

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FAMÍLIA PARODONTIDAE (TELEOSTEI, CHARACOIDEI)
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E ESTUDO DAS RELAÇÕES
FILOGENÉTICAS ENTRE ESPÉCIES

BEATRIZ FERREIRA DORINI

BOTUCATU-SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)

FAMÍLIA PARODONTIDAE (TELEOSTEI, CHARACOIDEI) IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E ESTUDO DAS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE ESPÉCIES

Discente: Beatriz Ferreira Dorini

Orientador: Dr. Claudio de Oliveira

Co-orientador: Dr. Bruno Francelino de Melo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como rte dos requisitos para a obtenção do título de Mestrado.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Dorini, Beatriz Ferreira.

Família Parodontidae (TELEOSTEI, CHARACOIDEI) :
identificação molecular e estudos das relações filgenéticas
entre as espécies / Beatriz Ferreira Dorini. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Claudio Oliveira
Coorientador: Bruno Francelino de Melo
Capes: 20204000

1. Biodiversidade. 2. Código de Barras de DNA Taxonômico.
3. Filogenia. 4. Peixes. 5. Zoologia - Classificação.

Palavras-chave: Biodiversidade; DNA Barcode; Filogenia; Peixes;
Taxonomia.

AVISO

Esta dissertação é parte dos requerimentos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Zoologia, e como tal, não deve ser vista como uma publicação no senso do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (apesar de disponível publicamente sem restrições). Desta forma, quaisquer informações inéditas, opiniões e hipóteses, bem como nomes novos, mudanças taxonômicas não estão disponíveis na literatura zoológica. Pessoas interessadas devem estar cientes de que referências públicas ao conteúdo deste estudo, em sua presente forma, somente devem ser feitas com a aprovação prévia do autor.

NOTICE

This thesis is a partial requirement for the master degree in Biological Sciences with emphasis in Zoology and, as such, should not be considered as a publication in the sense of the International Code of Zoological Nomenclature (although it is available without restrictions). Therefore, any new information, opinions, and hypotheses, as well as new names, taxonomic changes are not available in the zoological literature. Interested people are advised that any public reference to this study, in its current form, should only be done after previous acceptance of the author.

Esta pesquisa foi financiada com recursos do
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, (CNPQ) -
Processo Número: 130331/2021-0 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do
Estado de São Paulo - Processo Número: 2020/13433-6

*“It is those who know little, and not those who know much,
who so positively assert that this or that problem
will never be solved by science.”
(Charles Darwin).*

À vida

AGRADECIMENTOS

Deixo meus sinceros agradecimentos às instituições e pessoas que de forma direta ou indireta, contribuíram para a concretização deste trabalho.

Ao auxílio financeiro concedido pelo processo
130331/2021-0 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, (CNPQ).

Ao Prof. Dr. Claudio de Oliveira, pela orientação acadêmica em todas as fases da minha vida até agora, pela paciência e dedicação.

Ao Dr. Bruno F. Melo pela orientação, carinho, suporte, amizade e motivação diária.

À Dr. Camila Souza e Dr. Nadayca Mateussi pelo carinho e amizade e por me auxiliarem durante esse processo compartilhando conhecimentos.

À Dr. Rafaela Ota e ao Dr. Vanessa Paes pela disposição, compreensão e por todos os ensinamentos que sei que dividirão comigo nessa etapa final.

A todos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, em especial a Ailton Ariza, Beatriz Boza, Fabio Roxo, Gabriel Costa e Silva, Lais Reia, Larissa Mantuanelli, Luis Ricardo Silva, Mariana Kuranaka, Njala Jolie, Silvana Melo, por todos os momentos de descontração, incentivo e colaboração.

As grandes parceiras de trabalho e de vida Aisni Mayumi e Giovana Ribeiro que seguraram minha mão durante esse período cheio de surpresas difíceis, esse trabalho não teria chegado até aqui sem elas.

As minhas tias, Nádia, Crê e Thida por sempre cuidarem de mim com amor, chatice e carinho.

Ao Thiago Durante minha eterna gratidão pelo companheirismo e por sempre acreditar em mim, muitas vezes mais do que eu mesma.

Aos meus irmãos, Anna Luisa e Pedro Henrique que são a razão para que eu siga minha caminhada, meu motivo de orgulho e dedicação, hoje e sempre.

A minha mãe, Odete, que é a fonte de inspiração na minha vida, o que me mantém firme mesmo quando acho que não posso mais seguir, pelo amor e luz que ela traz todos os dias em minha vida.

E finalmente, a minha avó, dona Alice, que partiu no ultimo dia 27 e levou com ela um enorme pedaço do meu coração, pelos eternos ensinamentos, pela leveza no cantar e cuidar de mim. Que aonde quer que ela esteja espero que ela saiba que eu não desisti.

RESUMO

Parodontidae pertence à ordem Characiformes e é amplamente distribuída nas terras altas da América do Sul e parte do Panamá. A família é composta por 32 espécies de pequeno porte popularmente conhecidas como “canivete” ou “charutinho”, entre outros. Apesar de sua morfologia possuir alguma diversidade, não há, até o momento, hipóteses de relacionamento incluindo uma significativa representatividade de espécies de Parodontidae usando caracteres moleculares. O presente projeto tem como objetivo compreender melhor as relações filogenéticas presentes na família Parodontidae, abordando de forma abrangente os três gêneros *Apareiodon*, *Parodon* e *Saccodon*. Para isso, realizamos a identificação molecular através do DNA barcode com sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI). Os resultados das análises apresentam *Saccodon dariensis* em duas linhagens, onde *S. dariensis* da Colômbia é uma espécie e *S. dariensis* do Panamá outra linhagem. *Apareiodon* apresentou 16 clados apresentando um cenário taxonômico complexo, relacionando-se de diversas formas ao longo da árvore, em *Parodon* oito linhagens foram estabelecidas, dentro de quatro grandes grupos na árvore. Embora mais espécies e genes precisem ser estudados, os resultados suportam a hipótese de que *Apareiodon* e *Parodon* não são grupos monofiléticos e apontam para a necessidade de uma revisão desses gêneros. Os resultados contribuirão para ampliação do conhecimento sobre diversidade, filogenia e os processos evolutivos envolvidos na diversificação das espécies de Parodontidae.

PALAVRAS-CHAVE: DNA Barcode, Biodiversidade, Filogenia, Sistemática, Taxonomia, Peixes.

ABSTRACT

Parodontidae belongs to the order Characiformes and is widely distributed in the highlands of South America and part of Panama. The family is made up of 32 small species popularly known as “scrapetooths”, among others. Despite its morphology having some diversity, there are, so far, no hypotheses of a relationship including a significant representation of Parodontidae species using molecular characters. This project aims to better understand the phylogenetic relationships present in the Parodontidae family, comprehensively addressing the three genera *Apareiodon*, *Parodon* and *Saccodon*. For this, we performed molecular identification through DNA barcode with sequences of the mitochondrial gene cytochrome c oxidase subunit I (COI). The analysis results present *Saccodon dariensis* in two lineages, where *S. dariensis* from Colombia is one specie and *S. dariensis* from Panama another. *Apareiodon* presented 16 clades a complex taxonomic scenario, relating in different ways along the tree, *Parodon* eight lineages were established, within four major groups in the tree. Although more species and genes need to be studied, the results support the hypothesis that *Apareiodon* and *Parodon* are not monophyletic groups and point to the need for a revision of these genera. These results will contribute to the expansion of knowledge about diversity, phylogeny and the evolutionary processes involved in the diversification of Parodontidae species.

Keywords: DNA Barcode, Biodiversity, Systematics, Taxonomy, Fish.

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	7
RESUMO	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO GERAL.....	13
JUSTIFICATIVA	19
OBJETIVOS.....	20
BIBLIOGRAFIA.....	21
Chapter 1	24
Abstract.....	25
1.Introduction.....	26
4. Bibliography	39
5. Supplementary information.....	42

INTRODUÇÃO GERAL

Characiformes

A ordem Characiformes é composta atualmente por 24 famílias, com cerca de 2.330 espécies válidas (Fricke et al., 2022), possuem ampla distribuição geográfica, pelas drenagens da África subsaariana, América do Sul (exceto região sul da Argentina e Chile), América Central, México e o sul dos Estados Unidos (Reis et al., 2003). Representada por espécies de diversos tamanhos, desde miniaturas (sensu Weitzman e Vari, 1988), como algumas espécies de Crenuchidae, Cheirodontinae e Lebiasinidae, mas também com espécies de grande porte, às quais é atribuída grande importância econômica relacionada à pesca e piscicultura (e.g. *Brycon*, *Salminus*, *Piaractus*, *Leporinus*, *Prochilodus*). Peixes dessa ordem são caracterizados, morfológicamente, em sua grande maioria por possuírem escamas cobrindo todo o corpo, com exceção da cabeça; presença de nadadeira adiposa; raios das nadadeiras moles e prémaxilar fixado ao crânio (Oyakawa et al., 2006).

Parodontidae

A família Parodontidae (Eigenmann, 1910) é formada por um grupo de peixes neotropicais reunidos em três gêneros: *Parodon* Valenciennes, 1849, *Saccodon* Kner, 1863 e *Apareiodon* Eigenmann, 1916, com 28 espécies válidas sendo destas 15 pertencentes ao gênero *Apareiodon*, 11 ao gênero *Parodon* e três ao gênero *Saccodon*. (Pavanelli, 2003; Pavanelli & Britski, 2003; Ingenito e Buckup, 2005; Pavanelli et al., 2006, 2007).

A família Parodontidae é um grupo de peixes neotropicais formada por um grupo relativamente pequeno de espécies, sustentada por poucos e sutis caracteres morfológicos diagnósticos (Pavanelli, 2003), com ampla distribuição em rios de quase toda a América do Sul e

parte do Panamá, exceto em algumas bacias costeiras, Patagônia e a calha principal do Rio Amazonas (Pavanelli, 2003). *Saccodon* possui uma distribuição mais restrita ao norte do continente sul-americano, sendo encontrado em bacias costeiras no Panamá, Colômbia e Equador (Roberts, 1974). Seus indivíduos geralmente não ultrapassaram 20 cm de comprimento, tratando-se de peixes fusiformes com a face ventral do corpo plana, e conhecidos popularmente como “peixes-canivete” ou “peixe-charuto” em português ou “scrapetooths” em inglês. Frequentemente encontrados em águas com correnteza, onde, auxiliados pelas nadadeiras peitorais, se mantêm próximos ao substrato onde se alimentam principalmente de organismos que ali se desenvolvem (Nakatani *et al.*, 2001; Pavanelli *et al.*, 2015).

As espécies desta família têm como característica de diagnose, para diferenciação dos demais Characiformes a ausência de lábio superior, e apresentam: dentes pré-maxilares ligados frouxamente ao osso pré-maxilar, dentes mandibulares quando presentes localizados na região lateral da abertura bucal ângulo-articular, dobrado sobre a margem dorsal da parte posterior do dentário, cobrindo parcialmente suas faces medial e lateral, e abertura dorsal da fossa pós-temporal delimitada somente pelo parietal e epoccipital (Pavanelli, 2003; Ingênito *et al.*, 2008). Os aspectos morfológicos diagnósticos entre as espécies em Parodontidae se dão principalmente pela variação no número de raios não-ramificados nas nadadeiras peitorais e pelo padrão de cores com uma faixa longitudinal preta/escura regular ou várias faixas escuras verticais, além da forma e número das cúspides dentais adjacentes ao dente sinfisário pré-maxilar, que também podem ser usados na identificação de espécies (Pavanelli, 2003).

Pesquisadores têm questionado a separação dos gêneros *Parodon* e *Apareiodon* (Pavanelli & Britski, 2003; Ingenito & Buckup, 2005; Vicari *et al.*, 2006). Esse questionamento se dá pela ausência de caracteres diagnósticos determinantes, decorrendo em problemas na classificação das espécies. *Saccodon* corresponde a um grupo monofilético (Starnes & Schindler, 1993; Moreira, 2007; Ingenito, 2008), sendo, portanto, considerado grupo-irmão dos demais Parodontidae. Ao estudar as relações filogenéticas de Characiformes, Moreira (2007), examinou exemplares de três

espécies de Parodontidae, uma de cada gênero (*Apareiodon piracicabae*, Eigenmann, 1907, *Parodon nasus* Kner, 1859 e *Saccodon wagneri* Kner, 1863). Os resultados desse autor são compatíveis com a hipótese de Starnes & Schindler (1993), sugerindo que *Saccodon* é grupo irmão de *Parodon* e *Apareiodon*. Contudo, foram examinados apenas três exemplares diafanizados, um de cada gênero, o que pode ser uma subestimação da variedade morfológica de Parodontidae, não podendo garantir que essas relações filogenéticas sejam realmente as relações intergenéricas estabelecidas (Moreira, 2007).

