

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 27/02/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CÂMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia)

NADAYCA THAYANE BONANI MATEUSSI

**FILOGENÔMICA DE SERRASALMIDAE E ESTUDOS MORFOLÓGICOS E
MOLECULARES EM *CATOPRION* E *PYGOCENTRUS* (TELEOSTEI:
CHARACIFORMES)**

Botucatu/SP

2019

NADAYCA THAYANE BONANI MATEUSSI

**FILOGENÔMICA DE SERRASALMIDAE E ESTUDOS MORFOLÓGICOS E
MOLECULARES EM *CATOPRION* E *PYGOCENTRUS* (TELEOSTEI:
CHARACIFORMES)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho" como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Zoologia).

Área de concentração: Biodiversidade

Orientador: Dr. Claudio de Oliveira

Co-orientador: Dr. Bruno Francelino de Melo

Botucatu/SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Mateussi, Nadayca Thayane Bonani.

Filogenômica de Serrasalmidae e estudos morfológicos e moleculares em *Catoprion* e *Pygocentrus* (Teleostei: Characiformes) / Nadayca Thayane Bonani Mateussi. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Claudio de Oliveira
Coorientador: Bruno Francelino de Melo
Capes: 20405006

1. Código de Barras de DNA taxonômico. 2. Zoologia - Classificação. 3. Peixes - Identificação. 4. Filogenia.

Palavras-chave: DNA barcode; Elementos Ultraconservados; Sistemática; Taxonomia.

**A todos os professores que tive ao longo desse extenso caminho de aprendizagem,
da alfabetização à pós-graduação. A dedicação de cada um me trouxe até aqui.
É tudo culpa deles.**

“Everything in evolution makes better sense in the light of phylogenetics.”
(to paraphrase Dobzhansky 1973;
Sytsma & Pires 2001)

AGRADECIMENTOS

São muitas as pessoas e instituições que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho. Sou imensamente grata a cada uma delas, em especial:

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche que me permitiu fazer parte do doutorado no exterior.

À Universidade Estadual Paulista, ao Instituto de Biociências de Botucatu, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) e ao Departamento de Morfologia pela oportunidade e apoio logístico.

Ao Dr. Claudio de Oliveira, pela orientação em cada fase do projeto e apoio desde o mestrado, pela confiança e oportunidade.

Ao Dr. Bruno F. Melo pela coorientação, conselhos e amizade, essenciais para a minha formação.

Ao Dr. Patrice Pruvost por me receber no Museum National d'Histoire Naturelle durante o Doutorado Sanduíche e aos técnicos Zoha e Hugo por toda ajuda prestada. *Je vous remercie.*

Ao Dr. Fausto Foresti, pelos ensinamentos e exemplo.

Aos colaboradores e amigos Fábio Roxo e Luz Eneida Ochoa, pela disposição em ensinar, discutir e contribuir para o desenvolvimento da tese.

À Dra. Rafaela Ota, por ter me apresentado aos Serrasalmidae ainda no mestrado, pela amizade e pela disposição em colaborar comigo desde meu primeiro dia de iniciação científica (ainda ontem) até a finalização da presente tese.

Pelas visitas às instituições, empréstimo/doação de material, fotografias e/ou radiografias de exemplares, auxílio nas identificações, agradeço aos curadores, técnicos, alunos e demais pesquisadores e instituições: Mark Sabaj (ANSP), Francisco Villa (CZUT-IC), Juan Albornoz e Carlos DoNascimento (IAvH), Lúcia Rapp Py-Daniel e Shizuka Hashimoto (INPA), Flávio Bockmann (LIRP), Carlos Alberto Lucena (MCP-PUCRS), Patrice Pruvost (MNHN), Paulo Buckup (MNRJ), Alessio Datovo e Michel Gianeti (MZUSP), Anja Palandacick (NMW), Carla S. Pavanelli (NUP), Fernando Carvalho (UFMS), Marcelo Andrade (UFPA), Carolina Dória e Dayana Brito (UNIR).

A todos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, pelo companheirismo ao longo do doutorado, por toda ajuda, pelas conversas (produtivas ou não) e pelos momentos de descontração. Em especial a Aisni Mayumi, Beatriz Boza, Bruno Campos, Bruno Melo, Camila Souza, Cristhian Conde, Cristiane Shimabukuru Dias, Duflío Zerbinato, Fabilene Gomes, Fábio Roxo, Fernando Yuldi, Gabriel Costa e Silva, Giovana Ribeiro, Guilherme Costa Silva, Luz E. Ochoa, Jason J. Fernandez, Maria Lígia de Oliveira, Silvana Melo e Vanessa Paes.

A Camila Souza e Luz Ochoa pela paciência nos meus momentos de estresse com a tese, por toda a ajuda em solucionar os problemas de laboratório e pelo companheirismo. Se eu não perdi meu cabelo durante o doutorado foi graças a elas.

Aos meus amigos-família PDSE, Ana Paula Chorobura, Bruno C. Ribeiro, Diego Reis, Larissa Rézio, Luiz Arthur Faria, Juliana Mourão, Paula Bianchi, Rafael e Ruben Lemke, por transformarem uma grande experiência profissional em uma inesquecível experiência de vida. A Alexandre Arvigo, Alexandre Ribeiro, Aline Acosta, Bárbara Martins, Bruno Tayar, Eduardo dal Farra, Jairon Moura, Isabel Soares, Juliana De Biasi, Marciano Venâncio, Maria Isabel Muller e Mariana Antunes, por serem a minha família em Botucatu. Em especial, à Isabela Moraes por ser a melhor *housemate* que alguém poderia esperar; do hospital ao carnaval.

A todos os meus amigos, por todo carinho, companheirismo, apoio e sorrisos que sempre garantiram que eu estivesse bem amparada nesse caminho.

E, finalmente, à toda minha família, pelo carinho e suporte. Principalmente à minha base, meus pais Emerson Mateussi e Alessandra Bonani Mateussi e irmão Victor Hugo Bonani Mateussi, pelo apoio e amor incondicionais. E Isabela Cracco, por ser minha irmã de coração e estar sempre ao meu lado.

AVISO

Esta tese é parte dos requerimentos necessários à obtenção do título de Doutor 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, na sua presente forma, somente devem ser feitas com a aprovação prévia do autor.

NOTICE

This thesis is a partial requirement for the PhD 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.

