. Systematics of the Neotropical catfish genera *Nemuroglanis* Eigenmann and Eigenmann 1889, *Imparales* Schultz 1944, and *Medemichthys* Dahl 1961 (Siluriformes: Heptapteridae). *Copeia*, 2005 (1): 124-137.

Bockmann, F. A. & A. M. Miquelarena. 2008. Anatomy and phylogenetic relationships of a new catfish species from northeastern Argentina with comments on the phylogenetic relationships of the genus *Rhamdella* Eigenmann and Eigenmann 1888 (Siluriformes, Heptapteridae). *Zootaxa*, 1780: 1-54.

Bockmann, F. A. & Castro, R. M. C. (2010). The blind catfish from the caves of Chapada Diamantina, Bahia, Brazil (Siluriformes: Heptapteridae): description, anatomy, phylogenetic relationships, natural history and biogeography. *Neotropical Ichthyology* 8, 673–706.

Bockmann, F. A. & V. Slobodian. 2013. Heptapteridae. In: Queiroz, L. J; Torrente-Vilara. G.; Ohara, W. M.; Silva, T. H. P; Zuanon, J & C. R. C. Doria. (Eds.) *Peixes do Rio Madeira*. São Paulo: Dialetto, 2013 (no prelo), v. 3, p. 12-71.

Briñoccoli, Y. F., Bogan, S., Meluso, J. M., & Cardoso, Y. P. (2018). Actualización de la distribución de *Rhamdella aymarae* (Siluriformes: Heptapteridae). *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 20, 323–332.

Brito MR, (2003) Análise fiogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea 9Teleostei: Ostariophys) Tese de Doutorado, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 512pp.

Brito, R. 2003. Higher-level Phylogeny of Siluriformes - An Overview. In: Catfishes. G. Arratia, B.G. Kapoor, M. Chardon and R. Diogo (eds.). Science Publishers Inc., Enfield, NH, pp. 353 – 380.

Brown, W.M.; George, M. JR. & Wilson, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci Proc Natl Acad Sci Proc Natl Acad Sci*. 76: 1967-1971.

Butler, J.M. Mitochondrial DNA analysis In: *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. 2.ed. Elsevier, 2010, Capítulo 10, p.376-389.

Calegari, B. B., Vari, R. P., & Reis, R. E. (2019). Phylogenetic systematics of the driftwood catfishes (Siluriformes: Auchenipteridae): a combined morphological and molecular analysis. *Zoological Journal of the Linnean Society*.

Carvalho, D.C., Beheregaray, L.B. Conservation genetics of the threatened catfish *Conorhynchus conirostris* (Siluriformes: incertae sedis), an evolutionary relict endemic to the São Francisco River Basin, Brazil. *Conserv Genet* 19, 1223–1230 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10592-018-1090-7>

Campbell, N.A., Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., e Jackson, R. B. (2008). A tour of the cell. Em *Biology* (8th ed., pp. 94-124). San Francisco, CA: Pearson.

Chen W-J, Lavoué S, Mayden RL. Evolutionary origin and early biogeography of otophysan fishes (Ostariophysi: Teleostei). *Evolution*. 2013; 67: 2218±2239. doi: 10.1111/evo.12104 PMID: 23888847

Cramer CA, Bonatto SL, Reis RE (2011) Molecular phylogeny of the Neoplecostominae and Hypoptopomatinae (Siluriformes: Loricariidae) using multiple genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59: 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.01.002>

de Pinna, M. C. C. 1998. Phylogenetic Relationship of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): Historical Overview and Synthesis of Hypotheses. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, editores. *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS; p. 279-30.

de Pinna, M. C. C. 1993. Higher-level phylogeny of Siluriformes, with a new classification of the order (Teleostei, Ostariophysi). The City University of New York, New York. Tese de doutorado não publicada, 482 p.

de Pinna, M. C. C. 1991. Concepts and tests of homology in the cladistic paradigm. *Cladistics*, 7: 367–394.

de Pinna, M. C. C. & R. P. Vari. 1995. Monophyly and phylogenetic diagnosis of the Cetopsidae, with synonymization of the Helogenidae (Teleostei, Siluriformes). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 571: 1-26.

Diogo R. Phylogeny, origin and biogeography of catfishes: support for a Pangean origin of 'modern teleosts' and reexamination of some Mesozoic Pangean connections between the Gondwanan and Laurasian supercontinents. *Anim Biol*. 2004;54(4):331–51.

