



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE
BOTUCATU DEPARTAMENTO DE
BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL**

Luís Ricardo Ribeiro da Silva

**DELIMITAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA IGUANODECTIDAE
(TELEOSTEI, CHARACIFORMES)**

**Botucatu / SP
Julho, 2020**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE
BOTUCATU DEPARTAMENTO DE
BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL**

**DELIMITAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA IGUANODECTIDAE
(TELEOSTEI, CHARACIFORMES)**

Aluno: Luís Ricardo Ribeiro da Silva

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

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 parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Luís Ricardo Ribeiro da.

Delimitação molecular de espécies da família
Iguanodectidae (Teleostei, Characiformes) / Luís Ricardo
Ribeiro da Silva. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Fausto Foresti

Coorientador: Bruno Francelino de Melo

Capes: 20405006

1. Peixes - Distribuição geográfica. 2. Biodiversidade.
3. Taxonomia. 4. DNA - Análise.

Palavras-chave: Biodiversidade; DNA Barcoding;
Sistemática; Taxonomia.

“ Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes ”
Isaac Newton

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder o dom da vida, a toda a minha família em especial a minha mãe Luzia que sempre foi um grande exemplo de força e esperança, que sempre me ensinou a acreditar que tudo pode dar certo mesmo que a dificuldade possa querer nos provar o contrário.

Aos amigos de longa data que mesmo estando longe nunca deixaram de torcer e acreditar em mim, Wagner Luiz Neto, Maria de Lourdes, Valdinei (Ney), Juliano Del Nino, a vocês o meu muito obrigado.

A Débora Diniz, pessoa pela qual tenho profunda admiração e carinho, que sempre me incentivou e acreditou em mim, por estar comigo nas maiores dificuldades e provações, eternamente grato a você.

Ao meu orientador Prof^o Dr. Fausto Foresti, pelo qual tenho profunda admiração e respeito. Muito obrigado pela orientação, conselhos, apoio, e por acreditar em mim e em meu trabalho.

Ao meu co-orientador Dr. Bruno Melo, muito obrigado pelo apoio, conselhos e todo o conhecimento passado, por não medir esforços na realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Cláudio Oliveira, pelo exemplo de pesquisador. Por abrir abriu a portas do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP). Muito obrigado pelas conversas, conselhos e amizade.

A Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), pelo apoio e condições para a realização desta pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de tempo para avaliar e contribuir para este trabalho.

Aos amigos da Rep 5 de paus Brunão, Fabio (Kuika), Cristhian (James), Lucas, Cristian Araya (Chile), Felipe (Limão), Bruno (Gambá) e todos aqueles que fizeram e ainda fazem parte da Rep e que foram durante este período a extensão de minha casa e minha

segunda família.

Aos amigos que fiz ao longo deste tempo e que contribuíram significativamente para o meu trabalho e a minha formação Dr. Fábio Roxo e Dr. Gabriel e Dra. Rafaela Ota, muito obrigado pelo apoio e amizade.

Ao grande amigo Renato Devidé, pelas conversas, pelos cafés e viagens de coleta, muito obrigado meu grande amigo.

Aos amigos do LBP a vocês o meu muito obrigado!

RESUMO

Iguanodectidae é uma família de Characiformes representada pelos gêneros *Bryconops*, *Iguanodectes* e *Piabucus*, contendo 35 espécies amplamente distribuídas na América do Sul cisandina. Estudos sobre as relações filogenéticas e padrões filogeográficos em Iguanodectidae são escassos e grande parte do conhecimento sobre esse grupo está restrito às descrições originais usando caracteres morfológicos, com diagnoses muitas vezes, sutis e imprecisas para delimitar espécies. Este trabalho teve como objetivo estudar a biodiversidade de espécies na família Iguanodectidae, realizar a identificação e delimitação molecular de espécies em *Iguanodectes* e *Piabucus*, e analisar comparativamente dados morfológicos. Para isso, foi utilizado um total de 30 espécimes de *Piabucus* e *Iguanodectes* e a técnica de *DNA barcoding* com métodos de análise de delimitação de espécies. Além disso, também foram feitas análises de morfometria geométrica em 65 espécimes representando quatro espécies de *Iguanodectes*. Os resultados delimitaram quatro possíveis espécies em *Piabucus* evidenciando uma segunda linhagem de *P. melanostoma* e nove em *Iguanodectes*, incluindo quatro linhagens distintas de *I. spilurus*. Os resultados também mostraram *I. geisleri* como uma espécie totalmente distinta molecular e morfológica e que as demais espécies de *Iguanodectes* estão mais próximas de *Piabucus* do que de *I. geisleri*. As análises mostraram que estudos posteriores com *Bryconops* podem auxiliar no entendimento da diversidade de espécies nesse gênero, contribuindo assim, com o avanço na sistemática de Iguanodectidae, e embasando futuros estudos genético-populacionais, taxonômicos e filogenéticos na família.