Filogenômica de Serrasalminidae e estudos morfológicos e moleculares em *Catoprion* e *Pygocentrus* (Teleostei: Characiformes)

Resumo

A família Serrasalminidae é endêmica da região Neotropical, amplamente distribuída na América do Sul, e possui 97 espécies válidas distribuídas em 16 gêneros recentes e um fóssil. Embora a monofilia de Serrasalminidae seja bem estabelecida, assim como dos três clados que a compõe, várias relações entre os subgrupos são ainda conflitantes, há confusão sobre as posições dos gêneros dentro destes clados e restam dúvidas sobre a monofilia, composição e validade dos gêneros e espécies. Ainda, a imprecisão da descrição de muitas das espécies e seus atuais status taxonômicos dificultam o entendimento e o estudo para diversas áreas. Sendo assim, o presente trabalho visou elucidar as relações filogenéticas da família através de análises filogenômicas utilizando elementos ultraconservados (UCEs) e delimitar espécies de *Catoprion* e *Pygocentrus* através de análises integrativas, morfológicas e moleculares. Os resultados corroboram a monofilia da família, bem como dos três clados principais: (1) *Colossoma*, *Mylossoma* e *Piaractus*, (2) o “clado *Myleus*” formado por *Acnodon*, *Myleus*, *Mylesinus*, *Myloplus*, *Ossubtus*, *Tometes* e *Utiaritchthys* e (3) o “clado piranha”, composto por *Catoprion*, *Metynnis*, *Pristobrycon*, *Pygocentrus*, *Pygopristis* e *Serrasalmus*. As relações dentro do clado “*Colossoma+Mylossoma+Piaractus*” são bem suportadas, com *Piaractus* irmão do clado *Colossoma* e *Mylossoma*, sendo este clado grupo irmão de todos os outros serrasalmídeos. O “clado *Myleus*” apresenta gêneros não-monofiléticos, como *Myleus*, *Mylesinus*, *Myloplus*, *Tometes* e *Utiaritchthys*. E o “clado piranha” é recuperado como um grupo monofilético com *Metynnis* irmão das demais piranhas, os gêneros *Catoprion*, *Pygopristis* e *Pygocentrus* são monofiléticos enquanto *Serrasalmus* e *Pristobrycon* são parafiléticos. Análises moleculares de delimitação de espécies reconheceram três espécies previamente identificadas morfolologicamente em *Pygocentrus*; além de corroborar a existência de ao menos quatro populações estruturadas em *P. nattereri* ao longo de sua distribuição continental. E por fim, *Catoprion mento* foi redescrita e teve sua distribuição restrita às bacias dos rios Orinoco, alto Paraguai e tributários da margem direita do Amazonas; enquanto uma nova espécie foi descrita para as demais sub-bacias Amazônicas e o rio Essequibo. As espécies de *Catoprion* podem ser diagnosticadas por contagens de escamas e apresentam $7.3\% \pm 0.02$ de divergência genética (K2P).

Phylogenomics of Serrasalminae and morphological and molecular studies in *Catoprion* and *Pygocentrus* (Teleostei: Characiformes)

Abstract

Serrasalminae is an endemic Neotropical fish family, broadly distributed in South America, with 97 valid species allocated in 16 extant genera and one fossil. Even though the monophyly of the family is well established, as the formation of three major clades composing it, several aspects of relationships between subgroups are discordant among authors and are observed conflicts in the interrelationships and monophyly of some genera, and in the validity of some species. Furthermore, the imprecision of the species description and its current taxonomic status make it difficult the understanding and study for several areas. Thus, the present study aimed to elucidate the phylogenetic relationships within the family through a phylogenomic analysis using ultraconserved elements (UCEs) and to delimit species of *Catoprion* and *Pygocentrus* through morphological and molecular integrative analysis. The results corroborate the monophyly of family as well as the three main clades: (1) *Colossoma*, *Mylossoma* and *Piaractus*, (2) the “*Myleus* clade” composed by *Acnodon*, *Myleus*, *Mylesinus*, *Myloplus*, *Ossubtus*, *Tometes* and *Utiaritchthys*, and (3) the “piranha clade”, composed by *Catoprion*, *Metynnis*, *Pristobrycon*, *Pygocentrus*, *Pygopristis* and *Serrasalmus*. The relationships within the “*Colossoma+Mylossoma+Piaractus*” clade are well supported, with *Colossoma* and *Mylossoma* as sister group of *Piaractus*, and this clade sister to all other Serrasalminae. The “*Myleus* clade” contains several non-monophyletic genera as *Myleus*, *Mylesinus*, *Myloplus*, *Tometes* and *Utiaritchthys*. And the “piranha clade” is recovered as a monophyletic group with *Metynnis* as sister to the other genera, with *Catoprion*, *Pygopristis* and *Pygocentrus* monophyletic and *Serrasalmus* and *Pristobrycon* as paraphyletic. Molecular analyzes of species delimitation recognized three species previously identified morphologically in *Pygocentrus*; besides corroborating the existence of at least four populations structured in *P. nattereri* throughout its continental distribution. And finally, *Catoprion mento* was redescribed and had its distribution restricted to the Orinoco, Upper Paraguay, and right bank tributary of the Amazon basin; while a new species was described for the other Amazon sub-basins and the Essequibo River. *Catoprion* species can be diagnosed by counting of scales and present $7.3\% \pm 0.02$ genetic divergence (K2P).

SUMÁRIO

Introdução geral	11
A família Serrasalminidae	12
Filogenômica usando elementos ultraconservados	17
DNA barcoding	18
Justificativa	20
Objetivos	21
Bibliografia	22

Capítulo 1 – Phylogenomics of the Neotropical fish family Serrasalminidae (Ostariophysi: Characiformes) based on ultraconserved elements	28
1.1. Introduction.....	29
1.2. Material and methods	34
1.3. Results	40
1.4. Discussion	45
1.5. Bibliography	49

Capítulo 2 – Molecular species delimitation in the Piranha genus <i>Pygocentrus</i> (Characiformes: Serrasalminidae)	65
2.1. Introduction	67
2.2. Material and methods	70
2.3. Results	75
2.4. Discussion.....	78
2.5. Bibliography.....	81

Capítulo 3 – Species delimitation and taxonomic revision of <i>Catoprion</i> Müller & Troschel, 1844 (Characiformes: Serrasalminidae) with the description of a new species..	85
3.1. Introduction	87
3.2. Material and methods	88
3.3. Results	92
3.4. Discussion.....	111
3.5. Bibliography.....	113

Introdução Geral

Peixes constituem o grupo mais diverso e numeroso entre os vertebrados, com cerca de 35.000 espécies válidas e muitas ainda a serem descritas, com 417 novas espécies descritas somente em 2018 (Fricke *et al.* 2019). Mais de 40% desse grupo habita ambientes de água doce (Lowe-McConnell 1987), sendo que, nesse ambiente, a maior diversidade de espécies se encontra na região Neotropical (Vari & Malabarba 1998; Lundberg *et al.* 2000; Lévêque *et al.* 2008), com estimativas superiores a 8.000 espécies (Schaefer 1998; Reis *et al.* 2003, 2016). Nesse cenário, a maioria dos peixes de água doce Neotropicais estão distribuídos principalmente em cinco grupos dominantes: Characiformes (lambaris, piabas, piranhas, matrinhãs, curimbas, piaus, traíras, pacus, dourados, etc), Siluriformes (bagres e cascudos), Cichliformes (acarás, tucunarés, jacundás), Cyprinodontiformes (guarus e peixes anuais) e Gymnotiformes (tuviras, ituí, poraquês) (Rosa & Lima 2008).

