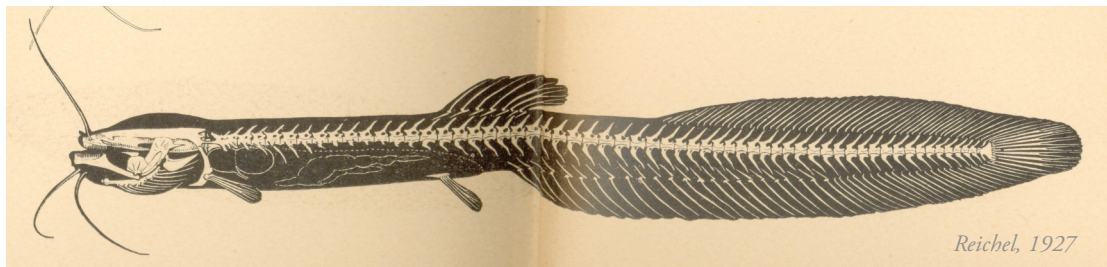


Janice Muriel Fernandes Lima da Cunha

**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**



Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Doutora em
Ciências, na Área de Biologia (Genética).

Orientador: Prof. Dr. Mário César Cardoso de Pinna

São Paulo
2008

RESUMO

Amostras de diferentes espécies de *Phreatobius* foram coletadas para obtenção de dados moleculares potencialmente informativos do gene nuclear RAG-2 para resolver as relações filogenéticas do gênero. Apresento resultados de sequências. Os dados de *Phreatobius* foram combinados com sequências equivalentes de representantes de várias outras famílias de Siluriformes, e analisados via máxima parcimônia (total de 966 pares de base de RAG-2 para 176 táxons). As análises resultaram em 172 árvores com 5213 passos. O resultado do consenso estrito indica fortemente que *Phreatobius* forma um grupo monofilético (sustentado por 33 sinapomorfias moleculares) com Pseudopimelodidae e Pimelodidae, e *Conorhynchos* + Heptapteridae. Hipóteses anteriores posicionando *Phreatobius* exclusivamente com Heptapteridae não foram sustentadas. Os resultados apresentados requerem que *Phreatobius* seja alocado na sua própria família, Phreatobiidae (disponível em nível subfamiliar). Uma revisão taxonômica de Phreatobiidae mostra que existem ao menos sete espécies, das quais apenas três descritas: *Phreatobius cisternarum*, *Phreatobius dracunculus*, *Phreatobius sanguijuela*, *Phreatobius* sp. "Anapixi", *Phreatobius* sp. "Jaú", *Phreatobius* sp. "Tarumanzinho", *Phreatobius* sp. "Viruá". A hipótese de relações filogenéticas dentro de Phreatobiidae mostra que *Phreatobius cisternarum* é grupo-irmão do clado composto por (*Phreatobius* sp. "Viruá" (*P. dracunculus* + *Phreatobius* sp. "Tarumanzinho")). O mapeamento filogenético demonstra que o hábito subterrâneo evoluiu uma única vez na família e o ambiente freático foi invadido duas vezes.

ABSTRACT

Samples from different species of *Phreatobius* were collected in order to obtain molecular data from nuclear RAG-2 gene sequence potentially informative to resolve phylogenetic relationships of the genus. The data on Phreatobiidae were combined with equivalent sequence information from representatives of several other siluriform families, and analyzed by maximum parsimony (a total of 966 bp RAG-2 for 176 taxa). The analyses resulted in 172 trees, with 5213 steps. The strict consensus results strongly indicate that *Phreatobius* forms a monophyletic group (supported by 33 molecular synapomorphies) with Pseudopimelodidae, Pimelodidae, and *Conorhynchos* + Heptapteridae. Previous hypotheses aligning *Phreatobius* exclusively with Heptapteridae were not supported. Results herein presented requires that *Phreatobius* be allocated in its own family, as Phreatobiidae (already available at subfamilial level). A taxonomic revision of Phreatobiidae shows that at least seven species exist, only three of which currently described: *Phreatobius cisternarum*, *Phreatobius dracunculus*, *Phreatobius sanguijuela*, *Phreatobius* sp. "Anapixi", *Phreatobius* sp. "Jaú", *Phreatobius* sp. Tarumanzinho", *Phreatobius* sp. "Viruá". A hypothesis of relationships within Phreatobiidae shows that *P. cisternarum* is sister-group of a clade composed of (*P. sp. "Viruá"* (*P. dracunculus* + *P. sp. "Tarumanzinho"*)). Phylogenetic mapping shows that subterranean habit has evolved once in the family and the phreatic environment was invaded twice.

1. INTRODUÇÃO

Os peixes constituem o grupo mais diverso de vertebrados, e as espécies válidas atualmente (27.977) correspondem a mais da metade do total de espécies reconhecidas para os vertebrados (54.711) – a maioria dessas espécies vive permanentemente nos oceanos, mares, lagos e rios (Nelson, 2006). Desta grande diversidade, representantes de 10 ordens ocuparam o ambiente subterrâneo: Characiformes, Cypriniformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Percopsiformes, Ophidiiformes, Cyprinodontiformes, Synbranchiformes, Scorpaeniformes e Perciformes.

Atualmente são reconhecidas 110 espécies de peixes subterrâneos e destas 75 % são da série Otophysi: Characiformes (3 espécies), Cypriniformes (44 espécies), Siluriformes (30 espécies) e Gymnotiformes (1 espécie) (Proudlove, 2006).

Entre os Ostariophysi, os Siluriformes (bagres) constituem um grupo bastante diverso, que apresenta uma ampla distribuição geográfica (Fig. 1). Os Siluriformes representam a sexta maior ordem entre os vertebrados viventes (Lundberg, 1975), com cerca de 36 famílias, com 478 gêneros e mais de 3.000 espécies (Ferraris, 2007). Esses peixes colonizaram praticamente todos os tipos de habitats aquáticos, desde os superficiais aos subterrâneos: estão presentes em todos os continentes e ocorrem predominantemente em água doce. Duas famílias, Ariidae e Plotosidae, incluem muitas espécies marinhas. Os Siluriformes certamente têm um extenso cenário histórico, estrutural e filogenético a ser explorado. Além disso, o grande número de

espécies, sua diversidade morfológica e ecológica, faz deste grupo de peixes uma fonte excelente de informações sobre evolução morfológica e molecular.