PALAVRAS-CHAVE: Biodiversidade, *DNA Barcoding*, sistemática, taxonomia.

ABSTRACT

Iguanodectidae is a family of Characiformes represented by the genera *Bryconops*, *Iguanodectes* and *Piabucus*, containing 35 species widely distributed in Cisandine South America. Studies on phylogenetic relationships and phylogeographic patterns in Iguanodectidae are scarce and much of the knowledge about this group is restricted to the original descriptions using morphological characters, with diagnoses that are often subtle and imprecise to delimit species. This work aimed to study the biodiversity of species in the Iguanodectidae family, to carry out the identification and molecular delimitation of species in *Iguanodectes* and *Piabucus*, and to analyze comparatively morphological data. For this, a total of 30 specimens of *Piabucus* and *Iguanodectes* were used and the DNA barcoding technique with methods of analysis of species delimitation. In addition, analyzes of geometric morphometry were also performed on 65 specimens representing four species of *Iguanodectes*. The results delimited four possible species in *Piabucus* showing a second strain of *P. melanostoma* and nine in *Iguanodectes*, including four distinct strains of *I. spilurus*. The results also showed *I. geisleri* as a totally different molecular and morphologically distinct species and that the other species of *Iguanodectes* are closer to *Piabucus* than to *I. geisleri*. The analyzes showed that further studies with *Bryconops* can help in understanding the diversity of species in this genus, thus contributing to the advancement of the Iguanodectidae system, and supporting future population, taxonomic and phylogenetic studies in the family.

KEYWORDS: Biodiversity, DNA Barcoding, systematics, taxonomy.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A ordem Characiformes e a família Iguanodectidae	1
1.2. Diversidade de Espécies em Iguanodectidae	3
1.3. <i>DNA barcoding</i> e suas aplicações	4
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo geral	8
2.2. Objetivos específicos	8
CAPÍTULO 1: Identificação molecular de espécies de peixes Neotropicais dos gêneros <i>Piabucus</i> e <i>Iguanodectes</i> (Characiformes, Iguanodectidae)	
INTRODUÇÃO	9
MATERIAIS E MÉTODOS	
Amostragem	13
Extração do DNA, amplificação e sequenciamento	15
Alinhamento e análises de delimitação de espécies	16
Análise de componentes principais (PCA)	17
RESULTADOS	17
DISCUSSÃO	24
CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1:** Distribuição das linhagens de *Iguanodectes* e *Piabucus* nas bacias hidrográficas 11
- Figura 2:** Representantes de oito linhagens de *Iguanodectes*: a) *I. adujai*, b) *I. geisleri*, c) *I. gracilis*, d) *I. spilurus*-Tapajós, e) *I.aff. spilurus*-Nanay, f) *I.aff. spilurus*-Jari, g) *I.aff. spilurus*-Javari, h) *Iguanodectes.sp.*-Tocantins. O exemplar "b" representa *I. geisleri* proposto por Géry (1970) como subgênero *Iguanobrycon* devido as seguintes diferenças morfológicas: origem da nadadeira dorsal anterior ao meio do corpo, e nadadeira anal mais curta 12
- Figura 3:** Melhor árvore de máxima verossimilhança de Iguanodectidae com base no gene *citocromo c oxidase subunidade I* obtida pelo RAxML. Valores entrenós representam porcentagens de *bootstrap* 20
- Figura 4:** Árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) de Iguanodectidae com base no gene *citocromo c oxidase subunidade I*. Valores entrenós representam porcentagens de *bootstrap* 21
- Figura 5:** Gráfico de dispersão da Análise de Componentes Principais (PCA) de sete linhagens de *Iguanodectes* (n = 65), indicando a presença de variação contínua da morfologia externa 23