Diogo R (2003) Higher-level phylogeny of Siluriformes – An overview. In: Catfishes (Arratia G, Kapoor BG, Chardon M, Diogo R, eds) London, Science publishers, 353-384p.

Diogo R, Peng Z. State of the art of siluriform higher-level phylogeny. In: Grande T, Poyato-Ariza F, Diogo R, editors. *Gonorynchiformes and ostariophysan relationships* Da comprehensive review. Oxford, UK: Science Publishers and Taylor & Francis; 2009. pp. 407±507.

Dornburg A, Friedman M, Near TJ. Phylogenetic analysis of molecular and morphological data highlights uncertainty in the relationships of fossil and living species of Elopomorpha (Actinopterygii: Teleostei). *Mol Phylogenetic Evol*. 2015;89:205–18.

Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*. 2007 Nov 8;7:214. PubMed PMID:17996036.

Eschmeyer, W. N., Van der Laan, R. & Fricke, R. (eds) 2019. *ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES: GENERA, SPECIES, REFERENCES*.

(<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Versão eletrônica acessada em 04 de novembro 2019.

Eschmeyer, W. N., Fong, J. D. & Fricke, R., 2020. ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES: SPECIES BY FAMILY/SUBFAMILY. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>).

Versão eletrônica acessada em 31 de julho de 2020.

Faustino-Fuster, D., Bockmann, F.A. & Malabarba, L.R. 2019. Two new species of Heptapterus (Siluriformes: Heptapteridae) from the Uruguay River basin, Brazil. *Journal of Fish Biology*, 94 (3), 352–373. <https://doi.org/10.1111/jfb.13908>

Faustino-Fuster, D. R., Meza-Vargas, V., Lovejoy, N. R., & Lujan, N. K. (2021). Multi-locus phylogeny with dense Guiana Shield sampling supports new suprageneric classification of the Neotropical three-barbeled catfishes (Siluriformes: Heptapteridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107186.

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

Ferraris, C. J., Jr. 1988. Relationships of the Neotropical catfish genus *Nemuroglanis*, with a description of a new species (Osteichthyes: Siluriformes: Pimelodidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 101 (3): 509- 516.

Ferraris, C.J. Jr. 2003. Genus and Species Incertae Sedis in Siluriformes. Pp. 260. In: Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C.J. Jr., (Eds.), *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil 739 pp.

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

Ferreira M, Bressane KCO, Moresco ARC, Moreira-Filho O, Almeida Toledo LF, Garcia C. 2014. Comparative application of direct sequencing, PCR-RFLP, and

cytogenetic markers in the genetic characterization of *Pimelodus* (Siluriformes: Pimelodidae) species: possible implications for fish conservation. *Genet Mol Res*. 13:4529–4544.

Garcia, C. 2009. Estudos cromossômicos e moleculares em *Rhamdia* (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae): análise de relações evolutivas. Universidade de São Paulo, São Paulo. Tese de Doutorado não publicada. 147p.

Garesse R, Carrodegua JA, Santiago J, Perez ML, Marco R, Vallej CG (1997) *Artemia* mitochondrial genome: molecular biology and evolutive considerations. *Comp Biochem Physiol* 117: 357-366.

Gardiner BG. The relationships of the palaeoniscid fishes, a review based on new specimens of *Mimia* and *Moythomasia* from Upper Devonian of Western Australia. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Geology*. 1984. 37: 173–428

Gardiner BG (1993) Osteichthyes: Basal Actinopterygians. In: Benton MJ, editor. *Fossil Record II*. London: Chapman and Hall. pp. 611-619.

Gauthier J, Kluge AG, Rowe T. Amniote phylogeny and the importance of fossils. *Cladistics*. 1988;4:105–209.

Grande, L. 1987. Redescription of *Hypsidoris farsonensis* (Teleostei: Siluriformes), with a reassessment of its phylogenetic relationships. *J. Vert. Paleontol*. 7: 24– 54.

Greenwood P, Rosen D, Weitzman S, Myers G. Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 1966;131: 339 - 456.

Guazzelli, G. M. 2003. Relações filogenéticas do gênero *Pimelodella* Eigenmann & Eigenmann 1888 (Siluriformes, Pimelodidae). Universidade de São Paulo, São Paulo. Tese de Doutorado não publicada. 232p.