Em um estudo utilizando o método cladístico de parcimônia para análise filogenética (Ingênto, 2008), foram analisados caracteres osteológicos e de morfologia externa das 28 espécies válidas de Parodontidae, uma espécie não descrita de *Parodon*, e 17 espécies de Characiformes como grupo externo. O estudo encontrou *Saccodon* como um grupo irmão dos demais Parodontidae, sendo o gênero *Apareiodon* sinônimo júnior de *Parodon*. O mesmo estudo demonstrou que a presença de dentes mandibulares para diagnosticar grupos monofiléticos é ineficaz, pois grupos definidos por este caracter são polifiléticos, e relatou também que em diversas espécies de *Parodon* a ocorrência de dentes mandibulares varia intra-especificamente, *Parodon* e *Apareiodon* aparecem mesclados ao longo do cladograma gerado por caracteres morfológicos, indicando que estes grupos não são monofiléticos (Ingenito, 2008).

Estudos realizados com seqüências de DNA mitocondrial D-loop de espécies de *Parodon* e *Apareiodon* utilizando análise de parcimônia, mostraram a ocorrência de dois clados, um com espécies do gênero *Apareiodon* subdividida em dois subclados bem apoiados, e outro com apenas espécies do gênero *Parodon* sem subdivisões internas com valores de suporte significativo, sugerindo uma especiação recente entre as espécies *P. moreirai* e *P. nasus* (Silva, 2009). Bellafronte *et al.* (2013) conduziram um estudo usando DNA *barcoding* no qual foram utilizados exemplares de *Apareidon affinis* Steindachner, 1879 *A. ibitiensis* Amaral Campos, 1944, *A. piracicabae* – Eignmann, 1907, *A. vitattus* – Garavello, 1977, *A. vladii* – Pavanelli, 2006, *A. sp.*, *Paradon moreirai* - Ingenito & Buckup, 2005 e *P. nasus* - Kner, 1859. Os resultados indicam

Apareiodon sp. e *A. ibitiensis* como espécies distintas, e que amostras de *A. affinis* dos rios Uruguai e Paraguai apresentaram 0,3% de divergência genética, indicando um maior grau de relação entre elas. No entanto, esses exemplares divergiram em 6,1% em relação aos exemplares do alto rio Paraná, o que indica que estes últimos representam uma espécie potencialmente nova. Os resultados desse estudo apontam a eficácia do uso de abordagens moleculares para a delimitação de espécies que morfologicamente apresentam características muito similares (Bellafronte et al., 2013). No entanto, o estudo incluiu 22% da diversidade de espécies da família, sugerindo a necessidade de um estudo de delimitação de espécies com maior representatividade de táxons.

Em um recente estudo citogenético e molecular em *Apareiodon*, foram estudadas as espécies *Apareiodon machrisi* Travassos, 1957, *A. cavalcante* Pavanelli & Britski, 2003, e *Apareiodon* sp (Traldi et al., 2020). Os resultados citogenéticos mostraram um número diplóide compartilhado de 54 cromossomos, e, apesar de nenhum cromossomo sexual heteromórfico ter sido detectado, os autores encontraram várias particularidades nos cromossomos das diferentes espécies (Traldi et al., 2020). Os dados gerados indicaram a ocorrência de divergência parapátrica recente entre *A. cavalcante* e *A. machrisi* enquanto *Apareiodon* sp. 1 poderia ser uma linhagem relacionada a *A. machrisi*, possivelmente tendo passado por um processo incipiente de especiação. Os dados sugeriram ainda que possivelmente *Apareiodon* sp. 2 seria uma nova espécie (Traldi et al., 2020).

Tendo em vista todos esses aspectos acerca de Parodontidae, fica evidente a necessidade de se estudar os gêneros geneticamente buscando evidências moleculares que, junto com características morfológicas, podem solucionar as questões que permanecem a despeito da família. Espécies de *Saccodon* foram estudadas por Pavanelli & Starnes (2015), e podem ser diferenciados morfologicamente entre si, através de algumas características como: *S. dariensis* (Meek & Hildebrand, 1913) possui 12 escamas circumpedunculares (raramente 14), estão distribuídas no Panamá, a leste do Canal e bacias de Bayano, Atrato e Rio Magdalena na Colômbia. Enquanto *S. terminalis* (Eigenmann & Henn, 1914), que apresenta a boca em posição mais terminal, a distância

entre focinho e maxilar é de 10-13% do comprimento da cabeça, focinho possui comprimento de 25-30% do comprimento da cabeça e está distribuída no rio Dalé, Equador. Em *S. wagneri* (Kner, 1863) tem a boca em posição inferior, distância entre focinho e comissura maxilar de 16-28% do comprimento da cabeça, focinho mais longo com comprimento 30-40% da cabeça, e é distribuída na bacia de Rio Dale, bacias costeiras do Equador e extremo norte do Peru (Pavanelli & Starnes, 2015).

As características morfológicas em *Saccodon* foram bem elucidadas por Pavanelli & Starnes (2015), mas uma análise com um número maior de táxons usando dados moleculares podem detalhar as relações interespecíficas no gênero. Mais recentemente, um estudo citogenético realizado com *Saccodon wagneri* apontou que essa espécie apresenta número cromossômico diploide de $2n=54$ e a presença de cromossomos sexuais heteromórficos do tipo ZZ/ZW (Nirchio *et al.*, 2021). Esses dados reforçam a hipótese de estrutura cariotípica conservada em Parodontidae e sugerem uma origem ancestral dos cromossomos sexuais nos peixes desta família (Nirchio *et al.*, 2020).

DNA Barcode

Estudos baseados em identificação molecular usando a metodologia DNA *barcode* (Hebert *et al.*, 2003) tem revelado números subestimados de espécies antes não reconhecidas e vem se mostrando resolutivos para questões taxonômicas em diferentes grupos de peixes neotropicais, tais como Characidae (Pereira *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013, Barreto *et al.*, 2018), Lebiasinidae (Benzaquem *et al.*, 2015), Loricariidae (Costa-Silva *et al.*, 2015; de Borba *et al.*, 2019; Fagundes *et al.*, 2020), Serrasalminidae (Machado *et al.*, 2018; Ota *et al.*, 2020) e Curimatidae (Melo *et al.*, 2016b). Como exemplo, Ochoa *et al.* 2008, estudaram 208 espécimes do gênero *Astroblepus*, seus resultados indicaram 25 linhagens, oito espécies válidas e mais 17 espécies ainda não descritas, distribuídas em dois grupos monofiléticos, em diversas drenagens da América do Sul (Ochoa *et al.*, 2008).

Melo *et al.* (2016) estudaram 51 espécimes de *Curimatopsis* de diversos rios das drenagens do Amazonas, Paraguai e Suriname, e o estudo obteve dados de quatro espécies conhecidas e outras sete espécies crípticas, relacionando o DNA *barcode* com o habitat dos organismos e auxiliando o entendimento filogenético em Curimatidae. Assim como esses, outros estudos já comprovaram a eficácia do uso do DNA *barcode* como ferramenta para o auxílio do entendimento nas relações inter e intra específicas em diversas espécies. Portanto, o uso dessa técnica pode então, ser promissor para Parodontidae, possivelmente revelando uma diversidade ainda não reconhecida, uma vez que há poucos estudos de identificação molecular para a família. Com isso, o DNA *barcode* foi utilizado no presente estudo de Parodontidae a fim de elucidar as unidades taxonômicas e compreender melhor as relações dentro da família.

JUSTIFICATIVA

Existem vários aspectos acerca da sistemática de Parodontidae que ainda permanecem sem resolução, que podem ser assim sumarizados: 1) a monofilia dos gêneros de Parodontidae não é bem estabelecida; 2) as relações interespecíficas em cada um dos gêneros não está resolvida; 3) a possibilidade de polifilia de *Apareidon* e parafilia de *Parodon* permanece sem resolução; 4) a delimitação de espécies baseada em dados moleculares, que levaria à construção de hipóteses filogenéticas mais completas/robustas, ainda não foi conduzida para a grande maioria das espécies. Há ainda o aspecto taxonômico que não foi devidamente aprofundado nos gêneros de Parodontidae que também poderiam ser mais bem esclarecidos com a identificação molecular de espécies, seguidas pela construção de árvores filogenéticas. Finalmente, os recentes avanços na sistemática molecular com a utilização de supermatrizes em escala genômica tem proporcionado uma ótima oportunidade para obter filogenias mais robustas, e sua consequente utilização em estudos macroevolutivos tem permitido estudar, entre outras coisas, o tempo e modo de diversificação de espécies.

OBJETIVOS

Baseando-se nas hipóteses prévias de relacionamentos intergenéricos e interespecíficos da família Parodontidae, o presente projeto teve como objetivos:

- 1) Estudar a diversidade molecular interespecíficas em Parodontidae;
- 2) Realizar a delimitação de espécies em Parodontidae;
- 3) Criar um banco genético para permitir uma identificação molecular dos exemplares estudados.

BIBLIOGRAFIA

- Alda, F., Tagliacollo, V.A., Bernt, M.J., Waltz, B.T., Ludt, W.B., Faircloth, B.C., Alfaro, M.E., Albert, J.S., Chakrabarty, P. (2019). Resolving deep nodes in an ancient radiation of neotropical fishes in the presence of conflicting signals from incomplete lineage sorting. *Systematic Biology*, 1–21, DOI:10.1093/sysbio/syy085
- Alfaro, M.E., Faircloth, B.C., Harrington, R.C., Sorenson, L., Friedman, M., Thacker, C.E., Oliveros, C.H., Černý, D., Near, T.J. (2018). Explosive diversification of marine fishes at the Cretaceous–Palaeogene boundary. *Nature Ecology & Evolution*, 2(4), pp.688–696.
- Bellafronte, E.; Mariguela, T.C; Pereira, L.H.G; Oliveira, C.; Moreira-Filho, O. (2013). DNA barcode of Parodontidae species from the La Plata river basin - Applying new data to clarify taxonomic problems. *Neotropical Ichthyology*. 11(3):497–506.
- Britski, H.A. (1972). Peixes de água doce do Estado de São Paulo. Sistemática. In: Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguaí. Poluição e Piscicultura. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP.
- Burress, E.D., Alda, F., Duarte, A., Loureiro, M., Armbruster, J.W., Chakrabarty, P. (2018). Phylogenomics of pike cichlids (Cichlidae: Crenicichla): the rapid ecological speciation of an incipient species flock. *Journal of evolutionary biology*, 31(1), pp.14–30.
- Chakrabarty P, Faircloth BC, Alda F, Ludt WB, McMahan CD, Near T J. et al. 2017. Comparative systematics of Ostariophysan fishes with a focus on the perplexing characins (Ostariophysi:Characiformes) using ultraconserved elements, traditional genes, and morphology. *Syst Biol* doi:10.1093/sysbio/syx038.
- Edgar RC, Drive RM, Valley M. 2004. MUSCLE : multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. 32, 1792–1797.
- Faircloth BC, Glenn TC. 2012. Not all sequence tags are created equal: Designing and validating sequence identification tags robust to indels. *PLoS ONE* 7: e42543.
- Fricke, R., Eschmeyer, W. N. & Fong, J. D. 2020 ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES: GENERA/SPECIES BY FAMILY/SUBFAMILY. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Electronic version accessed 12/01/2021.
- Friedman, M., Feilich, K.L., Beckett, H.T., Alfaro, M.E., Faircloth, B.C., Černý, D.,

Miya, M., Near, T.J., Harrington, R.C. (2019). A phylogenomic framework for pelagiarian fishes (Acanthomorpha: Percomorpha) highlights mosaic radiation in the open ocean. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1910), p.20191502.

Garavello, J.C. (1977). Descrição de *Apareiodon vittatus* sp. n. do rio Iguaçu e comentários sobre as espécies do gênero *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (Ostariophysi, Parodontidae) *Revista Brasileira de Biologia*. 37:447-455.

Harrington, R.C., Faircloth, B.C., Eytan, R.I., Smith, W.L., Near, T.J., Alfaro, M.E., Friedman, M. (2016). Phylogenomic analysis of carangimorph fishes reveals flatfish asymmetry arose in a blink of the evolutionary eye. *BMC Evolutionary Biology*, 16(1), p.224.

Harvey MG, Smith BT, Glenn TC, Faircloth BC, Brumfield RT. 2016. Sequence capture versus restriction site associated DNA sequencing for shallow systematics. *Syst Biol* 65(5), 910-924.

Ingenito, L.F.S.; Buckup, P.A. (2005). A new species of *Parodon* from the Serra da Mantiqueira, Brazil (Teleostei: Characiformes: Parodontidae). *Copeia*. 5:765-771.