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1: Exemplares da família Iguanodectidae pré-identificadas e depositadas no LBP com informações de vouchers e localidade..... 14

TABELA 2: Valores de distância genética K2P \pm a variância de 1000 pseudo-réplicas de bootstrap entre as linhagens de *Iguanodectes* e *Piabucus* analisadas. Valores transversais em negrito representam distância genética intraespecíficas..... 19

TABELA 3: Variâncias no primeiro e segundo eixos da análise de componentes principais sem tamanho (eixo 1 e eixo 2) de amostras combinadas de *Iguanodectes* valores em negrito representam as medidas com as maiores variações..... 22

1. INTRODUÇÃO

1.1. A ordem Characiformes e a família Iguanodectidae

A ordem Characiformes é um dos maiores e mais diversificados grupos de peixes de água-doce do mundo, com mais de 2.240 espécies válidas distribuídas em 287 gêneros e 24 famílias (Fricke et al., 2020). Grande parte da diversificação dos peixes Characiformes, Siluriformes e Gymnotiformes data do Cretáceo com origem há cerca de 112 milhões de anos atrás (Lundberg et al., 1998). Estudos realizados por Near et al. (2012) e Arroyave et al. (2013), utilizando registro fóssil com datação e relógios moleculares, corroboraram a origem da diversificação dos Characiformes no período Cretáceo há mais de 110 milhões de anos atrás.

Atualmente, Characiformes possui ampla distribuição nas maiores drenagens da África, América do Sul e Central, desde a Patagônia até o sul dos Estados Unidos (Reis et al., 2003). Essa notável diversificação reflete uma longa e complexa história biogeográfica, incluindo a separação de continentes e uma história geomorfológica das bacias hidrográficas envolvendo a Cordilheira dos Andes, e os Escudos Brasileiros e das Guianas (Lundberg et al., 1998; Ribeiro, 2006; Albert & Reis., 2011). Nos últimos 10 anos, mais de 300 espécies de Characiformes foram descritas (Fricke et al., 2020), mesmo assim, muitas ainda devem ser descobertas e descritas (Mirande, 2019). A maior diversidade dessa ordem, está distribuída na região Neotropical em suas principais bacias hidrográficas, ocupando uma série de ecossistemas que vão desde rios e córregos lênticos à remansos de planícies de inundação (Junk et al., 1989, Goulding et al., 2003.).

A bacia amazônica é o maior sistema hidrográfico do mundo (Goulding et al., 2003) possuindo uma grande riqueza de fauna e flora (Webb, 1995; Patton et al., 2000; Hoorn e Wesselingh, 2010; Cardoso et al., 2017). Dentro desta riqueza de fauna, destaca-se uma grande diversidade de peixes com estratégias reprodutivas adaptadas a esses diversos habitats aquáticos (Junk et al., 1989, Barthem e Goulding, 2007, Dagosta e De Pinna 2019). Existe também diferenças no tamanho corporal desses indivíduos, variando desde espécies miniatura (Weitzman & Vari, 1988) a espécies de médio e grande porte. Esses peixes possuem uma grande importância ecológica e econômica, para uso em atividades pesqueiras, aquarofilia ou servindo como alimento para populações ribeirinhas (Barthem e Goulding, 2007; Goulding et

al., 2018, Almeida et al., 2004).). Além da notável variedade de formas e tamanhos, exibem hábitos alimentares diversificados, como espécies herbívoras, detritívoras, lepidófagas, carnívoras e onívoras (Géry, 1977; Goulding, 1980; Sazima, 1983; Goulding et al., 1988; Reis et al., 2003; Nelson, 2006; Mirande, 2018; Burns & Sidlauskas, 2019).