Habib M, Lakra WS, Mohindra V, Khare P, Barman AS, Singh A, Lal KK, Punia P, Khan AA (2010) Evaluation of cytochrome b mtDNA sequences in genetic diversity studies of *Channa marulius* (Channidae: Perciformes). *Mol Biol Rep*. doi:10.1007/s11033-010-0175-2

Hashimoto DT, Prado FD, Foresti F, Porto-Foresti F (2016) Molecular identification of intergenus crosses involving catfish hybrids: risks for aquaculture production. *Neotrop. ichthyol.* vol.14 no.2 Maringá 2016 Epub June 27, 2016

Hardman M, Page LM (2003) Phylogenetic relationships among bullhead catfishes of the genus *Ameiurus* (Siluriformes, Ictaluridae). *Copeia* 1: 20-33.

Hardman, M. 2005. The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome b sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 700–720.

Hardman M, Lundberg JG (2006) Molecular phylogeny and chronology of diversification for “phractocephaline” catfishes (Siluriformes: Pimelodidae) based on mitochondrial DNA and nuclear recombination activating gene 2 sequences. *Mol Phylogenet Evol* 40: 410-418.

He, S., M. Gayet and F.J. Meunier. 1999. Phylogeny of the Amphiliidae (Teleostei: Siluriformes). *Ann. Sci. Nat.* 20: 117 – 146.

Howes, G. J. 1983. Problems in catfish anatomy and phylogeny exemplified by the Neotropical Hypophthalmidae (Teleostei: Siluroidei). *Bulletin of the British Museum (Natural History), Zoology*, 45:1-39.

Kappas I, Vittas S, Pantzartzi CN, Drosopoulou E, Scouras ZG (2016) A Time-Calibrated Mitogenome Phylogeny of Catfish (Teleostei: Siluriformes). *PLoS ONE* 11(12): e0166988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166988>

Katz, A.M., Barbosa, M.A., Mattos, J.L.O. & Costa, W.J.E.M. (2018) Multigene analysis of the catfish genus *Trichomycterus* and description of a new South American trichomycterine

genus (Siluriformes, Trichomycteridae). *Zoosystematics and Evolution*, 94, 557–566.
<https://doi.org/10.3897/zse.94.29872>

Koblmüller, S., Sturmbauer, C., Verheyen, E. et al. Mitochondrial phylogeny and phylogeography of East African squeaker catfishes (Siluriformes: Synodontis). *BMC Evol Biol* 6, 49 (2006). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-49>

Lu, Y., Ran, J.-H., Guo, D.-M., Yang, Z.-Y., & Wang, X.-Q. (2014). Phylogeny and Divergence Times of Gymnosperms Inferred from Single-Copy Nuclear Genes. *PLoS ONE*, 9(9), e107679. doi:10.1371/journal.pone.0107679

Lujan, N. K., Armbruster, J. W., Lovejoy, N. R., & López-Fernández, H. (2015). Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82, 269–288. doi:10.1016/j.ympev.2014.08.020

Lundberg J., G., O. Linares R., Nass and M. E. Antonio. 1988P. hractocephahluesm ioliopte(rPuism elodidae: Siluriformefsr) omt he Late Miocene Urumaco formatioVne,n ezuelaa: furthcears e ofe volutionary stasisa nd local extinctioanm ongS outhA merican fisheJs.o urnoafIV ertebratael eontolog8y:1,3 1-138.

Lundberg, J. G. 1993. African-South American freshwater fish clades and continental drift: problem with a paradigm. Pp. 156-199 in P. Goldblatt (ed.), *Biological relationships between Africa and South America*. Yale University Press, New Haven.

Lundberg JG, Sullivan JP, Rodiles-Hernández R, Hendrickson DA. Discovery of African roots for the Mesoamerican Chiapas catfish, *Lacantunia enigmatica*, requires an ancient intercontinental passage. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. 2007;156: 39-53.

Lundberg, J.G., J.P. Sullivan and M. Hardman, 2011. Phylogenetics of the South American catfish family Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes) using nuclear and mitochondrial gene sequences. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences*, Philadelphia, 161:153-189

Lundberg, J. G. & L. A. McDade 1986. On the south american catfish *Brachyramdia imitator* Myers (Siluriformes, Pimelodidae), with a phylogenetic evidence for a large intrafamilial lineage. *Notulae Naturae* (Philadelphia), 463: 1-24.

Lundberg, J. G., A. H. Bornbusch & Mago-Leccia, F. 1991. *Gladioglanis conquistador* N. Sp. from Ecuador with diagnosis of the subfamilies Rhamdiinae Blekker and Pseudopmelodinae N. Subf. (Siluriformes, Pimelodidae). *Copeia*, 1991 (1): 190-209.