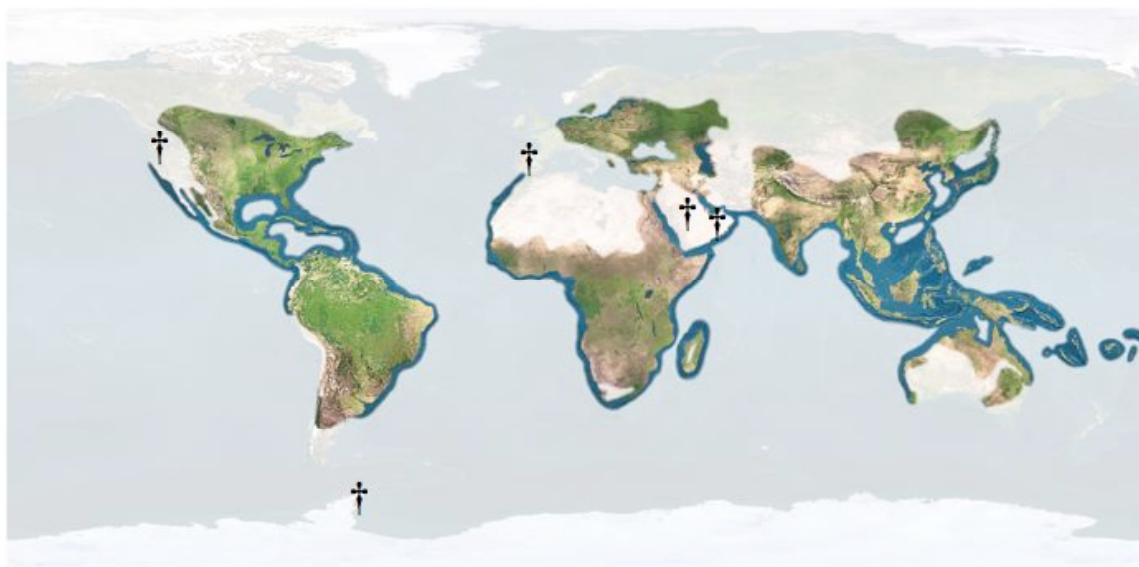


Figura 1. Distribuição dos Siluriformes (atuais e fósseis). Fonte: All Catfishes Species Inventory Project.

Os Siluriformes, do ponto de vista ecológico, são distintos da maioria dos peixes de água doce por apresentarem o hábito predominantemente noturno. Não dependem criticamente da visão, mas sim de outros sistemas sensoriais elaborados tais como barbilhões táteis e quimiosensíveis e/ou órgãos olfativos desenvolvidos. Devido a essas características os bagres são considerados pré-adaptados para viver no fundo de canais profundos de rios, cavernas, aquíferos e espaços intersticiais diminutos (Lundberg & Friel, 2003).

Os organismos aquáticos que passam seu ciclo de vida completo no ambiente subterrâneo são chamados de estigóbios (Gibert *et al.*, 2004). Os bagres estigóbios evoluíram nas águas subterrâneas da América do Sul e do

Norte, Ásia e África e estão distribuídos de acordo com Proudlove (2006) em 7 famílias (não considerando *Uegitglanis* em uma família própria, como sugere aquele autor): Astroblepidae, Clariidae, Ictaluridae, Heptapteridae, Loricariidae, Siluridae e Trichomycteridae.

Durante o curso da evolução essas espécies de bagre penetraram a superfície da Terra e ocuparam várias extensões e profundidades através de cavidades subterrâneas de várias formas e tamanhos. Sem o estímulo da luz e sob condições ambientais mais homogêneas, algumas características apresentam-se vestigiais/ausentes, pigmentação reduzida/inexistente, corpo alongado/vermiforme, entre outras características peculiares (Proudlove, 2006). É de um grupo de bagres de tamanho reduzido, vermiforme, de cor vermelha e que ocupou com sucesso o subterrâneo da bacia Amazônica - que esta tese trata.

1.1. A fauna subterrânea ou estigóbia e seus ambientes

As espécies de Phreatobiidae vivem seu ciclo de vida inteiro na água subterrânea. Ao tratar das diversas questões biológicas abertas para Phreatobiidae busquei um nível de compreensão sobre o ambiente aquático subterrâneo e como se configurava atualmente a biodiversidade nesse ecossistema. Assim, segue uma introdução geral sobre o ambiente.

A hidrosfera do planeta Terra, sempre impressiona por conta da extensão das águas oceânicas, que dominam a superfície do planeta. Contudo, 97% de toda água doce do planeta está abaixo da superfície; com isto lagos e rios representam menos que 2% do total (L'Volich, 1974 *apud* Gibert *et. al.*,

1994). Considerando estas dimensões Pinneker (1983) considera que a água subterrânea dos continentes constitui uma hidrosfera sub-superficial. De acordo com Gibert *et. al.*, (1994) a ligação complexa que existe entre a água superficial e a água subterrânea é determinada pelas condições geológicas e climáticas existentes entre as bacias de drenagens, e os organismos atravessam este *contiumum* geohidráulico no contexto do tempo e espaço.

As estratégias de ocupação dos ambientes subterrâneos pelos organismos são numerosas e bem variadas. Estas particularidades levam a proposição de inúmeras nomenclaturas baseadas nas adaptações ou presença/ausência dos animais no meio subterrâneo aquático. Neste trabalho sigo a nomenclatura mais atual proposta por Gibert *et al.* (1994), os quais denominam os organismos das águas subterrâneas como *estigofauna*. Os autores apresentam distinção da estigofauna em função da dependência ou afinidade em relação ao ambiente subterrâneo: estigoxenos, estigófilos e estigóbios.

Os sistemas subterrâneos são heterogêneos e o estabelecimento de limites entre os vários tipos sempre representa uma solução particular. As espécies de Phreatobiidae são encontradas na água da zona freática e na zona intersticial profunda de rios. Denomina-se de aquífero a camada sub-superficial cujos vazios e poros estão completamente saturados de água. Orghidan (1955) definiu a área intersticial como transição entre a água superficial dos rios e a água subterrânea e cunhou o termo “hyporhéique” para se referir aos espaços intersticiais formados pelos sedimento do leito do rio. As conexões entre esses ambientes podem variar no tempo e no espaço e

de acordo como Williams (1993) as interações hidrológicas podem ser de dois tipos “effluent”, quando o rio é alimentado pelo aquífero e “influent” quando o aquífero é alimentado pelo rio (Fig. 2).