Visto do relativamente baixo número de estudos realizados na bacia amazônica muito do conhecimento sobre a diversidade de peixes é subestimada (Dagosta & De Pinna, 2019), especialmente para os peixes de pequeno porte, como por exemplo os peixes da família Iguanodectidae. Iguanodectidae é a oitava família mais diversa de Characiformes Neotropicais, apesar de ser representada por apenas três gêneros, distribuídos pelas bacias do Amazonas, Orinoco, Essequibo, São Francisco e Paraná-Paraguai, e nos rios costeiros da Venezuela, Guianas, e nordeste do Brasil (Van der Sleen & Moreira, 2017). Dois dos três gêneros, *Iguanodectes* e *Piabucus*, são representados por peixes pequenos de corpos alongados com dentes multicuspidados, membranas branquiais unidas e livres do istmo, extremidade posterior da maxila não se estendendo até o olho, origem da nadadeira dorsal geralmente posterior ao meio do corpo (exceto em *I. geisleri*) e nadadeira anal longa (exceto em *I. geisleri*) (Moreira, 2003). Além disso, alguns caracteres anatômicos internos também são diagnósticos, como a presença de um processo na face interna do dentário, o primeiro pterigióforo da nadadeira anal proximal expandido e recurvado posteriormente, e a porção anterior da câmara posterior da bexiga natatória menos espessa que sua porção posterior (Moreira, 2003). O gênero *Piabucus* se distingue de *Iguanodectes* pela presença de uma nadadeira peitoral longa, quase atingindo a origem da nadadeira pélvica e uma quilha peitoral bem desenvolvida (Borba et al., 2013). *Bryconops* se distingue dos demais gêneros por possuir margem ventral da maxila com uma curva acentuada posteriormente, de quase 90°, se estendendo além da articulação do quadrado e articular (Chernoff & Machado-Alisson, 1999)

A família Iguanodectidae, apresenta atualmente três gêneros, *Iguanodectes* (oito espécies), *Piabucus* (três espécies) e *Bryconops* (24 espécies). A taxonomia da família ainda é bastante complexa e restrita às descrições originais. Essa complexidade em Iguanodectidae tem sido debatida, sendo inicialmente proposta como subfamília por Eigenmann e Myers (1929). Anteriormente, Oken (1817) descreveu o gênero *Piabucus* e Cope (1872) descreveu *Iguanodectes* para alocar *I. tenuis*, não fazendo referência a *Piabucus* e associando *Iguanodectes* a *Tetragonopterus*. Posteriormente, Eigenmann & Myers (1910), com base em caracteres morfológicos, associam *Piabucus* a *Iguanodectes*, e propõem a subfamília Iguanodectinae (Eigenmann & Myers, 1929). Em 1970, Géry revisa o gênero *Iguanodectes*,

descreve *I. adujai* e *I. geisleri*, e propõe o subgênero *Iguanobrycon* para alocar *I. geisleri* devido às enormes diferenças morfológicas encontradas em relação a outros *Iguanodectes* como, por exemplo, anal curta, posterior a nadadeira dorsal que se encontra no meio do corpo e não atrás como encontrado em outros *Iguanodectes*, dentes ausentes na maxila, que é relativamente alongado; dois dentes pré-maxilares (externos e 5 mandibular; suborbital grande semelhante ao da maioria dos Characidae; linha lateral incompleta (Géry, 1970). Géry também argumenta sobre alguns caracteres tais como: forma da maxila e a posição da dorsal, que poderiam ser consideradas características primitivas ou generalizadas em relação aos outros *Iguanodectes*, enquanto que alguns caracteres seriam bastante especializados e outros se encontrariam em processo de regreção como por exemplo os dentes e a nadadeira anal (Géry, 1970). A argumentação de Géry foi que caracteres usados para o diagnosticar os *Iguanodectinae* também ocorreriam isoladamente em outros gêneros de *Tetragonopterinae* o que não justificava manter o grupo como subfamília, mudando assim o status para tribo *Iguanodectini* em *Tetragonoperinae*. Vari (1977) descreveu *Piabucus caudomaculatus* e propôs três caracteres sinapomórficos associados à bexiga natatória: 1) seção posterior da câmara posterior levemente comprimida; 2) redução da espessura dos miótomos na região da parede corporal; 3) primeiro pterigóforos da nadadeira anal e sua posição em relação à primeira coluna vertebral. suportando assim a monofilia de *Iguanodectinae* e considerando as mudanças proposta por Géry, 1970 para redução da subfamília a nível de tribo eram subjetivas, mantendo assim a categoria de subfamília. Com base em dados moleculares, Oliveira et al. (2011) propuseram que o gênero *Bryconops* estivesse mais relacionado a *Iguanodectes* e *Piabucus* do que com demais gêneros de Characidae, elevando assim o status do grupo para família *Iguanodectidae*. Atualmente, hipóteses sobre as relações filogenéticas suportam a monofilia de *Iguanodectidae* e a relação com *Acestrorhynchidae* dentre outras famílias de Characiformes (Oliveira et al., 2011; Mirande, 2019; Betancur-R et al., 2019).