Ingenito, L.F.S. (2008). Análise filogenética da família Parodontidae (Teleostei, Characiformes).

Oyakawa, K., Didarul, I. M., & Yaga, M. (2006). Fluid flow and infrared image analyses on endwall fitted with short rectangular plate fin. *Journal of Thermal Science*, 15, 145-151.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16(2), 111-120.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870-1874

Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870-1874

Pavanelli, C. S. 2003. Family Parodontidae (Parodon-tids). Pp: 46-50 in: R. E. Reis et al. (eds), Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre.

Pavanelli, Carla Simone, and Wayne C. Starnes. "Revision of the trans-Andean scrapetooths genus *Saccodon* (Ostariophysi: Characiformes: Parodontidae)." *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 26 (2015): 193-207.

Pons, J., Barraclough, T.G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D.P., Hazell, S.,

- Kamoun, S., Sumlin, W.D. & Vogler, A.P. (2006). Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Syst Biol* 55, 595–609.
- Manthey JD, Campillo LC, Burns KJ, Moyle RG. 2016. Comparison of target-capture and restriction-site associated DNA sequencing for phylogenomics: a test in cardinalid tanagers (Aves, Genus: *Piranga*). *Systematic biology*, syw005.
- Mateussi, N.T., Melo, B.F., Ota, R.P., Roxo, F.F., Ochoa, L.E., Foresti, F., Oliveira, C. (2020). Phylogenomics of the Neotropical fish family Serrasalminidae with a novel intrafamilial classification (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, p.106945.
- MOREIRA, C. R. 2007. Relações filogenéticas da ordem Characiformes (Teleostei: Ostariophysi). Tese de Doutorado em Zoologia. São Paulo, Universidade de São Paulo. 468p.
- Pennisi E. 2013. Large-scale gene comparisons boost tree of life studies. *Science* 342: 26-27.
- Ratnasingham S, Hebert PD. 2013. A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) system. *PloS one*, 8(7), e66213.
- Roberts, T.R. (1974a). Dental polymorphism and systematics in *Saccodon*, a neotropical genus of freshwater fishes (Parodontidae, Characoidei). *Journal of Zoology*. 173:303-321.

Chapter 1

**Molecular species delimitation in the Neotropical fish family
Parodontidae (Teleostei: Characiformes)**

Molecular species delimitation in the Neotropical fish family Parodontidae (Teleostei: Characiformes)

Beatriz F. Dorini

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, R. Prof. Dr. Antônio C. W. Zanin 250, 18618-689, Botucatu, SP, Brazil

Abstract

The family Parodontidae is part of the large order Characiformes and is widely distributed across the Neotropics. In this study, we used specimens from three genera in distinct geographic localities, *Apareiodon*, *Parodon* and *Saccodon*, collected recently or obtained from ichthyological collections, and morphologically identified with the help of identification keys, with addition of samples from GenBank. For the DNA sequencing, we used the DNA barcoding methodology through analysis of partial sequences of the mitochondrial gene cytochrome oxidase c subunit I (COI). As result, we obtained a maximum likelihood tree that shows significant information for better comprehension of the family, using the maximum of different locations that the specimens usually occur. Our results, presents *Saccodon dariensis* in two lineages, where *S. dariensis* from Colombia is one specie and *S. dariensis* from Panama another. This difference may be related to a genetic variation that is fixed, with an important connection with the geographic position of these species. *Apareiodon* presented 16 clades a complex taxonomic scenario, relating in different ways along the tree, *Parodon* eight lineages were established, within four major groups in the tree. Although more species and genes need to be studied, the results support the hypothesis that *Apareiodon* and *Parodon* are not monophyletic groups and point to the need for a revision of these genera. The results will contribute to the expansion of knowledge about diversity, phylogeny and the evolutionary processes involved in the diversification of Parodontidae species.

Keywords: biodiversity, Characiformes, freshwater fish, Neotropics, systematics.

1. Introduction

The Neotropical ichthyofauna is mainly composed by non-cypriniform otophysan fishes (i.e., Characiformes, Siluriformes, and Gymnotiformes), which constitutes about 77% of the species diversity (Albert *et al.*, 2011a, b). Among Neotropical otophysan groups, Characiformes is one of the most ecomorphologically diverse orders of fishes with approximately 2,200 valid species (Fricke *et al.*, 2022). The characiform fish family Parodontidae is widely distributed throughout the upland regions of South America and Panama, except for certain coastal basins, Patagonia and the main course of the Amazon River (Pavanelli, 2003). There are now three recognized genera in this family: *Parodon* Valenciennes, 1849, *Apareiodon* Eigenmann, 1916, and *Saccodon* Kner, 1863 (Fig. 1).

In general, Parodontidae species do not exceed 20 cm in length; they are commonly known as scrapetooths (English) and *canivetes* (Portuguese) and they are prized in the aquarium trade, as with *Parodon pongoensis* (Pavanelli, 2003). Often found in high-flow waters, they adhere their bodies to the substrate using their highly developed pectoral fins, where they mostly feed on tiny invertebrates (Pavanelli, 2015). Parodontids can be differentiated from other characiforms by the following characteristics: edentulous lower jaw in anterior region, spatulate upper jaw with pedunculated and multicuspid premaxillary teeth distributed in a single series, absence of upper lip and cranial fontanelle (Pavanelli, 2003).

Using various multilocus approaches, the phylogenetic position of Parodontidae within the order Characiformes has been unstable (e.g., Oliveira *et al.* 2011; Melo *et al.* 2018). Recent phylogenomic studies, however, reveal a close relationship with members of the superfamily

Anostomoidea (Arcila *et al.* 2017; Betancur-R *et al.* 2018; Melo *et al.* 2022). Nonetheless, the relationships within the group remain inconclusive due the lack of genetic identification and the difficulty in morphological identification.



Figure 1: Representative specimens in Parodontidae: 1- *Apareiodon affinis*, photo: Ingo Seldel; 2- *Apareiodon hasemani*, photo: Noron M.; 3- *Saccodon dariensis*, photo: Juan Manuel de Roux; 4- *Apareiodon ibitiensis*, photo: Ricardo Britzke; 5- *Parodon guyanensis*, photo: F. Melki; 6- *Parodon nasus*, photo: I. Sazima.

The systematics of the family Parodontidae is still inconclusive, despite investigations englobing certain representatives of this family (Pavanelli & Britski, 2003; Ingenito, 2008; Bellafronte *et al.*, 2011). The minor morphological differences between *Parodon*, *Apareiodon* and *Saccodon* are debatable (Roberts, 1974b). *Saccodon* corresponds to a monophyletic group and is considered the sister group to the other members of Parodontidae. However, *Parodon* and *Apareiodon* appeared mixed along the cladogram generated by morphological characters, indicating that these groups are not monophyletic (Ingenito, 2008). No molecular studies, however, have addressed such problems yet (Starnes & Schindler, 1993; Moreira, 2007; Ingenito,

2008).

The genera of Parodontidae are traditionally characterized by the number of unbranched pectoral fin rays and the absence of teeth in the lateroposterior region of the lower jaw (Eigenmann, 1916; Ingenito & Buckup, 2005). According to Ingenito & Buckup (2005), *Parodon* and *Apareiodon* have only one unbranched pectoral-fin ray, while *Saccodon* has two unbranched pectoral-fin rays. The members of this family have a mandible with a straight edge and no teeth on the dentary. The premaxillary is flanked by a row of delicate teeth and has cusps that are rounded (Britski, 1972). The genus *Parodon* contains small mandibular lateral teeth, but *Apareiodon* and *Saccodon* do not. The number of cusps on the premaxilla is an important diagnostic trait for *Parodon* and *Apareiodon* species, however this character cannot be considered for *Saccodon* species due to their substantial dental polymorphism (Roberts, 1974a; Garavello, 1977). The use of molecular methods can aid in species delimitation (Barreto *et al.*, 2018; Mateussi *et al.*, 2020; Ota *et al.*, 2020) and may reveal potential hidden diversity (Pires *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2018; Ramirez *et al.*, 2020).

2. Materials and Methods

2.1. Taxon sampling

Our study included 17 species of Parodontidae with representatives of all three genera, encompassing most locations and more than one individual per location, whenever possible (Supplementary material 1). They were collected recently or obtained from ichthyological collections, and morphologically identified following the identification key presented by Pavanelli et al (2006). All fishes were collected following the Brazilian laws via SISBIO/MMA permit no. 3,245 and collection, maintenance and analysis procedures adhered to international guidelines for animal research via CEEAA IBB/UNESP protocol no. 304. The Supplementary Table 1 includes data from all ingroup and outgroup samples.

2.2. DNA extraction and sequencing

DNA was extracted from muscles, gills, or fin tissues with a DNeasy Tissue kit (Qiagen Inc.) following manufacturer's instructions. The partial sequences of the mitochondrial gene cytochrome oxidase c subunit I (COI) were obtained by polymerase chain reaction (PCR) using the primers: COI L6252-Asn and H7271-COXI (Melo et al. 2011). The amplifications were carried out in a total volume of 12.5 µL with 1.25 µL of 10X buffer (10 mM Tris-HCl+15 mM MgCl₂), 0.5 µL dNTPs (200 mM of each), 0.5 µL of each primer (5 mM), 0.05 µL Platinum® TaqPolymerase (Invitrogen), 1 µL genomic DNA (12 ng) and 8.7 µL ddH₂O. The parameters of PCR consisted of initial denaturation (95°C for 5 min), chain denaturation (95°C for 30s), 36

cycles of primer hybridization (52°C for 30s) and nucleotide extension (72°C for 30s), followed by a final extension (72°C for 10 min). All PCR products were first visualized on 1% agarose gel and then purified using the ExoSapIT® (USB Corporation) following manufacturer's instructions. Purified PCR products were used in a sequencing PCR reaction using the "Big Dye™ Kit Terminator v 3.1 21 Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystems). Right after the PCR product was purified again by precipitation in EDTA/Sodium Acetate/Ethanol and analyzed in an automatic DNA sequencer, model ABI 3130- Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Sequences were assembled using Geneious v7.1.9 (Kearse et al., 2012) and subsequently aligned with Muscle (Edgar, 2004) under default parameters. The method of Xia et al. (2003) was used to evaluate the occurrence of substitution saturation in DAMBE v5.3.38 (Xia, 2013). Nucleotide variation, substitution patterns and the best-fit model of nucleotide evolution were estimated in MEGA v10 (Kumar et al., 2018). The maximum likelihood (ML) and neighbor-joining (NJ) trees were performed with 1000 bootstrap replicates, using the K2P+G model (Kimura 1980) in MEGA v10.

Three distinct species delimitation methods were performed: Automatic Barcode Gap Discovery analysis (ABGD; Puillandre et al., 2012), available in the ABGD webserver (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>) using Kimura (K80) evolutionary model with $X = 1.0$, $P_{min} = 0.001$ and $P_{max} = 0.1$ and Poisson Tree Process (PTP; Zhang et al., 2013) using the maximum likelihood (ML) tree, 100,000 generations, and other parameters at default in the bPTP webserver (<http://species.hits.org/ptp/>) and ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning, Puillandre et al., 2021, website <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/asapweb.html>). The bootstrap method was performed by the autoMRE function, which allows the stopping criterion if the pseudo-replicas reach support values stable enough (Pattengale et al., 2009). The tree resulting from the likelihood analysis was used for the bPTP species delimitation analysis (Poisson Tree Process, website species.hits.org/ server). For ASAP species delimitation analysis, we used the matrix excluding the root (Assembly Species by Automatic Partitioning, Puillandre et

al., 2021; website <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/asapweb.html>). The outgroup *Prochilodus nigricans* was omitted from analyses of ASAP, bPTP, and genetic distance because his inclusion could have affected the results.

3. Results

Partial sequences of the COI gene were obtained for 115 specimens with representatives of all the three genera. The resulting matrix consisted of 652 pb (117 pb variable sites) and nucleotide composition of 22.9% adenine, 29.1% cytosine, 18.7% guanine and 26.1% thymine. DAMBE detected no signal of saturation for either transitions or transversions in both asymmetrical (Iss.cAsym) and symmetrical (Iss.cSym) topologies. ML and NJ trees recovered nearly identical topologies. The ASAP genetic distance analysis classified the specimens into 21 taxa (supplementary Figure 1), while the bPTP genetic distance analysis classified the specimens into 66 taxa (supplementary figure 2).

All the geographic localities of samples we used in this work are placed in three maps, separated by genera, *Apareidon* (Fig. 2), *Parodon* (Fig. 3) and *Saccodon* (Fig. 4). The intraspecific genetic distances were calculated using the Kimura-2-parameters in MEGA. The smallest value for intraspecific distance was for *Parodon suborbitalis* with 0%, and the largest value of genetic distance appeared in *Apareiodon* sp. with 13.9% (Table 1). For the interspecific analysis, the lowest distance was 0.02 between *A. piracicabae* and *A. affinis*. The highest divergence was between *P. guyanensis* and *A. vitattus* with 0.29 (Table 2).