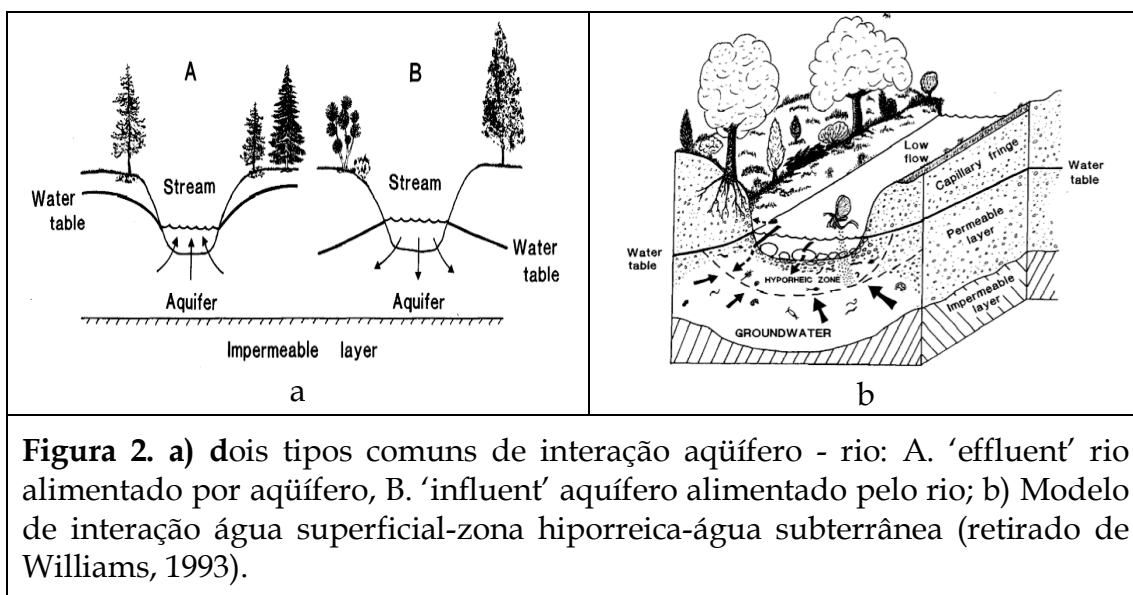


Figura 2. a) dois tipos comuns de interação aquífero - rio: A. 'effluent' rio alimentado por aquífero, B. 'influent' aquífero alimentado pelo rio; b) Modelo de interação água superficial-zona hiporreica-água subterrânea (retirado de Williams, 1993).

O ambiente subterrâneo foi considerado como de baixa diversidade, no entanto diversos estudos demonstraram que a zona hiporreica associada às outras porções de água sub-superficial podiam abrigar uma fauna bastante diversificada (Stanford & Ward, 1988; Gilbert *et al.*, 1994, Humphreys, 2008). No Brasil a fauna subterrânea mais estudada está nos ambiente cavernícolas (Trajano, 1997, 2001). A fauna subterrânea da Amazônia é conhecida a partir de poucos estudos de invertebrados (Andrade, 2007; Corgosinho *et al.*, 2007) e menos ainda para vertebrados (Henderson & Walker, 1990).

A seguir apresento informações sobre filogenia dos Siluriformes com o intuito de contextualizar o tema central deste trabalho.

1.2. Aspectos sistemáticos da ordem Siluriformes

O monofiletismo da ordem Siluriformes é bem corroborado, sendo consensual entre os vários autores modernos (Fink & Fink, 1981, 1996; Arratia, 1987, 1992; Mo, 1991; de Pinna, 1993). Alguns trabalhos analisaram as relações filogenéticas dos Siluriformes como um todo segundo métodos cladísticos: Mo (1991), de Pinna (1993, 1998), Britto (2000), Diogo (2005) e Sullivan *et al.* (2006). As propostas dos dois primeiros autores, com base em dados morfológicos, concordam quanto ao posicionamento basal de Diplomystidae, como o grupo-irmão de todos os outros Siluriformes, além do posicionamento relativamente basal de Cetopsidae. Entretanto, Mo (1991) considera Cetopsidae parafilético, enquanto de Pinna (1993) e de Pinna & Vari (1995) o consideram monofilético e grupo-irmão de Helogenidae (agora incluído em Cetopsidae). Outro aspecto congruente entre os autores supracitados é o reconhecimento de um grande subgrupo que compreende os bagres neotropicais Loricarioidea e Aspredinidae, os Amphiliidae africanos e os bagres asiáticos Sisoridae, Amblycipitidae e Akysidae. De acordo com de Pinna (1998), os Siluriformes neotropicais compreendem oito grupos monofiléticos (além da família Ariidae, praticamente cosmopolita): Diplomystidae, Cetopsidae, Loricarioidei, Doradoidea, Aspredinidae, Pimelodinae, Heptapterinae e Pseudopimelodinae. Entretanto, as relações filogenéticas interfamiliares nos Siluriformes é ainda um dos grandes problemas na sistemática ictiológica, como havia mencionado De Pinna (1998).

Alguns poucos estudos baseados em dados moleculares foram realizados com o objetivo de resolver questões filogenéticas interfamiliares (Hardman, 2005; Sullivan *et al.*, 2006). Análise de Hardman (*op. cit*) utilizou sequências do gene mitocondrial CytB de 170 espécies representando 29 famílias. A hipótese obtida pelo autor resultou em grande politomia dado a escala de variação desta região genômica. Um dos poucos grupos que foi recuperado pelas análises foi o clado Pimelodoidea, com Heptapteridae como grupo-irmão de Pimelodidae e Pseudopimelodidae. Sullivan *et al.* (2006) realizaram um estudo com base em sequências de ADN nuclear (genes ativadores de recombinase 1 e 2 - RAG-1 e RAG-2). O resultado deste trabalho que mais contrasta com as hipóteses anteriores (Mo, 1991 e De Pinna, 1993, 1998) é o posicionamento da super-família Loricarioidea como grupo-irmão dos demais Siluriformes (Diplomystidae+Siluroidei). Este estudo pode definir alguns grandes grupos dentro da ordem, porém as relações interfamiliares permaneceram sem resolução.

A maior parte dos trabalhos de sistemática molecular trata de questões menos inclusivas em Siluriformes, tais como: filogenia de Loricariidae baseada em sequências de ADN mitocondrial ARNr 12S e 16S (Montoya-Burgos *et al.*, 1997; Montoya-Burgos *et al.*, 1998); estudo filogenético de Pangasiidae baseada em aloenzimas e ADN mitocondrial citocromo b (Pouyaud, 2000); filogenia de *Noturus* (Ictaluridae) baseada em sequências do gene nuclear rag2 (Hardman, 2004); filogenia entre os Doradidae com base em dados moleculares e morfológicos (Moyer *et al.*, 2004) filogenia e diversificação dos “phractocephaline” (Pimelodidae) baseada em sequências

de ADN mitocondrial (citocromo b e nitrogênio-desidrogenase) e nuclear (gene ativador de recombinação, RAG-2) (Hardman & Lundberg, 2006).

Inúmeras questões filogenéticas interfamiliares permanecem não resolvidas entre os Siluriformes. O posicionamento filogenético da maioria das famílias ainda não está bem resolvido, tais como: Ancharidae, Austroglanididae, Bagridae, Chacidae, Claroteidae, Cranoglanididae, , Heptapteridae, Ictaluridae, Pangasidae, Pimelodidae, Plotosidae, Pseudopimelodidae, Schilbidae e Siluridae. Além dessas questões, o posicionamento filogenético de Phreatobiidae está entre as questões remanescentes mais intrigantes entre os Siluriformes.