1.2. Diversidade de espécies em *Iguanodectidae*

Iguanodectes possui oito espécies distribuídas ao longo das bacias dos rios Amazonas, Orinoco e rios costeiros das Guianas: *I. adujai* Géry, 1970 (Negro e Orinoco), *I. geisleri* Géry, 1970 (Madeira, Negro e Orinoco), *I. gracilis* Géry, 1993 (Negro), *I. polylepis* Géry, 1993 (Madeira e Purus), *I. purusii* (Steindachner, 1908) (Amazonas), *I. rachovii* Regan, 1912 (Amazonas), *I. spilurus* (Günther, 1864), (Amazonas, Essequibo e Orinoco), e *I. variatus*

Géry, 1993 (Branco, Guaporé, Trombetas e Urubu).

O gênero *Piabucus*, por outro lado, possui apenas três espécies válidas: *P. caudomaculatus* Vari, 1977 (Mamoré), *P. dentatus* (Koelreuter, 1763) (Guianas, baixo Amazonas e nordeste do Brasil) e *P. melanostoma* Holmberg, 1891 (Madeira e Paraguai). *Piabucus melanostoma* é a única espécie de Iguanodectidae encontrada na bacia do rio Paraguai, incluindo o Pantanal (Britski et al., 2007; Borba et al., 2013).

Há uma grande falta de trabalhos inclusivos que testem relacionamentos dentro de Iguanodectidae e não existem revisões taxonômicas publicadas para *Piabucus*. A de *Iguanodectes* é de Gery (1970, 1993). As últimas descrições de *Piabucus* e *Iguanodectes* são de Vari (1977) e Géry (1993), respectivamente. Da mesma forma, não existem trabalhos que buscam investigar a diversidade genética de espécies da família. As informações genéticas encontradas na literatura estão relacionadas basicamente ao número haplóide ($n = 25$) em *I. spilurus* Günther, 1864, estimativas do conteúdo de DNA nuclear em *P. melanostoma* (Carvalho et al., 2002) e um estudo de citogenética clássica e molecular em populações de *P. melanostoma* do Rio Paraguai e Rio Bento Gonçalves, ambos no Mato Grosso (Silva et al., 2011). Neste estudo, foi demonstrado que as espécies dessas duas localidades apresentam número diplóide de $2n=50$, padrão de heterocromatina constitutiva conservado e um polimorfismo de tamanho no sítio dos genes ribossomais 18S (Silva et al., 2011).

Mediante poucos estudos taxonômicos e diversidade claramente subestimada em Iguanodectidae, com o número de espécies descritas na última década (8) somado à descoberta de espécies com a combinação de ferramentas moleculares e morfológicas, estudos de delimitação de espécies combinados com análises morfológicas podem esclarecer dúvidas sobre os limites de espécies e sobre a biodiversidade molecular em Iguanodectidae.