Destes, Characiformes é a ordem de maior riqueza de espécies e inclui cerca de 2.200 espécies válidas distribuídas em 24 famílias (Fricke *et al.* 2019), compreende espécies herbívoras, iliófagas, lepidófagas, onívoras e carnívoras, variando desde alguns milímetros (e.g., *Priocharax*) até mais de um metro de comprimento (e.g., *Colossoma*). Os Characiformes podem ser diferenciados externamente dos demais grupos de peixes de água doce Neotropicais por possuírem o corpo coberto de escamas, apresentarem nadadeiras pélvicas em posição ventral, situadas, geralmente, bem atrás da inserção das nadadeiras peitorais, raios das nadadeiras moles (não transformados em espinhos pungentes) e, geralmente, a presença de uma nadadeira adiposa (Britski *et al.* 2007). Wiley & Johnson (2010) destacam sete sinapomorfias para o grupo, incluindo presença de foramen auditório proótico (*sensu* Weitzman 1962), presença de abertura dorsomedial na fossa pós-temporal, dentes de reposição para série externa do dentário ou alguns dentes do pré-maxilar formados em trincheiras ou criptas e dentes multicuspidados nas mandíbulas.

A família Serrasalmidae

Serrasalmidae, composta pelos popularmente conhecidos como pacus, piranhas e tambaqui, é uma das famílias de Characiformes, endêmica da região Neotropical, amplamente distribuída nos principais sistemas de rios da América do Sul, com ocorrência em todos os biótopos de água doce, exceto riachos muito estreitos e área bentônica de rios profundos (Jégu

2003), com registros de introdução intencional ou acidental em outros continentes (Hensel 2004; Caleta *et al.* 2011). Os serrasalmídeos podem ser identificados por um conjunto de caracteres, como corpo alto e comprimido, presença de uma serra ventral com espinhos oriundos da modificação de escamas e um espinho pré-dorsal, exceto em *Colossoma*, *Mylossoma* e *Piaractus*. Serrasalmidae agrega 97 espécies válidas distribuídas em 16 gêneros (Fricke *et al.* 2019), mais um gênero monotípico fóssil do Mioceno Superior, a †*Megapiranha paranensis* (Cione *et al.* 2009) (Tabela 1).

Tabela 1. Gêneros válidos e números de espécies válidas em Serrasalmidae (*sensu* Fricke *et al.* 2019).

Gênero	Espécies válidas
<i>Acnodon</i> Eigenmann, 1903	3
<i>Catoprion</i> Müller & Troschel, 1844	1
<i>Colossoma</i> Eigenmann & Kennedy, 1903	1
† <i>Megapiranha</i> Cione, Dahdul, Lundberg & Machado-Allison, 2009	1
<i>Metynnis</i> Cope, 1878	15
<i>Mylesinus</i> Valenciennes, 1850	3
<i>Myleus</i> Müller & Troschel, 1844	7
<i>Myloplus</i> Gill, 1896	12
<i>Mylossoma</i> Eigenmann & Kennedy, 1903	5
<i>Ossubtus</i> Jégu, 1992	1
<i>Piaractus</i> Eigenmann, 1903	2
<i>Pristobrycon</i> Eigenmann, 1915	5
<i>Pygocentrus</i> Müller & Troschel, 1844	3
<i>Pygopristis</i> Müller & Troschel, 1844	1
<i>Serrasalmus</i> Lacepède, 1803	27
<i>Tometes</i> Valenciennes, 1850	8
<i>Utiaritchthys</i> Miranda Ribeiro, 1937	3

Os Serrasalmidae apresentam grande importância econômica na América do Sul, tanto para a pesca de subsistência de populações ribeirinhas, principalmente na Amazônia, quanto para a pesca comercial (Ruffino 2004; Freeman *et al.* 2007; Ota *et al.* 2013) e aquicultura (Castagnolli 2000). Ademais, também apresentam valor na ornamentação, sendo apreciados

no aquarismo (e.g. mundopiranha.com), além de serem vendidas taxidermizadas como *souvenirs* (Freeman *et al.* 2007).

Embora o notório interesse popular despertado pela família devido a histórias e lendas propagadas em livros, filmes e músicas, ataques registrados a banhistas são ocasionais sendo raros aqueles causando danos mais sérios (Mol 2006). Assim, os reais danos causados por piranhas são maiores de fato à pesca, uma vez que atacam os peixes presos às redes, eliminando ou reduzindo seu valor comercial além dos danos causados ao próprio material de pesca (Agostinho *et al.* 1997). Ainda assim, apesar da importância e curiosidade voltados à família, o entendimento da sistemática do grupo permanece incipiente, restando muitas dúvidas sobre as atribuições de espécies e relações entre elas.

O *status* do grupo como Serrasalminae, subfamília de Characidae, ou Serrasalmidae, uma família separada, foi motivo de controvérsia entre pesquisadores ao longo dos anos; ainda que a monofilia seja consensual e bem estabelecida entre todos os autores (Machado-Allison 1983; Jégu 2004; Ortí *et al.* 1996, 2008; Thompson *et al.* 2014). Mais recentemente, estudos sugerem que os serrasalmídeos sejam mais proximamente relacionados a Anostomoidea do que a outras subfamílias de Characidae, de forma que atualmente o reconhecimento de Serrasalmidae como família é consensual e suportada por ambas hipóteses morfológicas e moleculares (Calcagnotto *et al.* 2005; Mirande 2010; Oliveira *et al.* 2011; Arcila *et al.* 2017).

A primeira espécie de serrasalmídeo a ter uma descrição formal foi *Salmo rhombeus* Linnaeus, 1766 (válida como *Serrasalmus rhombeus*), sendo a maioria das demais espécies descritas no século XIX e XX (Machado-Allison 2002; Jégu 2004). Pela falta de entendimento acerca da complexidade da ictiofauna Neotropical na época, as descrições frequentemente eram baseadas em poucos exemplares, sem atribuição precisa de localidade, sem exemplares tipo ou apenas com o tipo, entre outros problemas que contribuem enormemente para a confusão taxonômica da família (Machado-Allison 2002).