1.3. A família Phreatobiidae Reichel, 1927

Os resultados deste trabalho, a serem apresentados adiante, corroboram a proposição de uma nova classificação para as espécies incluídas no gênero *Phreatobius*. O nome 'Phreatobinae' estava disponível para a categoria de família e foi proposto por Reichel (1927, 383). Embora haja um consenso tratar-se de um membro dos Siluriformes, sua alocação entre os vários grupos de bagres tem se revelado problemática devido a sua morfologia peculiar e anterior raridade como material de estudo. Nessas circunstâncias, a reunião de uma amostragem representativa da distribuição e da atual diversidade abrem a possibilidade de reexaminar a questão sobre sua classificação, e oferece a oportunidade de se lhes aplicarem métodos modernos de análise filogenética com marcadores moleculares.

A primeira menção científica da espécie se deve a Emilio A. Goeldi, que em 1904 apresentou um breve relato oral a respeito no VI Congresso Internacional de Zoologia, em Berna, Suíça. Esse relato, publicado nos anais do evento em 1905, limita-se a batizar o gênero e a espécie novos, a comunicar sua descoberta numa cisterna da ilha do Marajó e o fato de habitar o lençol freático, e a sugerir suas possíveis relações com os Cetopsidae e os Trichomycteridae, não descrevendo entretanto mais detalhes anatômicos dos dois exemplares que examinou.

A descrição detalhada foi feita bem mais tarde por Manfred Reichel (1927), que revela ainda a localidade específica do achado (ao norte de Soure, na ilha do Marajó) e toda a cronologia do estudo da espécie nesse vinte e poucos anos de intervalo.

Além dos dois exemplares originais, Goeldi recebeu posteriormente mais quatro do proprietário da cisterna, Vicente Chermont de Miranda; eventualmente, os seis exemplares foram enviados à Europa, onde acabaram aos cuidados de O. Fuhrmann. Este mandou um exemplar inteiro aos Estados Unidos, fato que resultou na inclusão da espécie num anexo à monografia de Carl H. Eigenmann (1918) sobre os Pygidiidae (= Trichomycteridae). Enquanto isso, Fuhrmann também repassou alguns cortes delgados para Reichel, que publicou com esse material duas notas preliminares sobre o peixe subterrâneo. Em 1923, Fuhrmann repassou todo o material que tinha -- duas séries de cortes histológicos e três exemplares inteiros em álcool -- para Reichel, que foi a base da monografia deste último sobre anatomia de *Phreatobius cisternarum*, publicada em 1927.

O sétimo exemplar documentado da espécie só foi coletado por R. P. Arlé, 60 anos após a descrição original, num poço de água potável de 10-15m no perímetro urbano de Belém. Esse espécime aparentemente foi mantido vivo por um ano pelo descobridor, após o que foi fixado por Antenor Leitão Carvalho, o qual obteve mais dois exemplares de Macapá, no então Território do Amapá. Carvalho (1967) relata, com base nesse material, que a ocorrência de *P. cisternarum* em três pontos distantes entre si (Ilha do Marajó, Belém e Macapá) poderia indicar que a espécie seria mais abundante do que se pensava. Mais tarde, entre 1993 e 2000, outros cinco exemplares foram coletados e depositados no Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG).

Em suma, apenas um total de 14 exemplares de *P. cisternarum* estavam inicialmente disponíveis em coleções científicas de todo o mundo. Essa aparente raridade, no entanto, deve-se mais à dificuldade logística de coleta do que propriamente uma pretensa escassez da população da espécie: segundo depoimentos de moradores da região, de fato não seria incomum encontrá-la por ocasião da escavação de poços caseiros.

1.4. Propostas de posicionamento de Phreatobiidae provenientes dos estudos não cladísticos

Após a hipótese inicial de Goeldi (1905) situando o gênero entre os Cetopsidae e Trichomycteridae, Fuhrmann (1905) colocou-o entre os bagres africanos da família Clariidae, baseado em similaridades superficiais, proposta esta que não encontrou apoio posterior.

Já Eigenmann (1910) colocou-o na família Siluridae, subfamília Pimelodinae, afirmando, entretanto, "I am not sure of the zoological position of this subterranean fish". Em 1918, o mesmo autor coloca *Phreatobius cisternarum* no apêndice da sua revisão dos Pygidiidae (=Trichomycteridae).

A anatomia interna de *P. cisternarum* foi bem abordada por Reichel (1927), sendo paradoxalmente melhor estudada que a de qualquer outro bagre -- em especial os aspectos histológicos da pele, órgãos dos sentidos, sistema sensorial, encéfalo e aparelho de Weber. Apesar disso, a ausência de estudos dessa natureza em outros siluriformes inviabilizou qualquer comparação em termos filogenéticos. Ainda, devido à carência de técnicas anatômicas apropriadas na época, Reichel não fez uma análise osteológica satisfatória. Este autor criou a subfamília Phreatobiinae como parte de Siluridae, e sugeriu que *Phreatobius* seja mais proximamente relacionado com os pimelodídeos (hoje heptapterídeos) do gênero *Heptapterus* -- mais especificamente com *H. eigenmanni*.

Myers (1944) posicionou *Phreatobius* entre os Pygidiidae (=Trichomycteridae), na subfamília Phreatobiinae, sugerindo que Glanapteryginae seria a linhagem mais próxima por compartilhar com esta a condição primitiva da ausência de odontódios no opérculo e inter-opérculo.

Gosline (1945) simplesmente compilou a informação de Eigenmann, colocando o gênero entre os Pygidiidae (=Trichomycteridae), sem precisar em que subfamília deveria incluí-lo. Posteriormente, Myers & Weitzman (1966) discordaram da inclusão de *Phreatobius* entre os Trichomycteridae, baseados

na combinação de novos dados sobre *Heptapterus* e informações do trabalho de Reichel (1927).

Buckup (1988) propôs que *Phreatobius* fosse sinônimo júnior de *Heptapterus*, baseado na similaridade da confluência das nadadeiras caudal e anal, no número de vértebras e no número de raios na nadadeira anal, compartilhados entre *Phreatobius cisternarum* e *Heptapterus mustelinus*. Esta proposta foi refutada por autores subseqüentes, principalmente considerando os avanços recentes na sistemática dos Heptapterinae (hoje elevada a família) e os dados adicionais obtidos sobre a anatomia interna de *Phreatobius*.