1.2. DNA barcoding e suas aplicações

O *DNA barcoding* tem sido um método universal utilizado para a identificação molecular de espécies com enormes bancos de dados disponíveis online (ex. BOLD, GenBank). Hebert et al. (2003) propuseram o uso de uma ferramenta para identificação de espécies de grupos animais, que seria uma sequência curta (650 pb) do DNA mitocondrial, o gene *citocromo c oxidase subunidade I* (COI), podendo separar as espécies animais através da variação genética interespecífica e intraespecífica (Hajibabaei et al., 2007; Toffoli et al., 2008) e com base nas diferenças em suas sequências (Hebert et al., 2003). A sequência de

COI seria considerada um “código de barras” genético e específico para cada espécie, sendo esperado alguma divergência nessa região durante a história evolutiva de diferentes táxons (Souza et al., 2015). Essa técnica de código de barras ficou então conhecido como *DNA barcoding*.

O *DNA barcoding* permitiria também progredir extensivamente os estudos taxonômicos tradicionais (Gregory, 2005), ajudando os taxonomistas com rápidas e precisas identificações de espécies usando regiões genéticas curtas e padronizadas como tags internos. O principal objetivo é a criação de bibliotecas de código de barras de DNA para serem usadas como referência para espécies conhecidas e usadas como identificadores de DNA (Kerr et al., 2007; Hubert et al., 2008), sendo assim uma ótima ferramenta (Rubinoff & Holland, 2005), que tem acelerado de modo muito positivo a descoberta e descrições de novas espécies (DeSalle, 2006).

O advento da técnica de *DNA barcoding* não excluiu a confiança nos diagnósticos morfológicos, que devem ser mantidos (Hebert et al., 2003), mas a identificação morfológica possui algumas limitações, dentre elas: plasticidade fenotípica dos caracteres empregados para o reconhecimento de espécies que podem levar à identificações incorretas (Hebert et al., 2003), o não-reconhecimento de espécies crípticas que são comuns em muitos grupos (Knowlton, 1993; Jarman & Elliott, 2000; Melo et al., 2016), e chaves morfológicas frequentemente eficazes para um estágio de vida específico (ex. adultos). Muitos indivíduos não podem ser identificados e discriminar espécies baseadas apenas em características morfológicas é particularmente difícil para alguns grupos, como por exemplo peixes, devido à sua riqueza de espécies (Leveque et al., 2008) que possuem uma plasticidade fenotípica notável (Wimberger, 1992) e alto número de complexos de espécies (Piggott et al., 2011).

Muitos estudos têm mostrado a sua eficácia na identificação de espécies em diferentes grupos de animais. O *DNA barcoding* tem se destacado principalmente em estudos taxonômicos, devido a sua capacidade de evidenciar linhagens genéticas com possíveis problemas taxonômicos, com questões de longa data que precisam ser esclarecidas, assim como a identificação de novas espécies (Victor, 2007, 2010; Baldwin et al., 2009, 2011; Tornabene et al., 2010; Baldwin & Weigt, 2012).

Outras aplicações da metodologia de *DNA barcoding* incluem o rastreamento de fontes populacionais de espécies invasoras (Corin et al., 2007), investigações forenses em animais selvagens (Dawnay et al., 2007; Nelson et al., 2007), ecologia de comunidades enigmáticas (Corin et al., 2007; Pfenninger et al., 2007) e identificação de presas a partir do conteúdo estomacal (Pons, 2006), aves (Hebert et al., 2004), borboletas (Janzen et al., 2009),

répteis (Nagy et al., 2012), peixes (Ward et al., 2005), e também com benefícios para ecólogos, conservacionistas e a diversidade de agências encarregadas do controle de pragas, espécies invasoras e segurança alimentar (Hebert & Gregory, 2005).

Com o surgimento das técnicas moleculares, os resultados encontrados nos estudos taxonômicos foram reforçados (Baldwin & Weigt, 2012), apontando a necessidade de reanalisar as classificações de espécies existentes de muitos grupos animais. A associação desses estudos em combinação com análises morfológicas tradicionais resultaram no reconhecimento de inúmeras novas espécies (e.g., Crawford et al., 2010, Hebert et al., 2004, Pauls et al., 2010, Pöppe et al., 2010, Ward et al., 2008, Zemplak et al., 2009, Baldwin et al., 2011, Machado et al., 2018, Wang et al., 2020).