A primeira tentativa de classificação deste grupo foi realizada por Eigenmann (1915), que a dividiu em duas subfamílias dentro de Characidae: a subfamília Serrasalminae, composta por seis gêneros apresentando uma única série de dentes em ambas as maxilas; e Myleinae, composta por nove gêneros apresentando duas séries de dentes no pré-maxilar e frequentemente um par de dentes posterior à série labial da mandíbula. Subsequentemente, Norman (1929) uniu os dois grupos em uma única subfamília (Serrasalmoninae), baseado em caracteres morfológicos como abdômen quilhado e serrilhado, corpo alto e comprimido lateralmente, nadadeira dorsal longa e escamas pequenas. Gosline (1951) também considera

uma única subfamília, Serrasalminae, dentro de Characidae, reconhecendo *Mylossoma* e *Colossoma* (com *Piaractus*) formando um grupo separado dos demais pacus. Posteriormente, Géry (1972), com base nas séries de dentes, escamas, comprimento das nadadeiras dorsal, espinho pré-dorsal e espinhos ventrais, elevou o grupo a nível de família e a subdividiu em três subfamílias: Catoprioninae, Myleinae e Serrasalminae, diferindo na classificação de Eigenmann apenas por separar *Catoprion* em uma nova sub-família baseada na dentição singular do gênero. Géry (1972) também agrupou todas as piranhas em um único gênero, *Serrasalmus*, com cinco subgêneros.

Os agrupamentos dentro de Serrasalminidae foram propostos principalmente baseados na dentição (Eigenmann 1915). Partindo dessa observação, Gosline (1951) hipotetizou que os dentes de Myleinae (*i.e.* duas séries de dentes molariformes, sendo a externa com cinco e a interna com dois dentes) seriam derivados dos dentes de Tetragonopterinae; enquanto os dentes de Serrasalminae seriam derivados da condição de Myleinae, com a junção das duas fileiras e perda de um dente, formando assim a única fileira de seis dentes do pré-maxilar das piranhas, ao passo que a condição de *Catoprion* seria “aberrante”. Apesar de considerar a própria hipótese como lógica, o autor não argumenta contra ou a favor da mesma devido à inexistência de um caráter intermediário, posteriormente encontrado na descrição de †*Megapiranha paranensis* (Cione *et al.* 2009). O fóssil do Mioceno superior apresenta um arranjo truncado na disposição dos dentes do pré-maxilar (“zig-zag”), sendo considerado um padrão intermediário entre a condição de duas fileiras de dentes (pacus) e uma fileira de dentes encontrada (piranhas), sugerindo que o rearranjo dos dentes de um ancestral com duas fileiras de dentes poderia ter originado a linhagem com uma fileira. Porém, diferente da hipótese de perda de um dente durante a junção de Gosline (1951), Cione *et al.* (2009) argumentam a favor de uma fusão entre o quarto e quinto dentes da série externa dos Myleinae para a formação do sexto dente observado nas piranhas modernas.

Machado-Allison (1982) realizou o primeiro estudo cladístico de Serrasalminidae baseado em caracteres osteológicos, miológicos e de padrão de coloração. O autor considerou novamente o grupo como subfamília de Characidae e obteve uma filogenia que dividia o grupo em duas linhagens, a das piranhas, consistindo em *Catoprion*, *Metynnis*, *Pristobrycon*, *Pygocentrus*, *Pygopristis* e *Serrasalmus* e a dos pacus com *Acnodon*, *Colossoma*, *Mylesinus*, *Myleus*, *Mylossoma*, *Piaractus* e *Utiaritichthys*.

No primeiro estudo baseado em caracteres moleculares, Ortí *et al.* (1996) utilizaram sequências de genes ribossomais mitocondriais 12S e 16S para obter uma árvore com três cladogramas, o primeiro contendo *Colossoma*, *Mylossoma* e *Piaractus*, o segundo sendo o das

piranhas, com indicação de que *Serrasalmus* e *Pristobrycon* são polifiléticos, e um terceiro clado, chamado clado "*Myleus*" para incluir *Mylesinus*, *Myleus* e *Myloplus*. Nessa hipótese, *Acnodon* é recuperado como irmão dos clados *Myleus* e das piranhas, e o clado *Colossoma+Mylossoma+Piaractus* é o clado menos derivados irmão dos demais. Os três clados propostos por Ortí *et al.* (1996) foram recuperados em vários trabalhos posteriores, tanto morfológicos quanto moleculares, porém com diferenças significativas nas relações internas e com diferentes suportes estatísticos para a monofilia dos gêneros (Jégu 2004; Dahdul 2007; Freeman *et al.* 2007; Ortí *et al.* 2008; Thompson *et al.* 2014). Entre esses trabalhos, as maiores dúvidas são em relação à monofilia de alguns gêneros, como *Myleus*, *Pristobrycon* e *Serrasalmus*; enquanto os maiores problemas metodológicos se referem à baixa representação taxonômica e baixo suporte para alguns grupos, de forma que muitas das designações genéricas dos clados carecem de maior suporte ou são claramente contraditórias com os dados obtidos.

A filogenia mais recente da família (Thompson *et al.* 2014), realizada com abordagem multilocus (10 genes nucleares e a região controle do DNA mitocondrial), também recupera a relação do clado *Colossoma/Mylossoma/Piaractus* irmão do grande grupo com clado *Myleus*+clado piranha. No entanto, a baixa representatividade de espécies utilizadas (38 de um total de 97) impede uma maior compreensão das relações entre espécies de determinados gêneros. Além de uma reduzida matriz de dados moleculares comparada com as filogenias obtidas com dados filogenômicos, este trabalho ainda deixa várias lacunas sobre as relações entre gêneros e entre espécies, principalmente nos gêneros *Pristobrycon*, *Serrasalmus*, *Mylesinus*, *Myleus* e *Tometes*. Além disso, diferentes análises recuperam diferentes topologias, inviabilizando uma maior compreensão da posição de diversos gêneros, principalmente no clado *Myleus*.

Thompson *et al.* (2014) ainda sugerem que o clado das piranhas é muito mais recente (Mioceno, 15-20 Ma) que o restante da família, tendo começado a se diversificar durante o Cretáceo (65-75 Ma). Embora haja inconsistência quanto ao tempo estimado para a diversificação da família, todos os trabalhos com relógio molecular recuperam o tempo de origem da diversificação do clado piranhas como relativamente recente: 9 Ma (Hubert *et al.* 2007), 13,5 Ma (Cione *et al.* 2009) e 10 Ma (Melo *et al.* in prep.). Para Thompson *et al.* (2014), essa diversificação recente pode ser a causa da grande confusão entre os táxons, uma vez que os mesmos podem apresentar uma maior proximidade filogenética. Um exemplo dessa diversificação pode ser observado na única espécie fóssil de Serrasalmidae, do Mioceno

superior, †*Megapiranha paranensis*, que apresenta caracteres intermediários entre pacus e piranhas (Cione *et al.* 2009).