Figure 2: Map showing the distribution of *Apareiodon* species studied this work; colors are associated with the species analyzed.



Figure 3: Map showing the distribution of *Parodon* species studied this work; colors are associated with

the species analyzed.

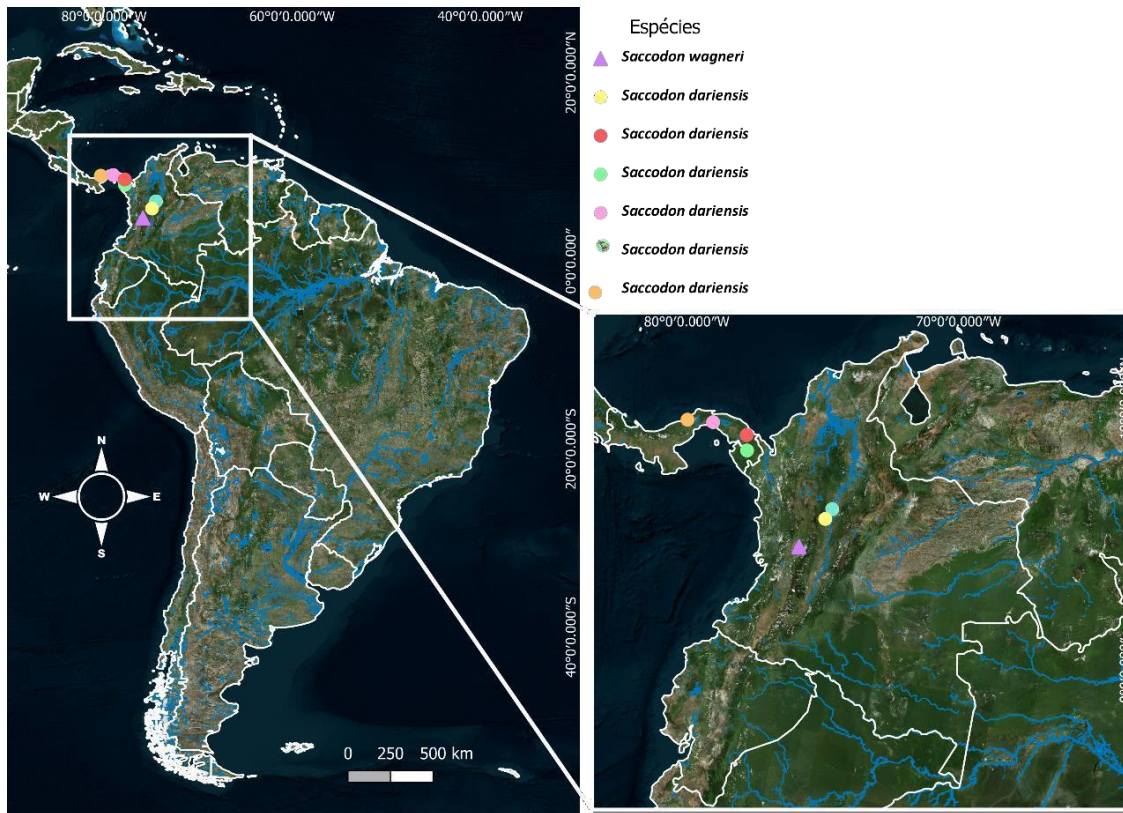


Figure 4: Map showing the distribution of *Saccodon* species studied this work; colors are associated with the species analyzed.

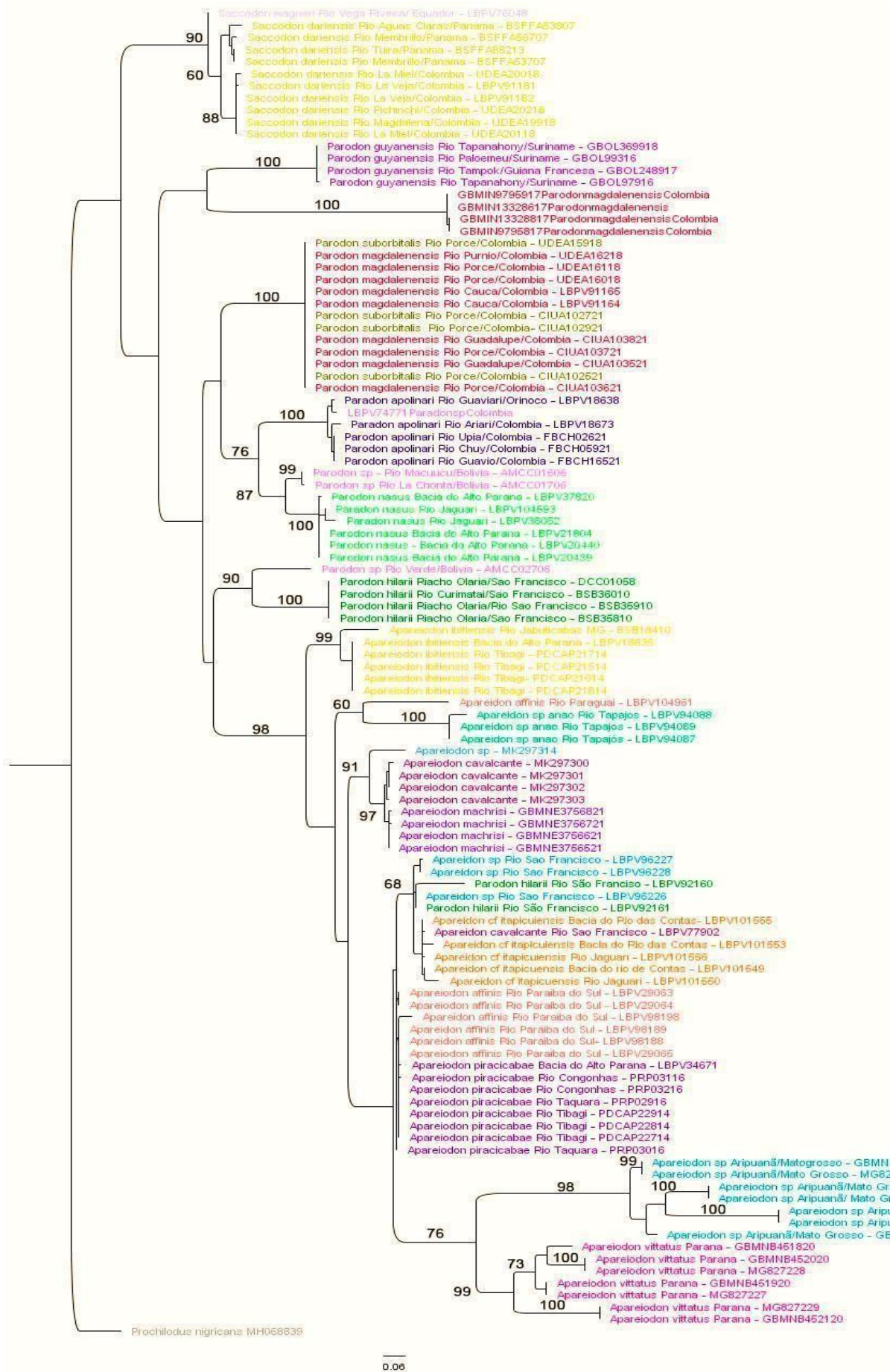


Figura 5: Maximum likelihood tree determined by RAxML, with the representatives from the three genera of Parodontidae, *Apareidon*, *Parodon* and *Saccodon*, rooted in *Prochilodus nigricans*, with 1000 pseudoreplicates of bootstraps, with different collors to point the diferent species presents in the tree.

Table 1: Intraspecific values of genetic distance by K2P model.

Species	Distance	Standard error
<i>Apareidon vitattus</i>	0.0570	0.0089
<i>Apareiodon</i> sp.	0.1399	0.0159
<i>Parodon magdalenensis</i>	0.1071	0.0142
<i>Parodon guyanensis</i>	0.0008	0.0007
<i>Parodon</i> sp.	0.0666	0.0086
<i>Parodon suborbitalis</i>	0.0000	0.0000
<i>Apareiodon affinis</i>	0.0347	0.0052
<i>Apareiodon piracicabae</i>	0.0013	0.0007
<i>Apareiodon ibitiensis</i>	0.0121	0.0027
<i>Apareiodon machisi</i>	0.0015	0.0011
<i>Apareiodon cavalcante</i>	0.0307	0.0051
<i>Parodon hilarii</i>	0.0795	0.0105
<i>Apareiodon itapicuiensis</i>	0.0087	0.0025
<i>Saccodon dariensis</i>	0.0135	0.0032
<i>Saccodon wagneri</i>	n/c	n/c
<i>Parodon nasus</i>	0.0552	0.0085
<i>Parodon apolinari</i>	0.0065	0.0021

On the tree, we can observe that, *Saccodon dariensis* from Panama was separated from *S. dariensis* from Colombia (Figure 5). One specific clade united two species *A. piracicabae* and *A. affinis* from five locations. There are two samples of *Parodon hilarii* LBPV92160 and LBPV92161 which are in the clade next to *Apareiodon* sp. from São Francisco, *A. cavalcante* LBPV779012 and *Apareiodon cf. itapicuiensis* all these samples are mixed in only one clade, *A. affinis* LBPV104961 from Mato Grosso, was in the clade showed as a sister group of *Apareiodon* sp. “dwarf”, and the others samples from *A. affinis* are grouped with *A. piracicabae*. In *Parodon* we observed a separation of the specimens of *P. magdalenensis*, one of those clades is related next of *P. guyanensis*, from Suriname. On the tree is other clade with samples of *P. magdalenensis* and

P. suborbitalis next to, *Parodon apollinari* who is placed with *Parodon* sp. All the samples of *P. nasus* are well supported with 100% of bootstraps, as well as *Parodon hilarii*, with two exceptions, of *Parodon* sp. AMCC01606 and AMCC01706 from Bolivia that are separated in the tree.

The bPTP method pointed the existence of 74 lineages, that sounds as an unrealistic number of lineages when compared with the morphological characters (Supplementary figure 2). The ASAP analysis showed more consistent with the morphological data regarding the species found, being a more realistic result for the present study. Therefore, we choose to use the ASAP in our discussions, because the results showed by it are more congruent with our data.

Table 2: Interspecific genetic distance: The black numbers indicate the values of interspecific genetic distance between the species; the purple numbers indicate the value of standard error. The pink square indicates the maximum value of interspecific genetic distance; the blue square indicates the minimum value of interspecific genetic distance:

Species	<i>Apareido vitattus</i>	<i>Apareiodon sp</i>	<i>Parodon magdalenensis</i>	<i>Parodon guyanensis</i>	<i>Parodon sp</i>	<i>Parodon suborbitalis</i>	<i>Apareiodon affinis</i>	<i>Apareiodon piracicabae</i>	<i>Apareiodon ibitiensis</i>	<i>Apareiodon machrisi</i>	<i>Apareiodon cavalvante</i>	<i>Parodon hilarii</i>	<i>Apareiodon itapicuiensis</i>	<i>Saccodon dariensis</i>	<i>Saccodon wagneri</i>	<i>Parodon nasus</i>	<i>Parodon apolinari</i>
<i>A. vitattus</i>		0.0217	0.0328	0.0368	0.0288	0.0335	0.0185	0.0177	0.0261	0.0231	0.0217	0.0268	0.0192	0.0343	0.0353	0.0296	0.0301
<i>Apareiodon</i> sp	0.1893		0.0239	0.0259	0.0224	0.0238	0.0154	0.0156	0.0178	0.0158	0.0155	0.0204	0.0160	0.0265	0.0256	0.0229	0.0237
<i>P. magdale</i>	0.2816	0.2211		0.0216	0.0172	0.0099	0.0208	0.0215	0.0205	0.0203	0.0200	0.0186	0.0213	0.0215	0.0213	0.0155	0.0177
<i>P. guyanensis</i>	0.2922	0.2223	0.1707		0.0216	0.0243	0.0229	0.0238	0.0224	0.0225	0.0225	0.0219	0.0240	0.0218	0.0206	0.0225	0.0208
<i>Parodon</i> sp	0.2423	0.2065	0.1468	0.1705		0.0168	0.0167	0.0176	0.0176	0.0172	0.0164	0.0145	0.0162	0.0181	0.0172	0.0073	0.0106
<i>P. suborbitalis</i>	0.2656	0.2022	0.0731	0.1660	0.1246		0.0218	0.0225	0.0208	0.0214	0.0208	0.0183	0.0224	0.0243	0.0240	0.0139	0.0188
<i>A. affinis</i>	0.1403	0.1364	0.1793	0.1775	0.1391	0.1659		0.0028	0.0135	0.0104	0.0089	0.0143	0.0065	0.0223	0.0224	0.0176	0.0181
<i>A. piracicabae</i>	0.1235	0.1326	0.1796	0.1792	0.1406	0.1634	0.0191		0.0147	0.0111	0.0093	0.0146	0.0062	0.0231	0.0235	0.0186	0.0193
<i>A. ibitiensis</i>	0.2116	0.1547	0.1663	0.1701	0.1436	0.1441	0.0980	0.0984		0.0119	0.0115	0.0154	0.0140	0.0219	0.0215	0.0183	0.0186
<i>A. machrisi</i>	0.1785	0.1361	0.1672	0.1681	0.1398	0.1499	0.0692	0.0632	0.0760		0.0036	0.0150	0.0115	0.0232	0.0233	0.0180	0.0181
<i>A. cavalvante</i>	0.1713	0.1364	0.1689	0.1719	0.1364	0.1532	0.0623	0.0556	0.0785	0.0199		0.0143	0.0096	0.0223	0.0224	0.0173	0.0174
<i>P. hilarii</i>	0.2226	0.1868	0.1639	0.1791	0.1252	0.1412	0.1183	0.1143	0.1262	0.1230	0.1207		0.0127	0.0187	0.0187	0.0155	0.0164
<i>A. itapicuiensis</i>	0.1399	0.1358	0.1781	0.1841	0.1311	0.1621	0.0397	0.0255	0.0937	0.0738	0.0627	0.1024		0.0219	0.0220	0.0174	0.0188
<i>S. dariensis</i>	0.2804	0.2320	0.1752	0.1637	0.1424	0.1723	0.1781	0.1779	0.1670	0.1820	0.1792	0.1532	0.1669		0.0050	0.0191	0.0187
<i>S. wagneri</i>	0.2844	0.2247	0.1725	0.1532	0.1356	0.1671	0.1787	0.1803	0.1625	0.1827	0.1797	0.1534	0.1676	0.0207		0.0185	0.0175
<i>P. nasus</i>	0.2469	0.2073	0.1252	0.1722	0.0608	0.0871	0.1442	0.1449	0.1433	0.1420	0.1408	0.1303	0.1365	0.1468	0.1421		0.0127
<i>P. apolinari</i>	0.2369	0.2039	0.1456	0.1514	0.0798	0.1297	0.1352	0.1354	0.1428	0.1323	0.1293	0.1341	0.1339	0.1349	0.1230	0.0942	

Discussion

Species of the genus *Saccodon* are restricted to the trans-Andean region of South and Central America, from Gulf of Guayaquil in the extreme south of Ecuador eastward to Río Magdalena in Colombia (Pavenelli and Starners, 2015). In our tree, *Saccodon dariensis* was split in two lineages, with *S. dariensis* from Colombia being distinguished from *S. dariensis* from Panama. This difference may be related to a genetic variation that it is fixed, with an important connection with the geography position of these species, which was pointed in our map (Figure 4). However, morphologically, all local populations of *S. dariensis* share common characters, and thus, the genetic differences are probably due to evolutionary events related to interruption of the gene flow in the geographic region under investigation.

Our results show that species of *Apareiodon* and *Parodon* are not separated in the final tree (Figure 5). Although only one gene was examined, our results agree with the hypothesis of Ingenito (2008) and highlight the need of a taxonomic revision of these genera and species.

The position of *Apareiodon ibitiensis* deserves some attention since it shows two different clades and because they are separated biogeographically, one in the region of Paraná and the other in São Francisco. *Apareiodon machrisi* is closer to *A. cavallante* establishing a sister relationship, if we disregard the sample *Apareiodon* sp. MK297314 (GenBank). If we consider this sample the relationship in these two clades support the group monophyly, at least based in the results of a single locus; for a deep phylogenetic discussion to better understand the relationships, more analyses will be necessary.

There is one specific clade of *Apareidon* sp. from Mato Grosso that splits on four groups in the tree, however the monophyly is still established. The splits can be noticed on *A. vitattus* too, but *A. vitattus* is still a monophyletic group. One specific clade, in the tree, unites two species *A. piracicabae* and *A. affinis* from five localities. There are two samples of *Parodon hilarii*

LBPV92160 and LBPV92161 who are in the clade of *Apareiodon* sp. from São Francisco, *A. cavalcante* LBPV779012 and *Apareiodon cf. itapicuensis* all these samples are mixed in the same part of the tree; the morphology was checked, so it could be the result of cross-contamination. *Apareiodon affinis* LBPV104961 from Mato Grosso, is a sister group of *Apareiodon* sp. “dwarf”, the other samples from *A. affinis* are grouped with *A. piracicabae*, and *Apareiodon* sp. “dwarf” might be a new species of *Apareiodon*. *Apareiodon* has 16 clades (Figure 5), showing a complex taxonomic scenario. They are scattered along the tree in many placements and different groups.

In *Parodon*, we observed a separation of the specimens of *P. magdalenensis*, one of those clades have a close relationship with *P. guyanensis*, other specimen of *P. magdalenensis* is located far from the others of this species (Figure 5), probably due to a problem with the morphological identification. *Parodon suborbitalis* is together with the samples of *P. magdalenensis*. *Parodon apollinari* places together with *Parodon* sp. showing that *Parodon* sp. probably is a sample of *P. apollinari*. All the specimens of *P. nasus* are grouped in one established clade on the tree (Figure 5). *Parodon hilarii* from São Francisco is well supported as a species. Two sequences of *Parodon* sp. AMCC01606 and *Parodon* sp. AMCC01706 from Bolivia that are separated in the tree, indicating they are not directly related to other samples, showing the possibility of a new species. *Parodon* sp. AMCC02706 from Bolivia is probably a new species, but this sequence was obtained from GenBank. *Parodon* have eight different lineages within four large groups in the tree.

Although more species and genes need to be studied, the results support the hypothesis that *Apareiodon* and *Parodon* are not monophyletic groups and point to the need for a review of these genera. Our study advances the understanding of interspecific genetic diversity in Parodontidae and contributes to future phylogenetic, taxonomic and evolutionary studies in the family.

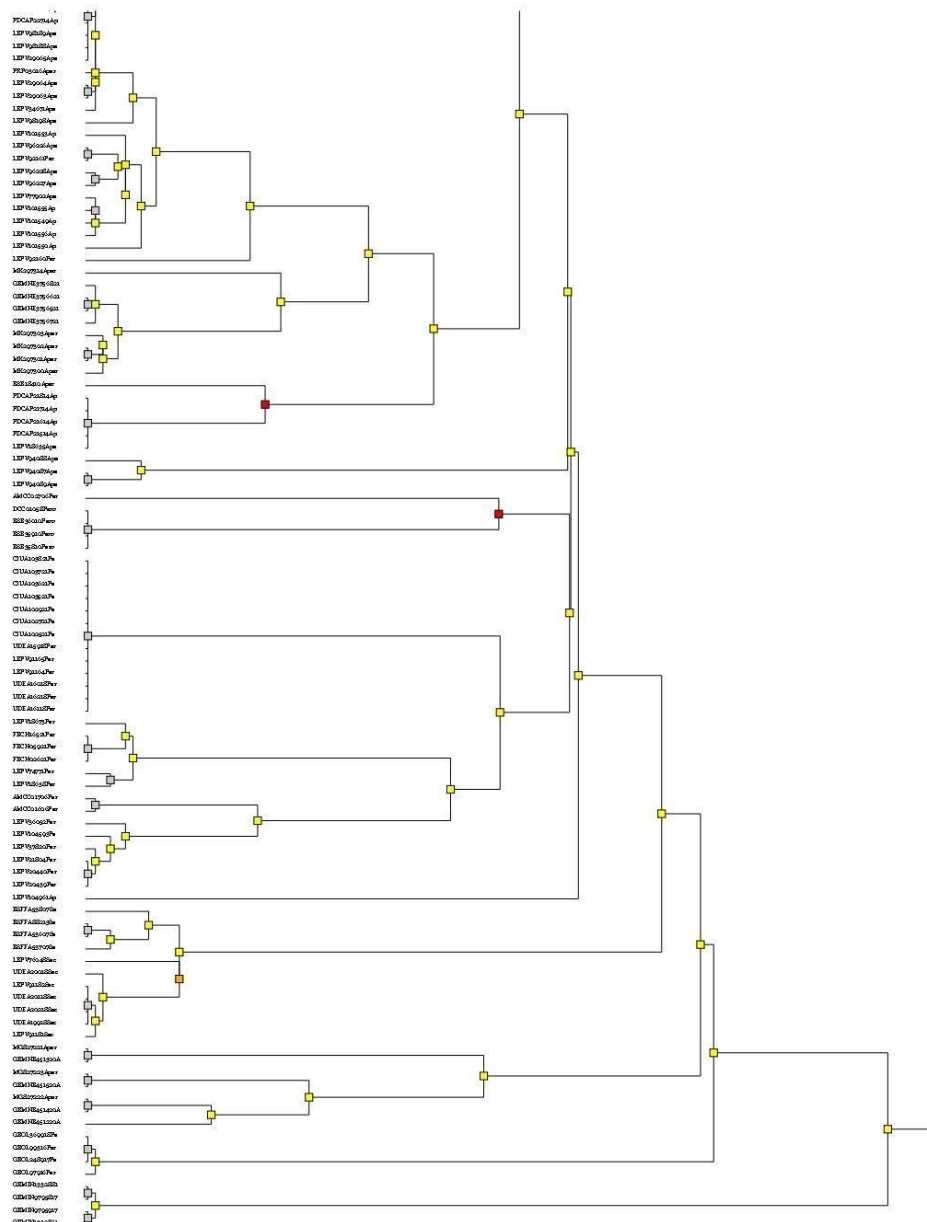
4. Bibliography

- Alda, F., Tagliacollo, V.A., Bernt, M.J., Waltz, B.T., Ludt, W.B., Faircloth, B.C., Alfaro, M.E., Albert, J.S., Chakrabarty, P. (2019). Resolving deep nodes in an ancient radiation of neotropical fishes in the presence of conflicting signals from incomplete lineage sorting. *Systematic Biology*, 1–21, DOI:10.1093/sysbio/syy085
- Alfaro, M.E., Faircloth, B.C., Harrington, R.C., Sorenson, L., Friedman, M., Thacker, C.E., Oliveros, C.H., Černý, D., Near, T.J. (2018). Explosive diversification of marine fishes at the Cretaceous–Palaeogene boundary. *Nature Ecology & Evolution*, 2(4), pp.688–696.
- Bellafronte, E.; Mariguela, T.C; Pereira, L.H.G; Oliveira, C.; Moreira-Filho, O. (2013). DNA barcode of Parodontidae species from the La Plata river basin - Applying new data to clarify taxonomic problems. *Neotropical Ichthyology*. 11(3):497-506.
- Britski, H.A. (1972). Peixes de água doce do Estado de São Paulo. Sistemática. In: Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguai. Poluição e Psicultura. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP.
- Burress, E.D., Alda, F., Duarte, A., Loureiro, M., Armbruster, J.W., Chakrabarty, P. (2018). Phylogenomics of pike cichlids (Cichlidae: Crenicichla): the rapid ecological speciation of an incipient species flock. *Journal of evolutionary biology*, 31(1), pp.14–30.
- Chakrabarty P, Faircloth BC, Alda F, Ludt WB, McMahan CD, Near T J. et al. 2017. Comparative systematics of Ostariophysan fishes with a focus on the perplexing characins (Ostariophysi: Characiformes) using ultraconserved elements, traditional genes, and morphology. *Syst Biol* doi:10.1093/sysbio/syx038.
- Edgar RC, Drive RM, Valley M. 2004. MUSCLE : multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. 32, 1792–1797.
- Faircloth BC, Glenn TC. 2012. Not all sequence tags are created equal: Designing and validating sequence identification tags robust to indels. *PLoS ONE* 7: e42543.
- Fricke, R., Eschmeyer, W. N. & Fong, J. D. 2020 ESCHMEYER’S CATALOG OF FISHES: GENERA/SPECIES BY FAMILY/SUBFAMILY. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Electronic version accessed 12/01/2021.
- Friedman, M., Feilich, K.L., Beckett, H.T., Alfaro, M.E., Faircloth, B.C., Černý, D.,