Muitas iniciativas utilizando a metodologia do DNA barcoding foram realizadas para identificar a fauna de peixes, como na Austrália (Ward et al., 2005), Canadá (Hubert et al., 2008), África (Nwani et al., 2011), bem como em bacias hidrográficas brasileiras abrangendo o rio São Francisco (Carvalho et al., 2011), rio Paraíba do Sul (Pereira et al., 2011) e alto rio Paraná (Pereira et al., 2013), com uma taxa de sucesso na discriminação das espécies estudadas variando de 95 a 100%. Análises integrativas conciliando o código de barras com análises merísticas mostraram-se bastante úteis não apenas para sinalizar espécies potencialmente negligenciadas ou unidades taxonômicas operacionais (OTUs), mas também para indicar novas espécies potenciais (ou seja, espécies candidatas) (Gomes et al., 2015). Outros estudos ainda sugerem que as faunas tropicais contêm uma grande proporção de espécies não descritas que escaparam à detecção em avaliações baseadas apenas em morfologia (i.e., espécies crípticas *sensu* Mayr, 1942) (Fouquet et al., 2007, Murray et al., 2011; Melo et al., 2016), onde uma diversidade enigmática de espécies foram classificadas como uma única espécie nominal porque são morfologicamente indistinguíveis (Bickford et al., 2007), sendo interessante então um inventário baseado em dados de sequências de DNA (Escobar-Camacho et al., 2015). A técnica do *DNA barcoding* tem se mostrado viável e eficaz para identificação molecular em peixes Neotropicais, principalmente quando integrada com filogeografia, morfologia comparada, genética, ecologia, desenvolvimento, comportamento, entre outros, com exemplos de estudos na descrição de espécies em táxons complexos como *Gymnotus sylvius* (Albert et al., 1999), *Gymnotus pantanal* (Fernandes et al., 2005), *Moenkhausia forestii* (Benine et al., 2009), *Tetragonopterus carvalhoi* (Melo et al., 2011) e em *Hisonotus acuen* (Silva et al., 2014), com uma grande variação fenotípica. Essas associações têm ajudado com sucesso a morfologia tradicional a resolver alguns problemas como por exemplo a delimitação e caracterização de espécies taxonomicamente

problemáticas de Parodontidae (Bellafronte et al., 2013), a grande diversidade genética em *Rineloricaria* com morfoespécies amplamente distribuídas e fragmentadas em várias linhagens locais (Costa-Silva et al., 2015), a grande diversidade intraespecífica não detectada em *Curimatopsis* (Melo et al., 2016), a baixa divergência genética e o extenso fluxo gênico no comportamento migratório das linhagens de *Prochilodus* (Melo et al., 2018), uma grande diversidade subestimada em *Pygocentrus* (Mateussi et al., 2019) e uma evidência de especiação alopátrica em *Characidium* (Serrano et al., 2019).

A combinação de abordagens morfológicas e moleculares tem se tornado uma importante ferramenta para estudar as variações interespecíficas nas espécies de peixes Neotropicais e ajudado a identificar, discriminar e descrever novas espécies. Para estudos de ictiofauna, valores de divergências genéticas iguais ou superiores a 2% tem sido usada como indicativo de diferenças entre espécies de peixes marinhos e dulcícolas (Ward et al., 2009). Somado a isso, atualmente vários métodos de análise usando dados de *DNA barcoding* tem sido aplicada na delimitação de espécies, dentre estes: Automated Barcoding Gap Discovery - ABGD (Puillandre et al., 2012), General Mixed Yule Coalescent- GMYC (Fujisawa & Barraclough, 2013) e Multi-Rate Poisson Tree Process- mPTP (Kapli et al., 2017), dentre outros. Esses métodos de delimitação de espécies foram utilizados para diversos grupos de peixes Neotropicais (e.g., Costa-Silva et al., 2015; Roxo et al., 2015), incluindo Characiformes (e.g., Machado et al., 2018; Melo et al., 2016; 2018; Mateussi et al., 2019; Serrano et al., 2019; Dorini et al., 2020). Sendo assim, faz-se necessária uma ampla avaliação usando informações taxonômicas combinadas com marcadores moleculares para delimitar unidades taxonômicas válidas e crípticas, podendo esclarecer muitas questões sobre a biodiversidade e a história evolutiva em diversos grupos de peixes.