A partir de um exemplar diafanizado do lote reunido por Carvalho, de Pinna (1998) revelou pela primeira vez características osteológicas que permitiram uma melhor comparação com os outros Siluriformes. O espécime analisado por De Pinna (1998) não apresentou praticamente nenhuma das sinapomorfias conhecidas para os Heptapterinae. *Phreatobius* também possui algumas características derivadas propostas para *Nemuroglanis*, um subgrupo dos Heptapterinae proposto por Ferraris (1988), tais como: o primeiro pterigióforo da nadadeira dorsal inserido posteriormente ao complexo de Weber; a ausência do acúleo da nadadeira dorsal e do mecanismo de travamento; e acúleo da nadadeira peitoral flexível e segmentado.

De Pinna (1998) revela algumas semelhanças entre *Phreatobius cisternarum* e um Clariidae basal, *Horaglanis krishnai*, o qual é grupo-irmão de todos os Clariidae de acordo com de Pinna (1993). O suspensório de ambos os táxons compartilha uma morfologia peculiar, com uma expansão posterior direcionada ventralmente. O óperculo é estreito, sendo-o mais ainda em

Phreatobius. A faceta da articulação hiomandibular com o neurocrânio é nitidamente reduzida. Baseado nestas e outras características, de Pinna (1998) especula que se *Horaglanis* agrupa com *Phreatobius*, então este último poderia ser grupo-irmão de todos os Clariidae. Todavia, pode-se especular que todas essas similaridades observadas resultem de convergência adaptativa, visto que as espécies de ambos os gêneros, *Horaglanis* e *Phreatobius*, são de hábito subterrâneo ou fossorial.

O fato é que esses trabalhos, já poucos em si, foram baseados em um número ainda menor de exemplares examinados. Apenas alguns estudos de natureza descritiva foram realizados especificamente sobre a morfologia do peixe em questão: Fuhrmann (1905), Reichel (1927), Carvalho (1967) e de Pinna (1998). Outros trabalhos discutiram ou mencionaram o táxon de forma tangencial (Myers, 1944; Myers & Weitzman, 1966; Buckup, 1988; Ferraris, 1988).

A classificação de *Phreatobius* deve ser discutida à luz de uma amostragem mais representativa da sua diversidade e com ferramentas que permitem uma amostragem taxonômica adequada para avaliar a questão do seu posicionamento filogenético.

1.5. Propostas de posicionamento de Phreatobiidae provenientes dos estudos filogenéticos anteriores

Phreatobius é, seguramente, o bagre que mais desperta a curiosidade dentre os gêneros neotropicais, em todos os aspectos da sua biologia e

sistemática. Foi classificado previamente de modo conflitante entre diversos autores, sendo aquele alocado em cinco famílias diferentes -- Trichomycteridae, Cetopsidae, Clariidae, Plotosidae, Pimelodidae (Heptapterinae) -- seja individualmente ou em combinação.

Apenas duas hipóteses geradas por métodos cladísticos incluíram *Phreatobius* no escopo de suas análises: De Pinna (1993) e Bockmann (1998).

O estudo de De Pinna (1993) estava voltado para as relações entre os Siluriformes, onde analisou 239 caracteres morfológicos de 400 espécies de bagres representantes de 33 família da ordem. A hipótese final de De Pinna (1993) foi sintetizada em 79 táxons terminais com base no monofiletismo fornecido por hipóteses anteriores. O consenso estrito das 360 árvores mais parcimoniosas está apresentado na Fig. 3.

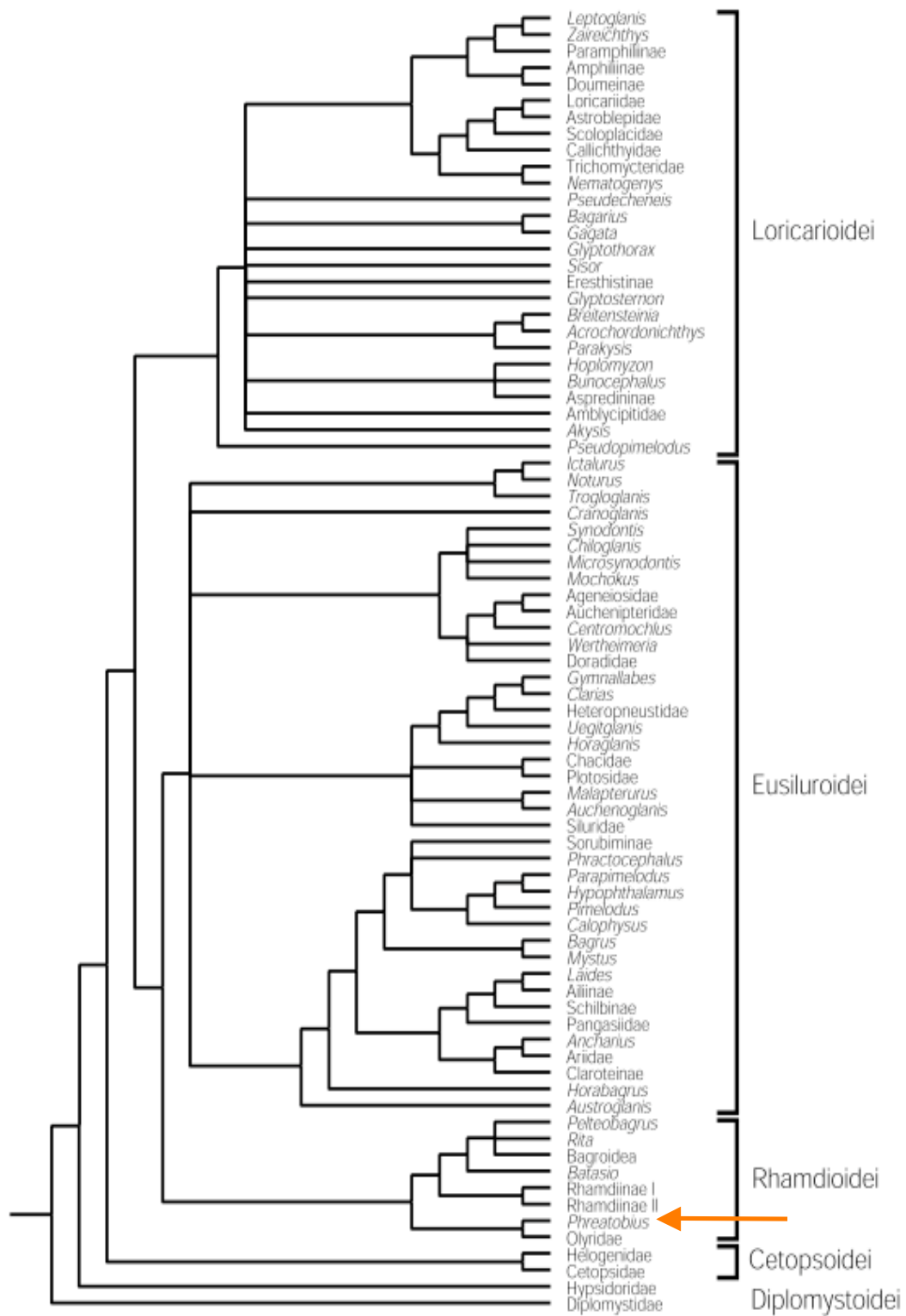


Figura 3. Árvore de consenso estrito de 360 cladogramas igualmente parcimoniosos provenientes da análise de 239 caracteres morfológicos (De Pinna, 1993)

Em sua tese de doutorado, Bockmann (1998) concentrou seus estudos nas relações filogenéticas na família Heptapteridae com base em dados morfológicos. Este é o estudo mais abrangente feito até o momento para este grupo diverso de bagres. O consenso estrito das árvores mais parcimoniosas está apresentado na Figura 1.3. O cladograma de consenso estrito de Bockmann (1998) coloca *Phreatobius* como grupo-irmão de *Gladioglanis*, incluindo-os na tribo Phreatobinii, dentro da subfamília Heptapterinae (Figura 1.3).