Malabarba, L. R., & Malabarba, M. C. (2020). Phylogeny and classification of Neotropical fish. *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*, 1–19. doi:10.1016/b978-0-12-815872-2.00001-4

Marková S, Sanda R, Crivelli A, Shumka S, Wilson IF, Vukic J, Berrebi P, Kotlík P. Nuclear and mitochondrial DNA sequence data reveal the evolutionary history of *Barbus* (Cyprinidae) in the ancient lake systems of the Balkans. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Volume 55, Issue 2, May 2010, Pages 488-500

Masson, V. L. 2007. Taxonomia do gênero *Myoglanis* Eigenmann, 1912 (Siluriformes: Heptapteridae) com um estudo comparativo de sua musculatura cefálica superficial. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. Dissertação de mestrado não publicada. 88p.

Matsuura K, Nishida M. The mitochondrial genome spotted green pufferfish *Tetraodon nigroviridis* (Teleostei: Tetraodontiformes) and divergence time estimation among model organisms in fishes. *Gene Genet Syst.* 2006;81:29–39.

Morando M, Avila LJ, Perez CHF, Hawkins MA, Sites Jr JW. A molecular phylogeny of the lizard genus *Phymaturus* (Squamata, Liolaemini): Implications for species diversity and historical biogeography of southern South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Volume 66, Issue 3, March 2013, Pages 694-714

Muriel-Cunha, J. Biodiversidade e sistemática molecular de Phreatobiidae (Ostariophysi, Siluriformes) - com uma proposta sobre sua posição filogenética em Siluriformes e uma

discussão sobre a evolução do hábito subterrâneo. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. Tese de Doutorado não publicada. 144p.

Mo, T. 1991. Anatomy, relationships and systematics of the Bagridae (Teleostei: Siluroidei) with a hypothesis of siluroid phylogeny. Theses Zool. 17: 1 – 216.

Nakatani M, Miya M, Mabuchi K, Saitoh K, Nishida M. Evolutionary history of Otophysi (Teleostei), a major clade of the modern freshwater fishes: Pangaeen origin and Mesozoic radiation. BMC Evolutionary Biology. 2011;11: 177.

Nelson, J. S. Fishes of the world. New Jersey: John Wiley and Sons; 2016.

Ota, R. R. Message HJ, Graça WJ, Pavanelli CS. Neotropical Siluriformes as a model for insights on determining biodiversity of animal groups. PloS ONE [serial on the internet]. 2015; 10(7):1- 13. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0132913>

Palumbi SR (1996) Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: molecular Systematics (Hillis D, Moritz C, Mable B, eds), Mol Systematics. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA

Peixoto, M. S. 2011. Estudos sobre as relações filogenéticas e biogeográficas das espécies do gênero *Pimelodella* (Siluriformes, Heptapteridae) Eigenmann & Eigenmann, 1888 do Alto Paraná. Universidade de São Paulo, São Paulo. Tese de Doutorado não publicada. 144p.

Perdices A, Bermingham E, Montilla A, Doadrio I (2002). Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei:Pimelodidae) in Central America. Mol Phylogenet Evol 25:172-189.

Pereira SL, Baker AJ, Wajntal A (2002). Combined nuclear and mitochondrial DNA sequences resolve generic relationships within the Cracidae (Galliformes, Aves). Syst Biol 51 (6): 946-958.

Prado, F. D. do, Hashimoto, D. T., Senhorini, J. A., Foresti, F., & Porto-Foresti, F. (2012). Detection of hybrids and genetic introgression in wild stocks of two catfish species (Siluriformes: Pimelodidae): The impact of hatcheries in Brazil. *Fisheries Research*, 125-126, 300–305. doi:10.1016/j.fishres.2012.02.030

Reis, R.E., Albert, J.S., Di Dario, F., Mincarone, M.M., Petry, P., Rocha, L.A., 2016. Fish biodiversity and conservation in South America. *J. Fish Biol.* 89 (1), 12–47.

Rocha, M. S. & Zuanon, J. 2013. Heptapteridae. In: Queiroz, L. J; Torrente-Vilara. G.; Ohara, W. M.; Silva, T. H. P; Zuanon, J & C. R. C. Doria. (Eds.) *Peixes do Rio Madeira*. São Paulo: Dialto, 2013 (no prelo), v. 3, p. 78-128.