- Miya, M., Near, T.J., Harrington, R.C. (2019). A phylogenomic framework for pelagiarian fishes (Acanthomorpha: Percomorpha) highlights mosaic radiation in the open ocean. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1910), p.20191502.
- Garavello, J.C. (1977). Descrição de *Apareiodon vittatus* sp. n. do rio Iguaçu e comentários sobre as espécies do gênero *Apareiodon* Eigenmann, 1916 (Ostariophysi, Parodontidae) *Revista Brasileira de Biologia*. 37:447-455.
- Harrington, R.C., Faircloth, B.C., Eytan, R.I., Smith, W.L., Near, T.J., Alfaro, M.E., Friedman, M. (2016). Phylogenomic analysis of carangimorph fishes reveals flatfish asymmetry arose in a blink of the evolutionary eye. *BMC Evolutionary Biology*, 16(1), p.224.
- Harvey MG, Smith BT, Glenn TC, Faircloth BC, Brumfield RT. 2016. Sequence capture versus restriction site associated DNA sequencing for shallow systematics. *Syst Biol* 65(5), 910-924.
- Ingenito, L.F.S.; Buckup, P.A. (2005). A new species of *Parodon* from the Serra da Mantiqueira, Brazil (Teleostei: Characiformes: Parodontidae). *Copeia*. 5:765-771.
- Ingenito, L.F.S. (2008). Análise filogenética da família Parodontidae (Teleostei, Characiformes).
- Oyakawa, K., Didarul, I. M., & Yaga, M. (2006). Fluid flow and infrared image analyses on endwall fitted with short rectangular plate fin. *Journal of Thermal Science*, 15, 145-151.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16(2), 111-120.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870-1874
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870-1874
- Pavanelli, C. S. 2003. Family Parodontidae (Parodon-tids). Pp: 46-50 in: R. E. Reis et al. (eds), Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre.
- Pavanelli, Carla Simone, and Wayne C. Starnes. "Revision of the trans-Andean scrapetooths genus *Saccodon* (Ostariophysi: Characiformes: Parodontidae)." *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 26 (2015): 193-207.
- Pons, J., Barraclough, T.G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D.P., Hazell, S.,

- Kamoun, S., Sumlin, W.D. & Vogler, A.P. (2006). Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Syst Biol* 55, 595–609.
- Manthey JD, Campillo LC, Burns KJ, Moyle RG. 2016. Comparison of target-capture and restriction-site associated DNA sequencing for phylogenomics: a test in cardinalid tanagers (Aves, Genus: *Piranga*). *Systematic biology*, syw005.
- Mateussi, N.T., Melo, B.F., Ota, R.P., Roxo, F.F., Ochoa, L.E., Foresti, F., Oliveira, C. (2020). Phylogenomics of the Neotropical fish family Serrasalminidae with a novel intrafamilial classification (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, p.106945.
- MOREIRA, C. R. 2007. Relações filogenéticas da ordem Characiformes (Teleostei: Ostariophysi). Tese de Doutorado em Zoologia. São Paulo, Universidade de São Paulo. 468p.
- Pennisi E. 2013. Large-scale gene comparisons boost tree of life studies. *Science* 342: 26-27.
- Ratnasingham S, Hebert PD. 2013. A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) system. *PloS one*, 8(7), e66213.
- Roberts, T.R. (1974a). Dental polymorphism and systematics in *Saccodon*, a neotropical genus of freshwater fishes (Parodontidae, Characoidei). *Journal of Zoology*. 173:303-321.
- Xia X, Xie Z. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Heredity* 92:371–373.

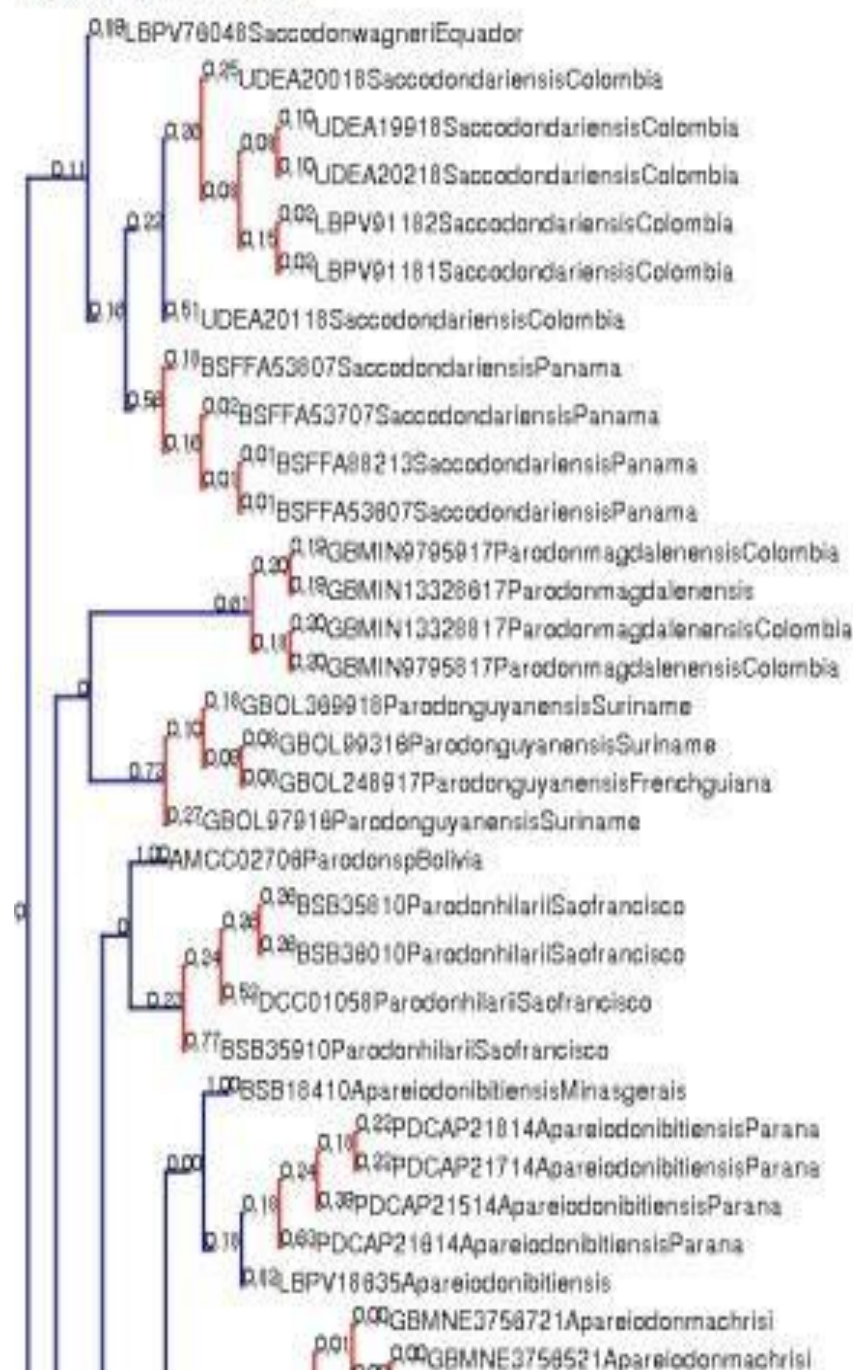
5. Supplementary Information

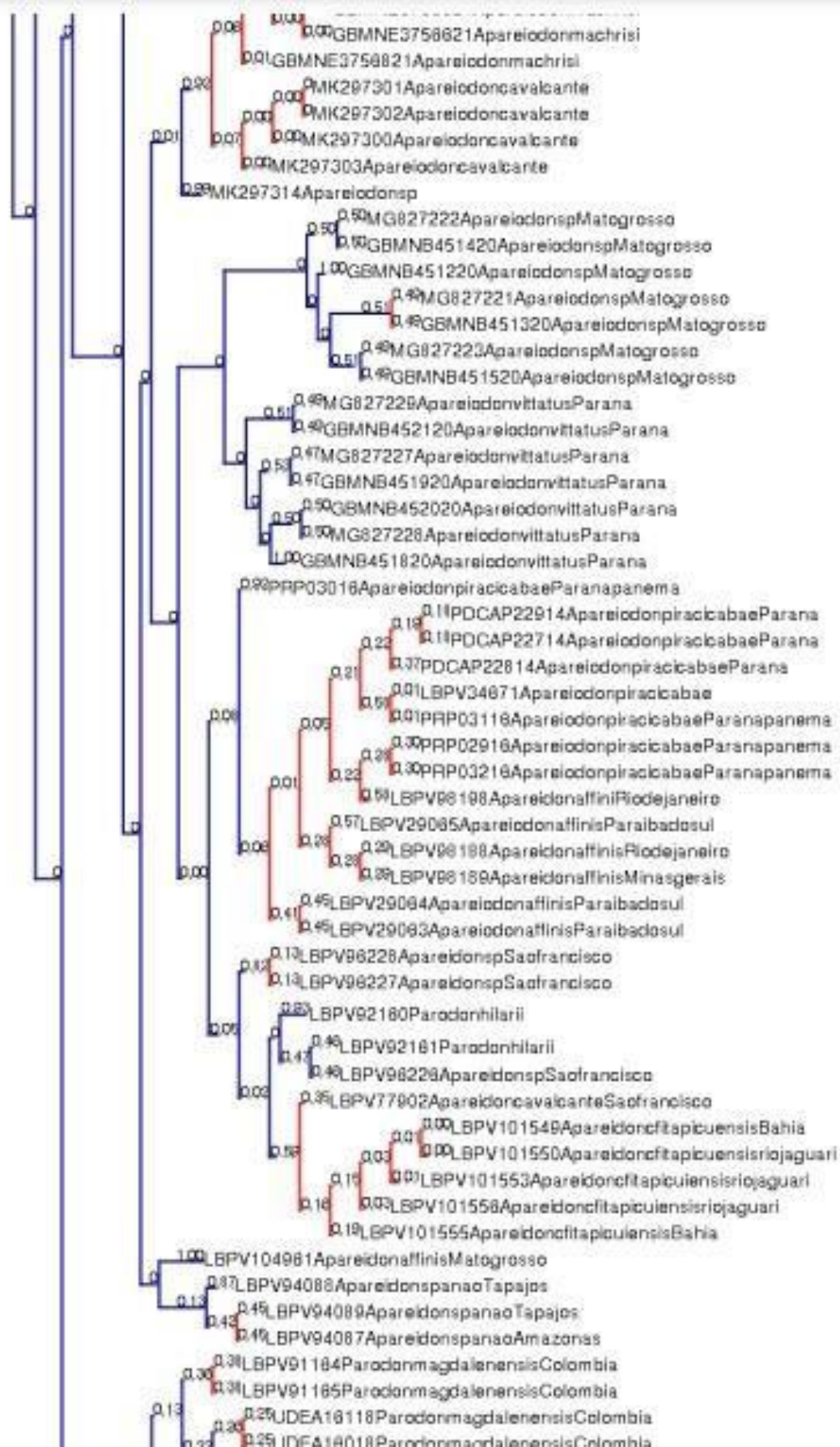


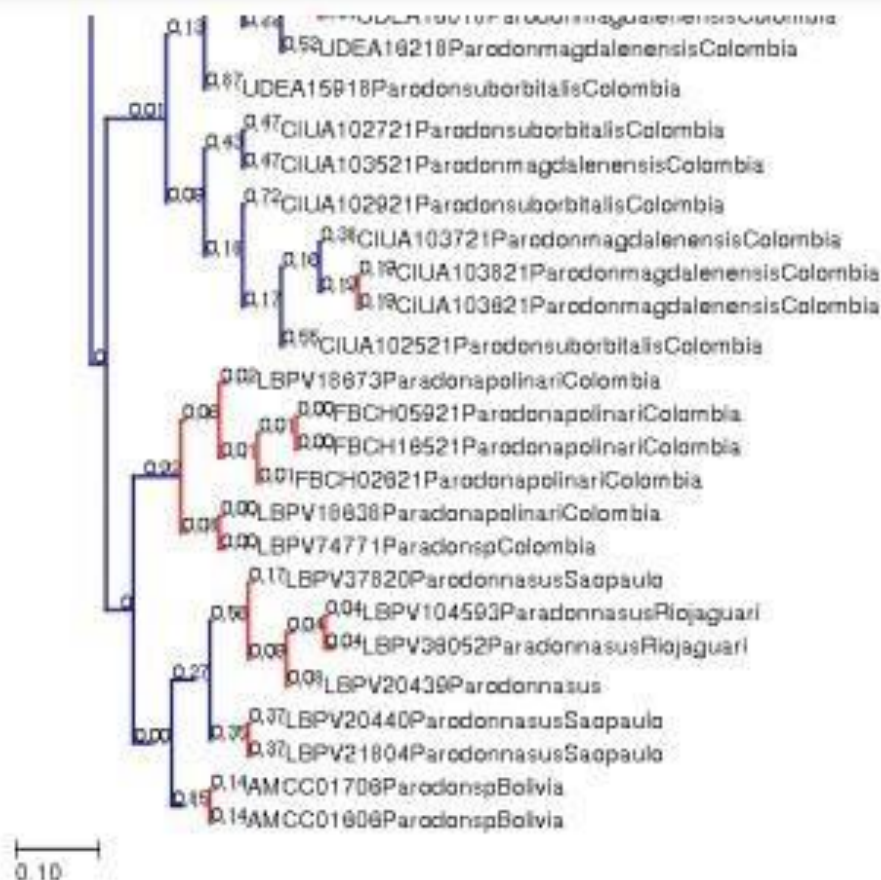
Supplementary figure 1: ASAP tree for genetic distance analysis separated the specimens into 21 taxa.