Figura 4. Árvore de consenso estrito de 1191 cladogramas igualmente parcimoniosos provenientes da análise de 278 caracteres morfológicos de 79 táxons terminais (Bockmann, 1998)

5. CONCLUSÕES

As conclusões desta tese estão organizadas nos dois temas propostos: filogenia e taxonomia.

Com base na análise filogenética de dados moleculares concluo que a família Phreatobiidae forma um grupo monofilético com as famílias Pseudopimelodidae e Pimelodidae. Esta hipótese difere de todas as propostas anteriores, a saber: *Phreatobius* como integrante do clado Rhamdioidei (De Pinna, 1993); *Phreatobius* como membro de Heptapteridae ou Pimelodidae (Bokmann, 1998; Reichel, 1927; Myers & Witzman, 1966, Backup, 1988); *Phreatobius* como integrante de Clariidae e Plotosidae (Fuhrmann, 1905, 1906); *Phreatobius* como integrante de Trichomycteridae e Cetopsidae (Goeldi, 1905; Eigenmann, 1918; Myers, 1944).

A hipótese de relacionamento filogenético de *Phreatobius* requer a alocação do gênero na categoria de família, Phreatobiidae, Reichel, 1927. A outra alternativa seria ampliar a abrangência de Pimelodidae para incluir *Phreatobius* e Pseudopimelodidae, no entanto teríamos que assumir reversão da maioria das sinapomorfias desses dois grupo e considerando o histórico taxonômico problemático de Pimelodidae, a proposta apresentada parece ser a mais adequada. Neste contexto, Pimelodoidea é um grupo monofilético, desde que Phreatobiidae seja incluída.

A evolução do hábito subterrâneo ocorreu múltiplas vezes entre os Siluriformes, tendo evoluído independentemente em nove famílias na ordem. A partir do mapeamento filogenético dos caracteres é possível apontar que a evolução do hábito subterrâneo ocorreu uma única vez na

família Phreatobiidae; por sua vez a ocupação do ambiente freático ocorreu duas vezes independentemente dentro de Phreatobiidae. Sendo que a espécie *Phreatobius cisternarum* (de hábito predominantemente freático) é a espécie mais basal do grupo, seguida de *P. sp. "Vuruá"* (hiporreico), esta por sua vez é grupo-irmão do clado formado por *P. sp. "Tarumanzinho"* (hiporreico) e *P. dracunculus* (freático).

Em relação à filogenia de Phreatobiidae, *Phreatobius cisternarum* é a espécie mais basal da família, a qual é grupo-irmão do clado formado por (*Phreatobius sp. "Vuruá"* (*Phreatobius dracunculus* + *Phreatobius sp. "Taruman"*)).

A análise filogenética indica que a família Phreatobiidae está composta por quatro componentes monofiléticos restritos às terras baixas da Amazônia. A família apresenta espécies de ampla distribuição, como *Phreatobius cisternarum* e *Phreatobius sp. "Tarumanzinho"*, a primeira encontrada tanto em ambientes freáticos quanto hiporreicos. As demais espécies parecem ter uma distribuição mais restrita. De acordo com topologia obtida a espécie *Phreatobius cisternarum* como grupo-irmão das demais espécies espelha o seguinte padrão de relacionamento entre as porções da bacia Amazônica: (Amazônia Oriental) relacionada ao componente (Amazônia Central + A. Ocidental).

A partir do estudo taxonômico são reconhecidas ao menos sete espécies para a família: *Phreatobius cisternarum*, *Phreatobius dracunculus*, *Phreatobius sanguijuela*, *Phreatobius sp. "Anapixi"*, *Phreatobius sp. "Jaú"*, *Phreatobius sp. "Taruman"*, *Phreatobius sp. "Vuruá"*.

6. BIBLIOGRAFIA

ALBERT, V. A. (ed.) 2005. Parsimony, phylogeny and genomics. Oxford Press, USA, 229p.

ANDRADE, L. P. 2007. Distribuição espacial e estrutural da comunidade de crustáceos de águas intersticiais de um igarapé Amazônico e um riacho da Mata Atlântica. (Tese de Doutorado não publicada), Universidade de São Paulo, São Paulo, 61p.

ARRATIA, G. & HUAQUIN, L. 1995. Morphology of the lateral line system and of the skin of diplomystid and certain primitive loricarioid catfishes and systematic and ecological considerations. *Bonner Zoologische Monographien* 36: 1-110.

BOCKMANN, F. A. 1998. Análise filogenética da família Heptapteridae (Teleostei, Ostariophysi, Siluriformes) e redefinição de seus gêneros. Tese de doutorado, Universidade do Estado de São Paulo.

BOCKMANN, F. A. & GUAZZELLI, G. M. 2003. Family Heptapteridae. In: Reis R., Kullander S.O., Ferraris Jr C.J. (Org.) Check list of the freshwater fishes of South and Central America, Edipucrs, Porto Alegre, 406-431.

BREMER, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistic*, 10: 295-304.

BRITTO, M. 2003. Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da subfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysi). (Tese de Doutorado não publicada), Universidade de São Paulo, São Paulo.

BUCKUP, P. A. 1988. The genus *Heptapterus* (Teleostei, Pimelodidae) in southern Brazil and Uruguay, with the description of a new species. *Copeia* (3): 641-653.

CARVALHO, A. L. 1967. Novos dados para o conhecimento de "*Phreatobius cisternarum*" Goeldi (Pisces, Pygidiidae, Phreatobiinae). Conselho Nacional de Pesquisas, Rio de Janeiro. Atas do simpósio sobre a Biota Amazônica. Vol. 3 (Limnologia): 83-88.

CHARDON, M. 1968. Anatomie comparée de l'appareil de Weber et des structures connexes chez les Siluriformes. Annales de Musée Royale de l'Afrique Central, série IN-80, Sciences Zoologiques, 169: 1-277.