Sanger, F.; Nichlen, S. & Coulson, AR. 1977. DNA Sequencing with chain-termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 74, nº. 12, p. 5463-5467.

Samani N. k., Esa Y, Amin SMN, Fatin Mohd Ikhsan N. 2016. Phylogenetics and population genetics of *Plotosus canius* (Siluriformes: Plotosidae) from Malaysian coastal waters. *PeerJ* 4:e1930 <https://doi.org/10.7717/peerj.1930>

Schaefer, S.A. 1990. Anatomy and relationships of the scoloplacid catfishes. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philad.* 142: 167 – 210.

Silfvergip, A. M. C. 1996. A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia*. Department of Vertebrate Zoology, Stockholm. 156 p.

Silva, G. S., Roxo, F. F., Melo, B. F., Ochoa, L. E., Bockmann, F. A., Sabaj, M. H., ... & Oliveira, C. (2014). Evolutionary history of Heptapteridae catfishes using ultraconserved elements (Teleostei, Siluriformes). *Zoologica Scripta*.

Sullivan J. P., Lundberg, J. G., Hardman, M. A. phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluruformes) using rag1 and rag 2 nuclear gene sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 2006; 41:636-62.

Sullivan, J., Muriel-Cunha, J., & Lundberg, J. (2013). Phylogenetic relationships and molecular dating of the major groups of catfishes of the Neotropical superfamily Pimelodoidea (Teleostei, Siluriformes). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 162, 89-110. Retrieved August 6, 2020, from www.jstor.org/stable/42751950

Shimabukuro-Dias CK, Oliveira, C, Reis RE, Foresti F (2004). Molecular phylogeny of the armoured catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Silurimormes). *Mol Phylogenet Evol* 32: 152-163

Stewart, D. J. 1986. A new pimelodid catfish from the deep-river channel of the Río Napo, eastern Ecuador (Pisces: Pimelodidae). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 138: 46-52.

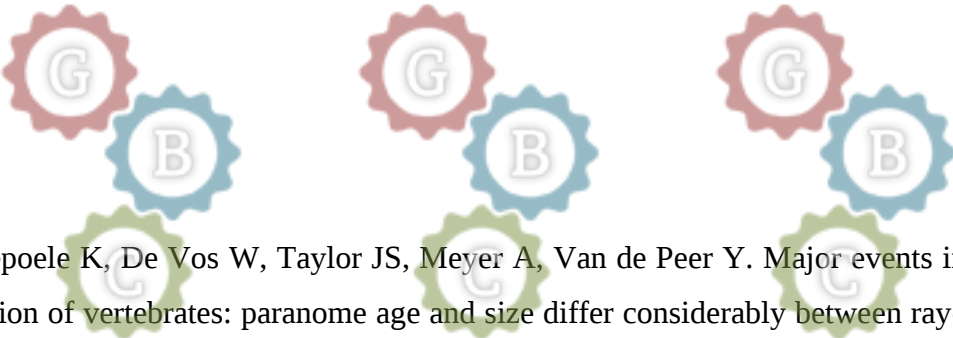
Tamura K, Dudley, Nei M, Kumar S (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.

Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 28, p. 2731-2739.

Tanabe, A. S. (2007). Kakusan: a computer program to automate the selection of a nucleotide substitution model and the configuration of a mixed model on multilocus data. *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 962-964.

Tavera, J.J., P, A.A., Balart, E.F. et al. Molecular phylogeny of grunts (Teleostei, Haemulidae), with an emphasis on the ecology, evolution, and speciation history of New World species. *BMC Evol Biol* 12, 57 (2012). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-57>

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680. doi:10.1093/nar/22.22.4673



Vandepoele K, De Vos W, Taylor JS, Meyer A, Van de Peer Y. Major events in the genome evolution of vertebrates: paranome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 2004 Feb 10;101(6):1638-43. PubMed PMID:14757817.

Vergara J, Azpelicueta MM, Garcia G (2008). Phylogeography of the Neotropical catfish *Pimelodus albicans* (Siluriformes: Pimelodidae) from río de la Plata basin, South America, and conservation remarks. *Neotrop Ichthyol* 6:75-85.

Wang, J., Shen, T., Ju, J. et al. The complete mitochondrial genome of the Chinese longsnout catfish *Leiocassis longirostris* (Siluriformes: Bagridae) and a time-calibrated phylogeny of ostariophysan fishes. *Mol Biol Rep* 38, 2507–2516 (2011). <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0388-4>.