PTP species delimitation results

Maximum likelihood solution:





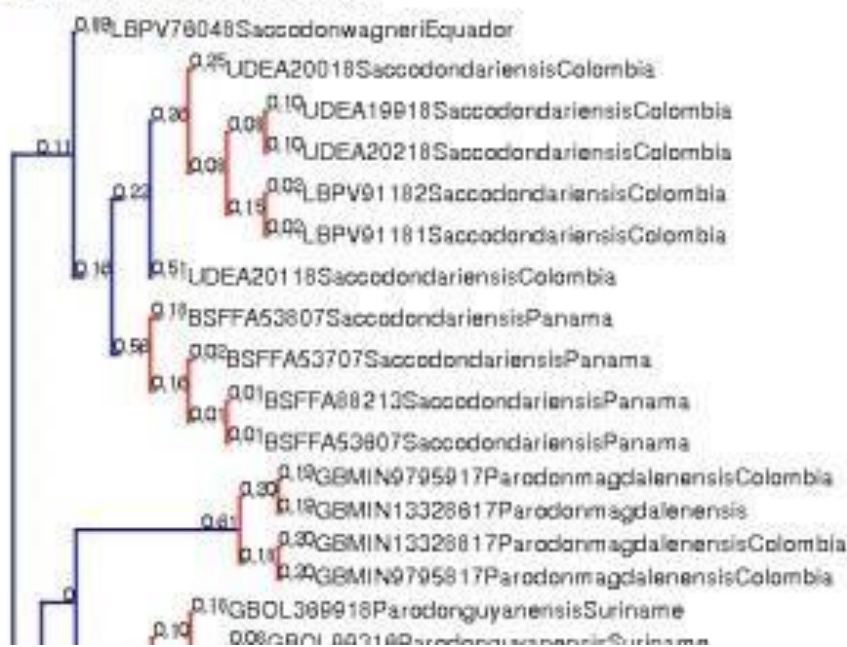


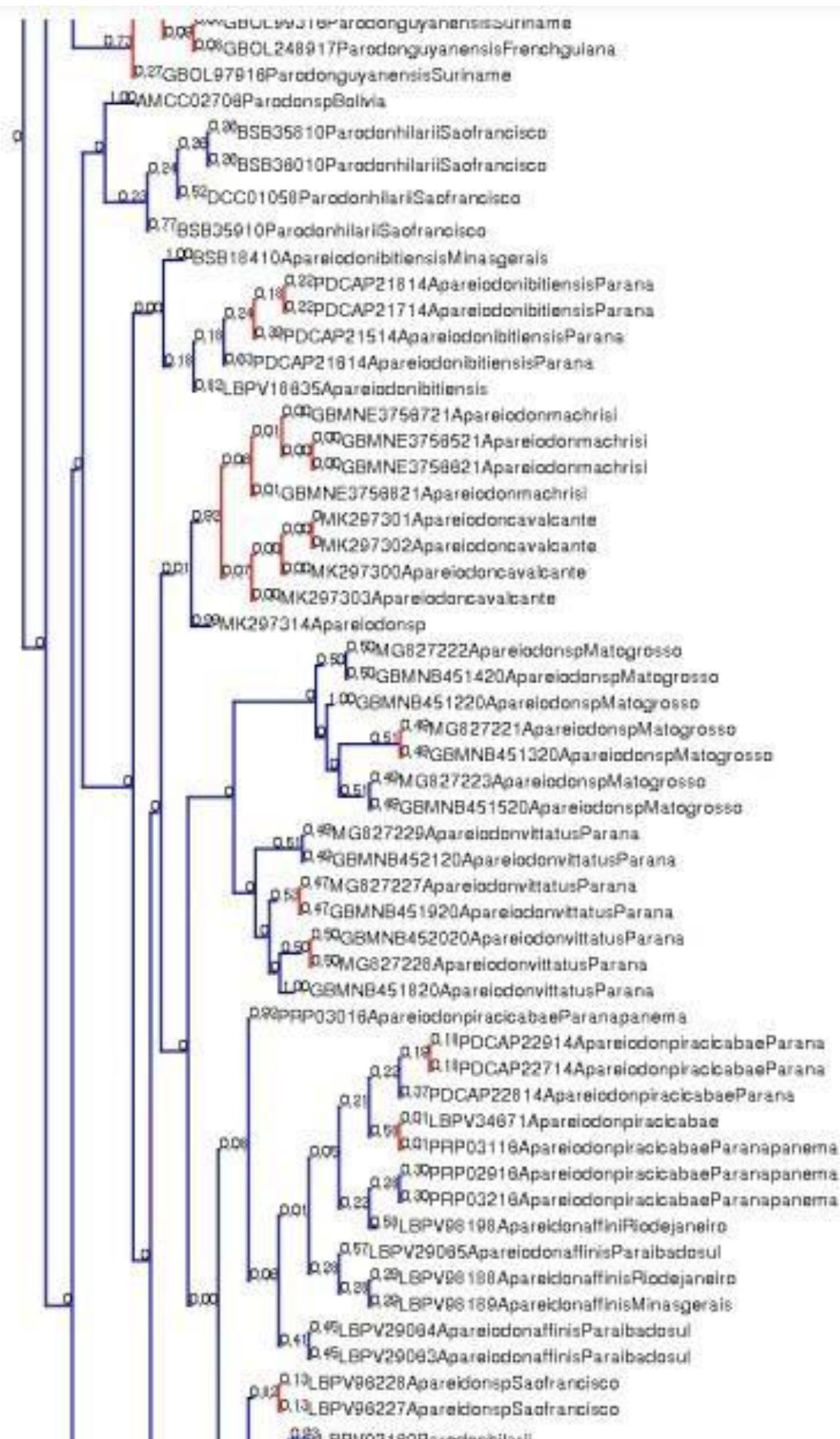
[Download output in SVG \(/download/108870/output.PTPMLPartition.txt.svg\)](#)

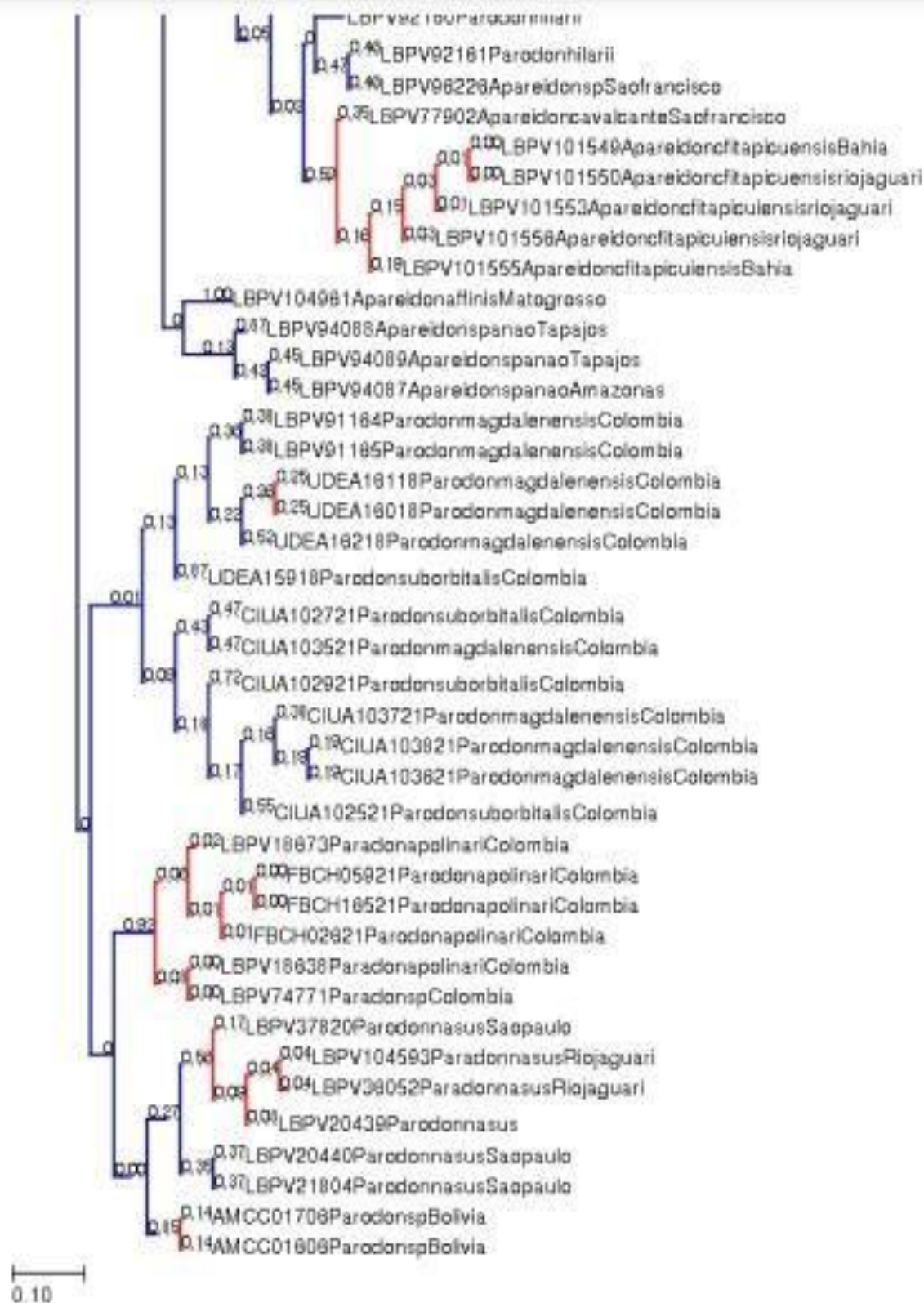
[Download delimitation results \(/download/108870/output.PTPMLPartition.txt\)](#)

[Download annotated tree \(/download/108870/output.PTPMLPartition.txt.ml.tre\)](#)

Highest Bayesian supported solution:







Supplementary Figure 2: bPTP Tree, showing the species delimitation.

Supplementary
Table 1 –
Vouchers com
localização e
drenagens

Family	Genus	Species	Voucher	Museum number	Drainage (River/Basin)		Country	Coordinates
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareidon</i> sp.	11758	LBP2002121301	Rio das Garças/Rio Araguaia		Brazil	S 15°54'18.1"
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareidon</i> sp.	11755	LBP2002121301	Rio das Garças/Rio Araguaia		Brazil	S 15°54'18.1"
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon</i> cf <i>itapicuiensis</i>	101548		Bacia do rio de Contas	Itagi BA	Brazil	S 14°09'51.1" W
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon</i> cf <i>itapicuiensis</i>	101549		Bacia do rio de Contas	Itagi BA	Brazil	S 14°09'51.1" W
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon</i> cf <i>itapicuiensis</i>	101550		Bacia do rio de Contas	Itagi BA	Brazil	S 14°09'51.1" W
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon</i> cf <i>itapicuiensis</i>	101553		Bacia do rio de Contas	Itagi BA	Brazil	S 14°09'51.1" W
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon</i> cf <i>itapicuiensis</i>	101555		Bacia do rio de Contas	Itagi BA	Brazil	S 14°09'51.1" W
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon</i> cf <i>itapicuiensis</i>	101556		Bacia do rio de Contas	Itagi BA	Brazil	S 14°09'51.1" W
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon</i> ibitiensis	104531		Rio Jaguari	Pedreira SP	Brazil	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon</i> nasus	104593		Rio Jaguari	Pedreira SP	Brazil	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon</i> nasus	104595		Rio Jaguari	Pedreira SP		
odontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon</i> affinis	104961		Reservatório rio Manso/ Rio Paraguai	Chapada dos Guimarães/MT	Brazil	S 14°56'37.7"
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon</i> ibitiensis	16632		Rio Jaguari			
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon</i> ibitiensis	16633		Rio Jaguari			
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon</i> apolinari	18638		Rio Guaviare/Orinoco		Colombia	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon</i> apolinari	18673		Río Ariari		Colombia	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon</i> sp.	74771	LBP2013120701	Río Güejar/Rio Guaviare/Orinoco		Colombia	
Parodontidae	<i>Saccodon</i>	<i>Saccodon</i> wagneri	76048		Rio Vega Riveira	Machala/El Oro	Equador	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon</i> cavalcante	77902	LBP2014081601	Rio Tocantins	Cavalcante/GO	Brazil	S 13°44'34.0" W
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon</i> magdalenensis	91164	LBP2017082001	Rio Cauca/Magdalena	La Pila/Zarzal/Valle del Cauca	Colombia	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon</i> magdalenensis	91165	LBP2017082001	Rio Cauca/Magdalena	La Pila/Zarzal/Valle del Cauca	Colombia	
Parodontidae	<i>Saccodon</i>	<i>Saccodon</i> dariensis	91181	LBP2017082002	Rio La Veja	Piedra Moler/Cartago/Valle del Cauca	Colombia	