CORGOSINHO, P. H. C., ARBIZU, P. M. & SANTOS-SILVA, E. N. 2007. Redescription of *Remaneicaris ignotus* (Dussart, 1983), a Parastenocarididae (Copepoda, Harpacticoida) with an unusual set of plesiomorphic characters. Invertebrate Zoology, 4(1): 31-34.

COSTA, M. L. 1991. Aspectos geológicos dos lateritos da Amazônia. Revista Brasileira de Geociências 21(2): 146-160.

DICKINSON, R. 1987. The Geophysiology of Amazonia: Vegetation and Climate Interactions. Wiley, New York, 526 p.

DIOGO, R. 2005. Morphological Evolution, adaptations, homoplasies, constraints and evolutionary trends: catfishes as a case study on general phylogeny and macroevolution. USA, 491p.

EDWARDS, R. T. 1998. The hyporheic zone. In River Ecology and Management. R.J. Naiman and R.E. Bilby. Springer. Pp.399-429.

EIGENMANN, C. H. 1910. Catalogue of the fresh-water fishes of tropical and South America. Pp 375-511 in Reports of The Princeton University Expeditions to Patagonia, 1896-1899, 3 (4) Princeton University & Stuttgart.

EIGENMANN, C. H. 1918. The Pygidiidae, a family of South American catfishes. Mem. Carn. Mus. 7: 259-398.

EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M.C. & GREEN, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. Genome Research 8:175-185.

FERNÁNDEZ, L. & DE PINNA, M. C. C. 2005. Phreatic catfish of the genus *Siloinichthys* from Southern South America (Teleostei, Siluriformes, Trichomycteridae). Copeia, 1: 100-108.

FERNÁNDEZ, L., SAUCEDO, L.J., CARVAJAL-VALLEJOS, F. M. & SCHAEFER, S. 2007. A new phreatic catfish of the genus *Phratobius* Goeldi 1905 from groundwaters of the Iténez River, Bolivia (Siluriforme: Heptapteridae). Zootaxa 1626: 51-58.

FERRARIS, C. 1988. Relationships of the Neotropical catfish genus *Nemuroglanis*, with a description of a new species (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). Proc. Biol. Soc. Wash. 101 (3): 509-516.

FINK, S. V., FINK, W. L. 1981. Interrelationships of the ostariophysan fishes (Pisces, Teleostei). Zool. J. Linnean Soc., 72: 297-353.

FINK, S. V., FINK, W. L. 1996. Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). In: Stiassny, M., Parenti, L. R., Johnson, G. D. (Eds.). Interrelationships of fishes. Academic Press, New York, 209-249p.

FORSBERG, B. R.; DIAZ, G.D.; CARGNIN-FERREIRA, E & ROSENQVIST, A. 2001. The structure and function of the Negro River Ecosystem: insights from the Jaú Project. In: Ed.: CHAO, N.L. Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazônia, Brasil-Project Piaba, Manaus: Ed. Universidade do Amazonas, 310p.

FRIEL, J. P. & LUNDBERG, J. G. *Micromyzon akamai*, Gen. et Sp. Nov., a small and eyeless banjo catfishes (Siluriformes: Aspredinidae) from the river channels of the lower Amazon basin. *Copeia*, 3: 641-648.

FUHRMANN, O. 1905. *Phreatobius cisternarum*. Compte rendu des travaux, quatre-vingt-huitième de la Société Helvétique des Sciences Naturelles, Lucern, 68-69.

FUHRMANN, O. 1906. *Scleropages formosum* und über *Phreatobius cisternarum*. Verhandlungen der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft, 88th meeting. H. Keller, Luzern, 50-51.

GIBERT, J., DANIELOPOL, D. L. & STANFORD, J. A. 1994. *Groundwater Ecology*. Academic Press, Inc, 571p.

GEERTZ, C. 1989. *A interpretação das culturas*. Rio de Janeiro, LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.

GIANFERRARI, L. 1923. *Uegitglanis zammaranoi* un nuovo Siluride cieco africano. Atti della Società Italiana di Scienze Naturali e del Museo Civico di Storia Naturale in Milano, volume LXII: 1-4.

GOELDI, E. 1905. Nova zoologica aus der Amazonas-Region. Neue Wirbeltiere. *Compte-Rendu du Sixième Congrès International de Zoologie*, Genève.

GOULD, S. J. 1977. *Ontogeny and phylogeny*. USA, 501p.

GORDON, D., ABAJIAN, C. & GREEN, P. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research* 8:195-202.

GOSLINE, W. A. 1945. Catálogo dos Nematognatos de água-doce da América do Sul e Central. Bol. Mus. Nac., Sér. Zool., 33: 1-138.

GRAHAM, J. B. 1997. Air-Breathing Fishes. Academic Press, San Diego.

GREEN, P. 1994. Phrap, unpublished.

GUIDON, S. & GASCUEL, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large Phylogenies by maximum likelihood. Systematic Biology 52(5): 696-704.

HALL, T. A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.

HARDMAN, M. 2004. The phylogenetic relationships among *Noturus* catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) as inferred from mitochondrial gene cytochrome b and nuclear recombination activating gene 2. Molecular Phylogenetics and Evolution 30: 395-408.

HARDMAN, M. & LUNDBERG, J. 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, J. 2006. Molecular phylogeny and a chronology of diversification for "phractocephaline" catfishes (Siluriformes: Pimelodidae) based on mitochondrial DNA and nuclear recombination activating gene 2 sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, 40(2): 410-418.

HENDERSON, P. A. & WALKER, I. 1990. Spatial organization and population density of the fish community of the litter banks within a central

Amazonian blackwater stream. *Journal of Fish Biology* 37: 401-411.

HUMPHREYS, W. F. Rising from down under: developments in subterranean biodiversity in Australia from a groundwater fauna perspective. *Invertebrate Systematics*, 22: 85-101.

LATRAP, D.W. 1970. *The Upper Amazon Basin*. Thames and Hudson Publishers, London, 256 p.

LATRUBESSE, E.M., STEVAUX, J.C., SANTOS, M. & ASSINE, M. 2005. Grandes Sistemas Fluviais: geologia, geomorfologia e paleoidrologia. Capítulo 13. *In: Souza, C.R.G., Suguio, K., Oliveira, A.M.S., Oliveira, P.E. (eds). Quaternário do Brasil*. Editora Holos, Ribeirão Preto, 382p.

LIEM, K., BEMIS, W. E., WALKER Jr., W. F. & GRANDE, L. 2001. *Functional Anatomy of the vertebrates - an evolutionary perspective*. 3a. ed. Thomson, USA, 703 p.