Baseado em diversos estudos prévios sobre Serrasalminae, Freeman *et al.* (2007) atribuíram a inconsistência nos estudos taxonômicos de Serrasalminae à (1) quantidade limitada de material comparativo, (2) ausência de caracteres externos confiáveis para a distinção das espécies, (3) ampla variação intraespecífica na morfologia e padrão de colorido, geralmente relacionados a mudanças ontogenéticas, estágio reprodutivo e influências ambientais, (4) sobreposição nos padrões de colorido e caracteres morfológicos entre diferentes espécies, (5) distribuição geográfica pouco conhecida, (6) espécies pobremente descritas, com material tipo em más condições, perdido ou inexistente, (7) provável existência de complexos de espécies, (8) incerteza sobre a alocação de algumas espécies em *Serrasalmus* e *Pristobrycon* e (10) existência de muitos sinônimos nunca avaliados detalhadamente. Como citado acima, há várias inconsistências taxonômicas na família, mais evidente em alguns gêneros como *Myleus* e *Serrasalmus*, em que a identificação das espécies é bastante incerta e confusa, dificultando qualquer trabalho filogenético, fisiológico ou ecológico que se almeje realizar.

Filogenômica usando elementos ultraconservados (UCEs)

Os elementos ultraconservados (*ultraconserved elements*, UCEs), como seu nome diz, são regiões do genoma extremamente conservadas, e assim compartilhadas entre grupos pertencentes a linhagens muito distintas filogeneticamente. Os UCEs foram primeiramente descritos por Bejerano *et al.* (2004), que encontraram cerca de 480 segmentos maiores de 200 pb que eram absolutamente (100%) conservados em regiões ortólogas de humanos e camundongos e altamente conservados nos genomas de galinhas e cachorros (95 e 99%, respectivamente). Os UCEs foram mais frequentemente localizados em regiões próximas a éxons envolvidos no processamento de RNA, íntrons, ou ainda próximos de genes envolvidos na regulação da transcrição e desenvolvimento (Bejerano *et al.* 2004). Ainda no mesmo estudo, Bejerano *et al.* (2004) relatam que além desses elementos, mais de 5000 sequências de cerca de 100 pb são também absolutamente conservadas entre humanos, ratos e camundongos, portanto, muito mais conservadas que as codificantes de proteínas. Estudos posteriores mostraram que esses UCEs também se encontram em outros vertebrados, insetos,

vermes e fungos (Siepel *et al.* 2005; Faircloth *et al.* 2012).

Embora seu papel no genoma ainda não seja totalmente esclarecido (Dermitzakis *et al.* 2005), os UCEs têm sido associados à regulação gênica (Pennacchio *et al.* 2006) ou no desenvolvimento (Sandelin *et al.* 2004; Woolfe *et al.* 2004) e tem-se assumido que são importantes pela natureza extremamente conservada ao longo da árvore da vida. Entretanto, os silenciamentos gênicos de locus UCEs em ratos resultaram em uma prole viável e fértil (Ahituv *et al.* 2007), sugerindo que seu papel no desenvolvimento dos organismos ainda necessita ser melhor estudado.

Faircloth *et al.* (2012) introduziram os UCEs como uma nova classe de marcadores moleculares em estudos filogenéticos através do enriquecimento de bibliotecas genômicas contendo centenas ou milhares de loci nucleares, utilizando sequenciamento de nova geração. Como as sequências UCEs são altamente conservadas, elas são utilizadas para o anelamento de sondas (*primers* ou *probes*), a partir das quais as sequências flanqueadoras dos UCEs são lidas. Desde então, os UCEs têm sido utilizados em muitos níveis de comparação entre organismos, de populações até grandes grupos como ordens. Assim, por exemplo, McCormack *et al.* (2013) analisaram mais de 1500 locus de UCEs de 32 espécies de Neoaves e encontraram novas relações entre alguns membros, como a relação próxima entre passarinhos e papagaios. McCormack *et al.* (2012) estudaram 183–917 loci em mamíferos placentários e encontraram uma boa resolução nas árvores obtidas, com resultados importantes para uma melhor compreensão da história evolutiva do grupo. Crawford *et al.* (2012) analisaram a posição das tartarugas com o uso de 1145 locus de UCEs e os resultados suportaram a hipótese de que as tartarugas evoluíram de um ancestral comum compartilhado por Archosauria (crocodilianos e aves), rejeitando assim a hipótese de relação entre as tartarugas e os Lepidosauria (lagartos, serpentes e tuataras).

O primeiro estudo utilizando UCEs para o entendimento de peixes, realizado por Faircloth *et al.* (2013), contou com o sequenciamento de 500 locus de cerca de 30 espécies de Actinopterygii, obtendo filogenias com nós totalmente resolvidos em todos níveis (recentes e antigos). Os resultados suportaram as relações entre *Amia* e *Lepisosteus* (Holostei) e revelaram que os Elopomorpha e depois os Osteoglossomorpha são as primeiras linhagens a divergir dentro de Teleostei. Burrell *et al.* (2018) utilizaram 5000 loci de UCEs para avaliar a diversificação de ciclídeos Neotropicais na bacia do rio Uruguai, encontrando um suporte robusto para a monofilia do grupo e aliando os resultados filogenômicos a análises de diversificação ecológica. Alfaro *et al.* (2018) utilizaram mais de 1000 loci no estudo de Acanthomorpha elucidando a relação de mais de 120 linhagens dentro do grupo, além de

apresentar novas hipóteses acerca do seu tempo de diversificação. Dessa maneira, é evidente que o uso de marcadores UCEs no estudo de grupos grandes e complexos, como os peixes de água doce neotropicais, tem se mostrado muito promissor.

DNA Barcoding

Técnicas moleculares têm se provado eficientes em estudos de biodiversidade, principalmente naqueles em que as ferramentas tradicionais são insuficientes ou incapazes de identificar espécies (Pereira *et al.* 2011). Assim, as sequências de DNA podem ser usadas como ferramenta auxiliar à taxonomia e delimitação de espécies, tanto corroborando evidências sobre hipóteses existentes ou como ponto de partida para novos testes (DeSalle *et al.* 2005).