Parodontidae	<i>Saccodon</i>	<i>Saccodon dariensis</i>	91182	LBP2017082002	Rio La Veja	Piedra Moler/Cartago/Valle del Cauca	Colombia	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon hasemani</i>	92111	LBP2017070201	Córrego Catolé /Rio São Francisco	Bonito de Minas/MG	Brazil	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon hilarii</i>	92160					
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon hilarii</i>	92161					
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Aparareidon sp. Anao</i>	94087	LBP2017092101	Rio Tapajós/Amazonas	Novo Progresso/PA	Brazil	S 07°03'53.0" W
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Aparareidon sp. Anao</i>	94088	LBP2017092101	Rio Tapajós/Amazonas	Novo Progresso/PA	Brazil	S 07°03'53.0" W
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Aparareidon sp. Anao</i>	94089	LBP2017092101	Rio Tapajós/Amazonas	Novo Progresso/PA	Brazil	S 07°03'53.0" W
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon sp.</i>	96226	LBP2017112202	Afluente rio Urucuia/ Rio São Francisco	Cabeceiras/GO	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon sp.</i>	96227	LBP2017112202	Afluente rio Urucuia/ Rio São Francisco	Cabeceiras/GO	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon sp.</i>	96228	LBP2017112202	Afluente rio Urucuia/ Rio São Francisco	Cabeceiras/GO	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon affinis</i>	98188		Rio Paraíba do Sul	Três Rios/RJ	Brazil	S 22°06'46.7"
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon affinis</i>	98189		Rio Paraíba do Sul	Três Rios/RJ	Brazil	S 22°06'46.7"
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon affinis</i>	98198	LBP2018101605	Rio Peruaçu/ Rio São Francisco	Januária/MG	Brazil	S 15°10'37.7"
Parodontidae	<i>Saccodon</i>	<i>Saccodon dariensis</i>	GIUA-8927	UDEA20218	Rio Pichinchi/ Magdalena		Colombia	
Parodontidae	<i>Saccodon</i>	<i>Saccodon dariensis</i>	GIUA-8845	UDEA20118	Rio La Miel/Magdalena	MARQUETALIA	Colombia	
Parodontidae	<i>Saccodon</i>	<i>Saccodon dariensis</i>	GIUA-8844	UDEA20018	Rio La Miel/Magdalena	MARQUETALIA	Colombia	
Parodontidae	<i>Saccodon</i>	<i>Saccodon dariensis</i>	GIUA-8839	UDEA19918	Embalse Amani/ Magdalena	Victoria	Colombia	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon magdalenensis</i>	GIUA-8879	UDEA16218	Rio Purnio/ Magdalena	La dorada	Colombia	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon magdalenensis</i>	GIUA-8060	UDEA16118	Rio Porce/ Cauca	Amalfi/antiqua	Colombia	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon magdalenensis</i>	GIUA-8041	UDEA16018	Rio Porce/ Cauca	Amalfi/Antiqua	Colombia	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon suborbitalis</i>	GIUA-7671	UDEA15918	Rio Porce	Amalfi/Antiqua	Colombia	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon piracicabae</i>	163C	PRP03216	Congonhas	Paranapanema	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon piracicabae</i>	156C	PRP03116	Congonhas	Paranapanema	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon piracicabae</i>	532C	PRP03016	Rio Taquara	Paranapanema	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon piracicabae</i>	518C	PRP02916	Rio Taquara	Paranapanema	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon piracicabae</i>	PDtaq15	PDCAP2291	Rio Tibagi	Londrina/Parana	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon piracicabae</i>	PDtaq14	PDCAP22814	Rio Tibagi	Londrina/Parana	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon piracicabae</i>	PDtaq13	PDCAP22714	Rio Tibagi	Londrina/Parana	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon ibitiensis</i>	PDtaq04	PDCAP21814	Rio Tibagi	Londrina/Parana	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon ibitiensis</i>	PDtaq03	PDCAP21714	Rio Tibagi	Londrina/Parana	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon ibitiensis</i>	PDtaq02	PDCAP21614	Rio Tibagi	Londrina/Parana	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon ibitiensis</i>	PDtaq01	PDCAP21514	Rio Tibagi	Londrina/Parana	Brazil	

Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon guyanensis</i>	SU08-225	GBOL99316	Paloemeu River	Sipaliwini	Suriname
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon guyanensis</i>	SU08-180	GBOL979-16	Tapanahony River	Sipaliwini	Suriname
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon guyanensis</i>	GF15-421	GBOL2489-17	Tampok River	Maripasoula	French Guiana
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon sp.</i>	MK297314	GBMNE37574-21			
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apariodon cavalcante</i>	MK297303	GBMNE37559-21			
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apariodon cavalcante</i>	MK297302	GBMNE37560-21			
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apariodon cavalcante</i>	MK297301	GBMNE37561-21			
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apariodon cavalcante</i>	MK297300	GBMNE37562-21			
Parodontidae	<i>Saccodon</i>	<i>Saccodon dariensis</i>	stri4119	BSFFA535-07	Rio Capeti	Tuira	Panama
Parodontidae	<i>Saccodon</i>	<i>Saccodon dariensis</i>	stri-3598	BSFFA536-07	Rio Bayano	Tuira	Panama
Parodontidae	<i>Saccodon</i>	<i>Saccodon dariensis</i>	stri-6721	BSFFA53707	Rio Tuira	Tuira	Panama
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon vittatus</i>	MG827228	GBMNB4520-20		Parana	Brazil
	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon vittatus</i>	MG827227	GBMNB4519-20		Parana	Brazil
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon sp.</i>	MG827223	GBMNB4515-20	Aripuanã	Mato Grosso	Brazil
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon sp.</i>	MG827222	GBMNB4514-20	Aripuanã	Mato Grosso	Brazil
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon sp.</i>	MG827221	GBMNB4513-20	Aripuanã	Mato Grosso	Brazil
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon hilarii</i>	DCC01058	BSB358-10	Riacho Olaria/São Francisco	Minas Gerais	Brazil
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon hilarii</i>	DCC01059	BSB359-10	Riacho Olaria/São Francisco	Minas Gerais	Brazil
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon hilarii</i>	DCC01058	BSB360-10	Riacho Olaria/São Francisco	Minas Gerais	Brazil
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon affinis</i>	29065	LBPV2008040901	Paraiba do Sul Basin	São Paulo	Brazil
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon affinis</i>	29064	LBP2008040901	Paraiba do Sul Basin	São Paulo	Brazil
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon affinis</i>	29063	LBP2008040901	Paraiba do Sul Basin	Parana	Brazil
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon ibitiensis</i>	18635	LBP2005041501	Upper Parana Basin	Parana	Brazil
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon ibitiensis</i>	18632	LBP2005041501	Upper Parana Basin	Parana	Brazil
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon ibitiensis</i>	18634	LBP2005041501	Upper Parana Basin	Parana	Brazil
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon piracicabae</i>	34671	LBP2008082901	Upper Parana Basin	Parana	Brazil
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon nasus</i>	37820	LBP2009032704	Upper Parana Basin		
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon nasus</i>	20440	LBP2006041801	Upper Parana Basin		
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon nasus</i>	21804	LBP2006013001	Upper Parana Basin		
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon nasus</i>	20439	LBP2006041801	Upper Parana Basin		
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Paradon guyanensis</i>	SU08-225	GBOL993-16	Paloemeu River	Sipaliwini	Suriname

Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon guyanensis</i>	SU08-180	GBOL97916	Tapanahony River	Sipaliwini	Suriname	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon guyanensis</i>	SU08-226	GBOL369918	Tapanahony River	Sipaliwini	Suriname	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon guyanensis</i>	GF15-421	GBOL248917	Tampok River	Maripasoula	French Guiana	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon machrisi</i>	MK297315	GBMNE37568-21				
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon machrisi</i>	MK297316	GBMNE37567-21				
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon machrisi</i>	MK297318	GBMNE37565-21				
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon vittatus</i>	MG827229	GBMNB4521-20		Paraná	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon vittatus</i>	MG827228	GBMNB452020		Paraná	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon vittatus</i>	MG827227	GBMNB4519-20		Paraná	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon vittatus</i>	MG827226	GBMNB451820		Paraná	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon sp.</i>	MG827223	GBMNB4515-20	Aripuanã	Mato Grosso	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon sp.</i>	MG827222	GBMNB451420	Aripuanã	Mato Grosso	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon sp.</i>	MG827221	GBMNB4513-20	Aripuanã	Mato Grosso	Brazil	
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon sp.</i>	MG827220	GBMNB451220	Aripuanã	Mato Grosso	Brazil	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon magdalenensis</i>	MF415679	GBMIN97959-17	Rio Magdalena	Cimitarra	Colombia	6°34'37.2"N 74°34'37.2"W
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon magdalenensis</i>	MF415675	GBMIN9795817	Rio Magdalena	Cimitarra	Colombia	6°34'37.2"N 74°34'37.2"W
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon magdalenensis</i>	MF415678	GBMIN13328817	Rio Magdalena	Cimitarra	Colombia	6°34'37.2"N 74°34'37.2"W
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon magdalenensis</i>	MF415672	GBMIN133286-17	Rio Magdalena	Cimitarra	Colombia	6°34'37.2"N 74°34'37.2"W
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon nasus</i>	LBPV37820	LBP2009032704	Upper Parana Basin/Sapucaí	São Paulo	Brazil	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon nasus</i>	LBPV21804	LBP2006013001	Upper Parana Basin/Sapucaí	São Paulo	Brazil	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon nasus</i>	LBPV20440	LBP2006041801	Upper Parana Basin/Sapucaí	São Paulo	Brazil	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon apolinari</i>	TICT-FCA-281	FBCH165-21	Rio Guavio	Boyaca	Colombia	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon apolinari</i>	TICT-FCA-57	FBCH05921	Rio Chuy	Boyaca	Colombia	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon apolinari</i>	TICT-FCA-40	FBCH02621	Rio Upia	Boyaca	Colombia	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon magdalenensis</i>	9021 _ 5056	CIUA103821	Rio Guadalupe	Antioquia	Colombia	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon magdalenensis</i>	9017 _ 5055	CIUA103721	Rio Porce	Antioquia	Colombia	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon magdalenensis</i>	9018 _ 5055	CIUA103621	Rio Porce	Antioquia	Colombia	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon magdalenensis</i>	9020 _ 5056	CIUA103521	RioGuadalupe	Antioquia	Colombia	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon suborbitalis</i>	7671 _ 2973	CIUA102921	Rio Porce	Antioquia	Colombia	
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon suborbitalis</i>	7670 _ 2970	CIUA1027-21	Rio Porce	Antioquia	Colombia	

Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon suborbitalis</i>	7672 _ 2954	CIUA102521	Rio Porce	Antioquia	Colombia
Parodontidae	<i>Saccodon</i>	<i>Saccodon dariensis</i>	stri-6723	BSFFA88213	Rio Tuira	Darien	Panama
Parodontidae	<i>Saccodon</i>	<i>Saccodon dariensis</i>	stri-12280	BSFFA53807	Rio Aguas Claras	Tuira	Panama
Parodontidae	<i>Saccodon</i>	<i>Saccodon dariensis</i>	stri-6721	BSFFA537-07	Rio Membrillo	Tuira	Panama
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon hilarii</i>	DCC01144	BSB36010	Rio Curimatai/São francisco	Minas Gerais	Brazil
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon hilarii</i>	DCC01059	BSB35910	Riacho Olaria/são Francisco	Minas Gerais	Brazil
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon hilarii</i>	DCC01058	BSB35810	Riacho Olaria/são Francisco	Minas Gerais	Brazil
Parodontidae	<i>Apareiodon</i>	<i>Apareiodon ibitiensis</i>	DCC01183	BSB184-10	Rio Jabuticabas	Minas Gerais	Brazil
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon sp.</i>	DC 511	AMCC027-06	Rio Verde	Ichilo, Santa Cruz de la Sierra	Bolivia
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon sp.</i>	DC 496	AMCC01706	Rio La Chonta	Ichilo, Santa Cruz de la Sierra	Bolivia
Parodontidae	<i>Parodon</i>	<i>Parodon sp.</i>	DC 506	AMCC01606	Rio Macuucu	Ichilo, Santa Cruz de la Sierra	Bolivia