LUNDBERG, J. G. & Friel, J. P. 2003. Siluriformes. Catfishes. Version 20 January 2003 (under construction). <http://tolweb.org/Siluriformes/15065/2003.01.20> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>

LUNDBERG, J. G. & RAPP PY-DANIEL, L. 1994. *Bathycetopsis oliveirai*, Gen. et Sp. Nov., a blind and depigmented catfishes (Siluriformes: Cetopsidae) from Brazilian Amazon. *Copeia*, 2: 381-390.

MALLINOWSKI, B. 1986. *Argonautas do pacífico*. Col. Pensadores. São Paulo: Abril.

MOYER, G.R., BURR, B.M. & KRAJEWSKI, C. 2004. Phylogenetic relationships of thorny catfishes (Siluriformes: Doradidae) inferred from molecular and morphological data. *Zoological Journal of the Linnean Society* 140: 551-575.

MULLIS, K. 1987. US Patent 4.683.202 Process for amplifying nucleic acid sequences.

MUÑOZ-TORRES, F.A., WHATLEY, R.C., VAN HARTEN, D. 2006. Miocene ostracod (Crustacea) biostratigraphy of the upper Amazon Basin and evolution of the genus *Cyprideis*. *Journal of South American Earth Sciences* 21: 75–86

MURIEL-CUNHA, J. & DE PINNA, M. 2005. New data on cistern catfish, *Phreatobius cisternarum*, from subterranean waters at the mouth of the Amazon river (Siluriformes, *Incertae sedis*). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 45 (26): 327-339.

MYERS, G. S. 1944. Two extraordinary new blind nematognath fishes from the Rio Negro, representing a new subfamily of Pygidiidae, with a rearrangement of the genera of the family and illustrations of some previously described genera and species from Venezuela and Brazil. *Proceedings of California Academy of Science*, 23: 591-602.

MYERS, G. S. & WEITZMAN, S. H. 1966. Two remarkable new trichomycterid catfishes from the Amazon basin in Brazil and Colombia. *Journal of Zoology* 149: 277-287.

NELSON, J. S. 2006. *Fishes of the world*. 4th ed. USA, 601p.

NIXON, K. The Parsimony Ratchet, a New Method for Rapid Parsimony Analysis. *Cladistic*, 15: 407-414.

ORGHIDAN, T. 1955. Un nou domeniu de viata acvatica subterana: Biotopul hiporeic. *Bul. Stiint. Sect. Biol. Stiinte Agric. Sect. Geol. Geogr*, 7(3): 657-676.

PINNEKER, E. V. 1983. General Hidrogeology. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.

De PINNA, M.C.C. 1998. Phylogenetic relationships of neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. In L. R. Malabarba, R. E. Reis R. P. Vari, Z. M. Lucena, and C.A.S. Lucena (eds.), Phylogeny and classification of Neotropical fishes. EDIPUCRS, Porto Alegre, p.279-330.

DE PINNA, M.C.C., FERRARIS, C.J. & VARI, R.P. 2007. A phylogenetic study of the neotropical catfish family Cetopsidae (Osteichthyes, Ostariophysi, Siluriformes), with a new classification. Zoological Journal of Linnean Society, 150: 755-813.

PROUDLOVE, G. S. 2006. Subterranean fishes of the world (An account of the subterranean (hypogean) fishes described up to 2003 with a bibliography 1541-2004. International Society for Subterranean Biology, 300p.

PUTZER, H. 1984. The geological evolution of the Amazon basin and its mineral resources. In: Sioli, H. (Ed.), The Amazon Limnology and Landscape Ecology and its Basin. W. Junk Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 15-46

REICHEL, M. 1927. Etude anatomique du *Phreatobius cisternarum* Goeldi, silure aveugle du Brésil. Revue Suisse Zoologie 34 (16): 285-403.

ROBERTS, T. R. & STEWART, D. J. 1976. An ecological and systematic survey of fishes in the rapids of the lower Zaïre or Congo river. Bulletin of the Museum of Comparative Zoology, 147 (6): 239-317.

RÜBER, L., KOTTELAT, M., TAN, H. H., NG, P. K. L & BRITZ, R. Evolution of miniaturization and phylogenetic position of *Paedocypris*, comprising the world's smallest vertebrate. BMC Evolutionary Biology, 7(38):1-10.

SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. & ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restrictions site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 30: 1350-1354.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York.

SANGER, F., NICHLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 5463 - 5468.

SBORDONI, V., ALLEGRUCCI, G. & CESARONI, D. 2000. Population genetic structure, speciation and evolutionary rates in cave-dwelling organisms. *In: Wilkens, H., Culver, D. C. & Humphreys, W. F. eds., Subterranean Ecosystems, Ecosystems of the world 30. Chapter 24, Amsterdam, Elsevier, p.453-477.*

SHIBATTA, O.A., MURIEL-CUNHA, J. & DE PINNA, M.C.C. 2007. A new subterranean species of *Phreatobius* Goeldi, 1905 (Siluriformes, *Incertae sedis*) from the Southwestern Amazon basin. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 47(17): 191-201.

SIMMONS, M.P., PICKETT, K.M., MIYA, M. How meaningful are Bayesian support values? *Molecular Biology and Evolution*, 21(1): 188-199.

STANFORD, J. A. & WARD, J. V. The hyporheic habitat of river ecosystems. *Nature*, 335(1): 64-66.

SULLIVAN, J. P., LUNDBERG, J. G. & HARDMAN, M. 2006. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using RAG-1

and RAG-2 nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 41: 636-662.

TRAJANO, E. 1997. Synopsis of Brazilian troglomorphic fishes. *Mém. Biospéol.*, 24: 119-126.

TRAJANO, E. 2001. Ecology of subterranean fishes: an overview. *Environmental Biology of Fishes*, 62: 133-160.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.

VENKATESH, B., NING, Y. & Brenner, S. 1999. Late changes in spliceosomal introns define clades in vertebrate evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 10267-10271.

VENKATESH, B., ERDMANN, M.V. & BRENNER, S. 2001. Molecular synapomorphies resolve evolutionary relationships of extant jawed vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(20): 11382-11387.

WALKER, I. 2001. The pattern of distribution of two sibling species *Euryrhynchus amazonensis* and *E. burchelli* (Decapoda, Palaemonidae) in the Central Amazonian blackwater stream TARUMÁ-Mirim, and the problem of coexistence. *Amazoniana*, XVI(3/4): 565-578.

WEITZMAN, S. H & VARI, R. P. 1988. Miniaturization in South American freshwater fishes: an overview and discussion. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 101: 444-465.

WILLETT, C.E., CHERRY, J.J. & STEINER, L.A. 1997. Characterization and expression of the recombination activating genes (rag1 and rag2) of zebrafish. *Immunogenetics* 45: 394-404.

WILLIAMS, D. D. 1993. Nutrient and flow vector dynamics at the hyporheic/groundwater interface and their effects on the interstitial fauna. *Hydrobiologia*, 251: 185-198.