Uma metodologia que tem se mostrado bastante eficiente na delimitação de grupos taxonômicos é o DNA *barcoding* utilizando sequências parciais do gene codificante mitocondrial *citocromo oxidase c subunidade I (COI)*, proposto por Hebert *et al.* (2003) como um método de identificação de espécies animais. Esta ferramenta fornece evidências sobre as Unidades Taxonômicas Operacionais (Operational Taxonomy Units - OTUs) através do reconhecimento de linhagens genéticas evidenciando novos grupos taxonômicos potenciais (Baldwin & Weigt 2012), suportando os estudos taxonômicos tradicionais e descrição de novas espécies, incluindo peixes de água-doce neotropicais (e.g., Benine *et al.* 2009; Melo *et al.* 2011; Silva *et al.* 2013; Costa-Silva *et al.* 2015).

A grande variação intraespecífica nas espécies de Serrasalmidae, principalmente no que diz respeito à alometria e padrões de coloração durante seu desenvolvimento ou estágio reprodutivo, resulta em uma grande dificuldade no reconhecimento dos limites entre as espécies. Assim, nos últimos anos, trabalhos envolvendo abordagens integrativas têm contribuído de forma significativa para a compreensão da diversidade de espécies na família. Mateussi *et al.* (2016) utilizaram o DNA *barcoding* na identificação de espécies cis-andinas de *Mylossoma*, sugerindo a subdivisão de *M. duriventre* (Cuvier, 1818) em quatro espécies e embasando a subsequente revisão taxonômica do gênero (Mateussi *et al.* 2018) e o reconhecimento de mais duas espécies. Andrade *et al.* (2017) utilizaram uma abordagem integrativa de dados morfológicos e moleculares para a descrição de uma nova espécie de *Tometes* contribuindo para a delimitação das espécies que compõem o gênero. Finalmente, Machado *et al.* (2018) analisaram mais de mil exemplares representando 69 espécies de

Serrasalminae de grandes bacias sulamericanas e reconheceram uma diversidade altamente subestimada para a família, identificando diversas linhagens não reconhecidas anteriormente. Assim, estes trabalhos confirmam a eficiência do método para o entendimento da família ao reafirmar que a utilização de abordagens baseadas no gene COI auxilia na identificação das espécies e permite uma maior discussão sobre os limites das espécies.

Nesse contexto, dois gêneros pertencentes ao clado das piranhas, *Catoprion* e *Pygocentrus*, carecem de estudos integrativos que suportem o reconhecimento e delimitação de suas espécies. *Catoprion* tem sido considerada monotípica desde sua descrição (Fricke *et al.* 2019) e, embora tenha sido hipotetizada anteriormente como um complexo de espécies (Taphorn 1992, 2003), carece de estudos conduzidos com exemplares representantes de toda sua área de ocorrência. *Pygocentrus* consiste em um gênero de piranha de grande interesse no aquarismo e interesse relativo na pesca regional, de importância principalmente nas comunidades ribeirinhas (Santos *et al.* 2006), com três espécies válidas atualmente (Fricke *et al.* 2019). Estudos para o gênero, apesar de representativos, focam apenas em populações de determinadas bacias e principalmente em uma única espécie, *P. nattereri* Kner, 1858 (Luz *et al.* 2015; Santos *et al.* 2016), de forma que a lacuna no conhecimento acerca do gênero é bastante evidente. Sendo assim, o DNA *barcoding* será utilizado no estudo de ambos os gêneros a fim de se elucidar as unidades taxonômicas que os compõem.

Justificativa

Várias análises filogenéticas morfológicas e moleculares foram realizadas para estabelecer relações intergenéricas e interespecíficas em Serrasalminae (Machado-Allison 1982; Ortí *et al.* 1996, 2008; Jégu 2004; Freeman *et al.* 2007; Thompson *et al.* 2014). Apesar da maioria destes estudos indicarem a monofilia dos clados que compõem a família, há controvérsias sobre a monofilia dos gêneros bem como sobre as relações entre eles. Além disso, observa-se, nos estudos já desenvolvidos, uma baixa representatividade de táxons além de um reduzido número de caracteres moleculares.

Sendo assim, embora muito se tenha avançado no entendimento de Serrasalminae no último século, a incongruência entre os resultados apresentados evidencia a necessidade de estudos adicionais, utilizando maior representatividade de táxons e de marcadores moleculares. Além disso, parte da inconsistência nos estudos taxonômicos de Serrasalminae se deve à ausência de caracteres morfológicos para a distinção das espécies, ampla variação

e/ou sobreposição nos padrões de colorido e caracteres morfológicos e existência de sinônimos e complexos de espécies nunca avaliados detalhadamente (Freeman *et al.* 2007). Ainda, é recorrente a perpetuação do reconhecimento de gêneros popularmente conhecidos e com poucos representantes, mas com ampla distribuição geográfica, como sendo monotípicas sem uma avaliação sobre sua variação ou assumindo-se que esta variação é muito maior do que de fato é. Portanto, a abordagem de gêneros, individualmente, almejando a resolução de problemas taxonômicos pontuais dentro de Serrasalmidae, é importante para melhor delimitar as espécies e auxiliar em estudos filogenéticos e taxonômicos posteriores.

Objetivos

Objetivo geral:

O principal objetivo deste trabalho foi inferir hipóteses de relacionamento entre os táxons constituintes de Serrasalmidae usando caracteres moleculares.

Objetivos específicos:

- 1) Testar a monofilia e relações entre os gêneros de Serrasalmidae com ampla representatividade de táxons e caracteres genômicos;
- 2) Delimitar espécies de *Pygocentrus* e detectar a existência de populações estruturadas e linhagens genéticas adicionais;
- 3) Realizar o estudo integrativo de dados morfológicos e moleculares e realizar uma revisão taxonômica de *Catoprion*.

Bibliografia:

- Agostinho C.S., Agostinho A.A., Marques E.E. & Bini L.M. (1997) Abiotic factors influencing Piranha attacks on netted fish in the upper Paraná river, Brazil. *North American Journal of Fisheries Management* 17, 712–718.
- Ahituv N., Zhu Y., Visel A., Holt A., Afzal V., Pennacchio L.A., *et al.* (2007) Deletion of Ultraconserved Elements Yields Viable Mice. *PLoS Biology* 5, e234.
- Alfaro M.E., Faircloth B.C., Harrington R.C., Sorenson L., Friedman M., Thacker C.E., *et al.* (2018) Explosive diversification of marine fishes at the Cretaceous–Palaeogene boundary. *Nature Ecology & Evolution* 2, 688–696.
- Andrade M.C., Machado V.N., Jégu M., Farias I.P. & Giarrizzo T. (2017) A new species of *Tometes* Valenciennes 1850 (Characiformes: Serrasalminidae) from Tocantins-Araguaia River Basin based on integrative analysis of molecular and morphological data. *PLoS ONE* 12, 1–21.
- Arcila D., Ortí G., Vari R., Armbruster J.W., Stiassny M.L.J., Ko K.D., *et al.* (2017) Genome-wide interrogation advances resolution of recalcitrant groups in the tree of life. *Nature Ecology and Evolution* 1, 1–10.
- Baldwin C.C. & Weigt L.A. (2012) A New Species of Soapfish (Teleostei: Serranidae: Rypiticus), with Redescription of *R. subbifrenatus* and Comments on the Use of DNA Barcoding in Systematic Studies. *Copeia* 2012, 23–36.
- Bejerano G., Pheasant M., Makunin I., Stephen S., Kent W.J., Mattick J.S., *et al.* (2004) Ultraconserved elements in the human genome. *Science* 304, 1321–1325.
- Benine R.C., Mariguela T.C. & Oliveira C. (2009) New species of *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) with comments on the *Moenkhausia oligolepis* species complex. *Neotropical Ichthyology* 7, 161–168.
- Britski H.A., Silimon K.Z. de S. & Lopes B.S. (2007) *Peixes do Pantanal: manual de identificação*, 2nd ed. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília. 184 p.
- 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, 14–30.
- Calcagnotto D., Schaefer S.A. & DeSalle R. (2005) Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36, 135–153.
- Caleta M., Tutman P., Buj I., Zanella D., Mustafic P., Marcic Z., *et al.* (2011) How was a

- Pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Serrasalminidae) introduced in Croatian freshwaters? *Cybium* 35, 259–261.
- Castagnolli N. (2000) Brazil fish culture. In: *Encyclopedia of Aquaculture*. (Ed. R.R. Stickney), pp. 123–128. John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Cione A.L., Dahdul W.M., Lundberg J.G. & Machado-Allison A. (2009) *Megapiranha paranensis*, a new genus and species of Serrasalminidae (Characiformes, Teleostei) from the upper Miocene of Argentina. *Journal of Vertebrate Paleontology* 29, 350–358.
- Costa-Silva G.J., Rodriguez M.S., Roxo F.F., Foresti F. & Oliveira C. (2015) Using different methods to access the difficult task of delimiting species in a complex neotropical hyperdiverse group. *PLoS ONE* 10, 1–12.
- Crawford N.G., Faircloth B.C., McCormack J.E., Brumfield R.T., Winker K. & Glenn T.C. (2012) More than 1000 ultraconserved elements provide evidence that turtles are the sister group of archosaurs. *Biology Letters* 8, 783–786.
- Dahdul W.M. (2007) *Phylogenetics and diversification of the Neotropical Serrasalminae (Ostariophysi: Characiformes)*. Faculties of the University of Pennsylvania. 107 p.
- Dermitzakis E.T., Reymond A. & Antonarakis S.E. (2005) Conserved non-genic sequences — an unexpected feature of mammalian genomes. *Nature Reviews Genetics* 6, 151–157.
- DeSalle R., Egan M.G. & Siddall M. (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360, 1905–1916.
- Eigenmann C.H. (1915) The Serrasalminae and Myleinae. *Annals of the Carnegie Museum* 9, 226–272.
- Faircloth B.C., McCormack J.E., Crawford N.G., Harvey M.G., Brumfield R.T. & Glenn T.C. (2012) Ultraconserved elements anchor thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary timescales. *Systematic Biology* 61, 717–726.
- Faircloth B.C., Sorenson L., Santini F. & Alfaro M.E. (2013) A Phylogenomic Perspective on the Radiation of Ray-Finned Fishes Based upon Targeted Sequencing of Ultraconserved Elements (UCEs). *PLoS ONE* 8, e65923.
- Freeman B., Nico L.G., Osentoski M., Jelks H.L. & Collins T.M. (2007) Molecular systematics of Serrasalminidae: Deciphering the identities of piranha species and unraveling their evolutionary histories. *Zootaxa* 38, 1–38.
- Fricke R., Eschmeyer W.N. & Fong J.D. (2019) Species by family/subfamily. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Electronic version accessed 09 Jan 2019.

- Fricke R., Eschmeyer W.N. & van der Laan R. (2019) Catalog of fishes: genera, species, references.
(<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>).
Electronic version accessed 09 Jan 2019.
- Géry J. (1972) Poissons Characoïdes des Guyanes. I. Généralités. II. Famille des Serrasalminidae. *Zoologische Verhandelingen* 122, 1–250.
- Gosline W.A. (1951) Notes on the characid fishes of the subfamily Serrasalminae. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 27, 17–64.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. & deWaard J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270, 313–321.
- Hensel K. (2004) First record of the pirapitinga *Piaractus brachypomus* (Actinopterygii: Serrasalminidae) in Slovakia. *Biologia* 59, 205–210.
- Hubert N., Duponchelle F., Nuñez J., Garcia-Davila C., Paugy D. & Renno J.F. (2007) Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: Implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology* 16, 2115–2136.
- Jégu M. (2003) Subfamily Serrasalminae. In: *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. (Eds R.E. Reis, S.O. Kullander & C.J. Ferraris), pp. 185–199. EDIPUCRS, Porto Alegre.
- Jégu M. (2004) *Taxonomie des Serrasalminae phytophages et Phylogénie des Serrasalminae (Teleostei: Characiformes: Characidae)*. Museum National d'Histoire Naturelle.
- Lévêque C., Oberdorff T., Paugy D., Stiassny M.L.J. & Tedesco P.A. (2008) Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia* 595, 545–567.
- Lowe-McConnell R.H. (1987) *Ecological studies in tropical fish communities*. Cambridge University Press, Cambridge. 382 pp.
- Lundberg J.G., Kottelat M., Smith G.R., Stiassny M.L.J. & Gill A.C. (2000) So Many Fishes, So Little Time: An Overview of Recent Ichthyological Discovery in Continental Waters. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 87, 26–62.
- Luz L.A., Reis L.L., Sampaio I., Barros M.C. & Fraga E. (2015) Genetic differentiation in the populations of red piranha, *Pygocentrus nattereri* Kner (1860) (Characiformes: Serrasalminae), from the river basins of northeastern Brazil. *Braz. J. Biol.* 75, 838–845.
- Machado-Allison, A. (1982). *Studies on the Systematics of the Subfamily Serrasalminae (Pisces-Characidae)*. Section II. National Museum of Natural History, Smithsonian, pp. 96–267.

- Machado-Allison A. (2002) Los Peces Caribes De Venezuela : Una Aproximación a Su Estudio Taxonómico. *Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales* LXII, 35–88.
- Machado V.N., Collins R.A., Ota R.P., Andrade M.C., Farias I.P. & Hrbek T. (2018) One thousand DNA barcodes of piranhas and pacus reveal geographic structure and unrecognised diversity in the Amazon. *Scientific Reports* 8, 1–12.
- Mateussi N.T.B., Oliveira C. & Pavanelli C.S. (2018) Taxonomic revision of the Cis-Andean species of *Mylossoma* Eigenmann & Kennedy, 1903 (Teleostei: Characiformes: Serrasalminidae). *Zootaxa* 4387, 275–309.
- Mateussi N.T.B., Pavanelli C.S. & Oliveira C. (2016) Molecular identification of cryptic diversity in species of cis-Andean *Mylossoma* (Characiformes: Serrasalminidae). *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis* 28, 778–780.
- McCormack J.E., Faircloth B.C., Crawford N.G., Gowaty P.A., Brumfield R.T. & Glenn T.C. (2012) Ultraconserved elements are novel phylogenomic markers that resolve placental mammal phylogeny when combined with species-tree analysis. *Genome Research* 22, 746–754.
- McCormack J.E., Harvey M.G., Faircloth B.C., Crawford N.G., Glenn T.C. & Brumfield R.T. (2013) A Phylogeny of Birds Based on Over 1,500 Loci Collected by Target Enrichment and High-Throughput Sequencing. *PLoS ONE* 8, e54848.
- Melo B.F., Benine R.C., Mariguela T.C. & Oliveira C. (2011) A new species of *Tetragonopterus* Cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae: Tetragonopterinae) from the rio Jari, Amapá, northern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 9, 49–56.
- Mirande J.M. (2010) Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): From characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology* 8, 385–568.
- Mol J.H. (2006) Attacks on humans by the piranha *Serrasalmus rhombeus* in Suriname. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 41, 189–195.
- Norman J.R. (1929) The South American Characid fishes of the subfamily Serrasalmoninae with a revision of the genus *Serrasalmus* Lacepede. *Proceedings of the Zoological Society of London* 52, 781–829.
- Oliveira C., Avelino G.S., Abe K.T., Mariguela T.C., Benine R.C., Ortí G., *et al.* (2011) Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology* 11, 275.
- Ortí G., Petry P., Porto J.I.R., JEGU M. & Meyer A. (1996) Patterns of nucleotide change in Mitochondrial Ribosomal RNA genes and the Phylogeny of Piranhas. *Journal of*

Molecular Evolution 42, 169–182.

- Ortí G., Sivasundar A., Dietz K. & Jégu M. (2008) Phylogeny of the Serrasalminae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. *Genetics and Molecular Biology* 31, 343–351.
- Ota R.P., Röpke C.P., Zuanon J. & Jégu M. (2013) Serrasalminae. In: *Peixes do rio Madeira v.II*. (Eds L.J. Queiroz, G. Torrente-Vilara, W.M. Ohara, T.H. da S. Pires, J. Zuanon & C.R. da C. Doria), pp. 14–48. Santo Antônio Energia, São Paulo - Brasil.
- Pennacchio L.A., Ahituv N., Moses A.M., Prabhakar S., Nobrega M.A., Shoukry M., *et al.* (2006) In vivo enhancer analysis of human conserved non-coding sequences. *Nature* 444, 499–502.
- Pereira L.H.G., Pazian M.F., Hanner R., Foresti F. & Oliveira C. (2011) DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paran Basin of Brazil. *Mitochondrial DNA* 22, 87–96.
- Reis R.E., Albert J.S., Di Dario F., Mincarone M.M., Petry P. & Rocha L.A. (2016) Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of fish biology* 89, 12–47.
- Reis R.E., Kullander S.O. & Ferraris-Jr. C.J. (2003) *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. 729 p.
- Rosa R.S. & Lima F.C.T. (2008) Peixes. In: *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*, 1st edn. (Eds A.B.M. Machado, G.M. Drummond & A.P. Paglia), pp. 8–285. MMA, Brasília, DF.
- Ruffino M.L. (2004) A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira. Manaus: Ibama/ProVárzea, 272 p.
- Sandelin A., Bailey P., Bruce S., Engström P.G., Klos J.M., Wasserman W.W., *et al.* (2004) Arrays of ultraconserved non-coding regions span the loci of key developmental genes in vertebrate genomes. *BMC Genomics* 5, 1–9.
- Santos C.H. dos A. dos, Leitão C.S. de S., Paula-Silva M. de N. & Almeida-Val V.M.F. (2016) Genetic differentiation in red-bellied piranha populations (*Pygocentrus nattereri*, Kner, 1858) from the Solimões-Amazonas River. *Ecology and Evolution* 6, 4203–4213.
- Santos G.M., Ferreira E.J.G. & Zuanon J.A.S. (2006) *Peixes comerciais de Manaus*. ProVárzea/Ibama, Manaus, 144 p.
- Schaefer S.A. (1998) Conflict and resolution: impact of new taxa on Phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (Eds L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena & Luce), pp. 375–400. EDIPUCRS, Porto Alegre.

- Siepel A., Bejerano G., Pedersen J.S., Hinrichs A.S., Hou M., Rosenbloom K., *et al.* (2005) Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Research* 15, 1034–1050.
- Silva G.S.C., Melo B.F., Oliveira C. & Benine R.C. (2013) Morphological and molecular evidence for two new species of *Tetragonopterus* (Characiformes: Characidae) from central Brazil. *Journal of Fish Biology* 82, 1613–1631.
- Taphorn D.C. (2003) *Manual de Identificación y Biología de los Peces Characiformes de la Cuenca del Río Apure en Venezuela*. BioCentro, Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales “Ezequiel Zamora,” Guanare, Venezuela, 393 p.
- Thompson A.W., Betancur R., López-Fernández H. & Ortí G. (2014) A time-calibrated, multi-locus phylogeny of piranhas and pacus (Characiformes: Serrasalminidae) and a comparison of species tree methods. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 81, 242–257.
- Vari R.P. & Malabarba L.R. (1998) Neotropical Ichthyology: An Overview. In: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (Eds L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena & Luce), pp. 1–11. EDIPUCRS, Porto Alegre.
- Weitzman S.H. (1962) The osteology of *Brycon meeki*, a generalized characoid fish, with a definition of the family. *Stanford Ichthyology Bulletin*. 8: 1–77.
- Wiley E.O. & Johnson D. (2010) A teleost classification based on monophyletic groups. In: *Origin and Phylogenetic Interrelationships of Teleosts*. (Eds. Nelson, J.S., Schultz, H.P. & Wilson, M.V.H.), pp. 123–182. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, Germany.
- Woolfe A., Goodson M., Goode D.K., Snell P., McEwen G.K., Vavouri T., *et al.* (2004) Highly Conserved Non-Coding Sequences Are Associated with Vertebrate Development. *PLoS Biology* 3, e7.