Referências

As referências bibliográficas, citadas no presente estudo, se encontram reunidas no final desta dissertação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Considerando a escassez de estudos genéticos na família Iguanodectidae e a busca de um maior embasamento na descrição formal de novas espécies, o presente trabalho objetivou, principalmente, estudar a diversidade de Iguanodectidae através de técnicas moleculares

2.2 Objetivos específicos

- Determinar as linhagens genéticas presentes em dois gêneros, *Iguanodectes* e *Piabucus*;
- Realizar uma abordagem comparativa entre os resultados das análises genéticas com as análises morfológicas de Iguanodectidae;
- Criar um banco genético de *DNA barcoding* para a Iguanodectidae que permitirá identificar espécies crípticas e/ou não descritas.

CAPÍTULO 1

Identificação molecular de espécies de peixes Neotropicais dos gêneros *Piabucus* e *Iguanodectes* (Characiformes, Iguanodectidae)

Introdução

Iguanodectidae é a oitava família mais diversa de Characiformes com 35 espécies válidas distribuídas em três gêneros. São constituídos por peixes relativamente pequenos de corpos alongados, dentes multicuspidados, membranas branquiais unidas e livres do istmo, extremidade posterior da maxila não se estendendo até o olho, origem da nadadeira dorsal geralmente posterior ao meio do corpo, nadadeira anal relativamente longa, além de outros caracteres anatômicos relacionados à osteologia do crânio e morfologia da bexiga natatória (Moreira, 2003; Van der Sleen & Moreira, 2017). Membros de Iguanodectidae estão distribuídos pelas bacias do Amazonas, Orinoco, Essequibo, São Francisco e Paraná-Paraguai, e nos rios costeiros da Venezuela, Guianas, e nordeste do Brasil (Van der Sleen & Moreira, 2017).

Iguanodectidae contém três gêneros: *Iguanodectes* (oito espécies), *Piabucus* (três espécies) e *Bryconops* (24 espécies), e sua posição filogenética em Characiformes tem sido bastante controversa com uma taxonomia ainda bastante complexa e restrita às descrições originais. Historicamente, os membros desses gêneros foram considerados como subfamília Iguanodectinae em Characidae (Eigenmann & Myers, 1929; Géry, 1970; Lima et al., 2003) suportada por sinapomorfias associadas à bexiga natatória (Vari, 1977). Géry (1970) revisou o gênero *Iguanodectes*, descrevendo *I. adujai* e *I. geisleri*, e propondo o subgênero *Iguanobrycon* para alocar *Iguanodectes geisleri* devido às enormes diferenças encontradas em relação a outras espécies de *Iguanodectes* como, por exemplo, ausência de dentes no maxilar, origem da nadadeira dorsal anterior ao meio do corpo, e nadadeira anal mais curta. Mais recentemente, com base em dados moleculares, Oliveira et al. (2011) propuseram que o gênero *Bryconops* esteja mais relacionado com *Iguanodectes* e *Piabucus* do que com os demais Characidae, elevando o status do grupo para o nível de família Iguanodectidae. Atualmente, hipóteses moleculares suportam a monofilia de Iguanodectidae e indicam uma proximidade filogenética com Acestrorhynchidae dentre outras famílias de Characiformes (Oliveira et al., 2011; Arcila et al., 2017; Mirande, 2018; Betancur-R et al., 2019; Burns &

Sidlauskas, 2019).

O gênero *Piabucus* se distingue dos *Iguanodectes* pela presença de uma nadadeira peitoral longa e uma quilha peitoral bem desenvolvida (Borba et al., 2013). *Piabucus* possui corpo alongado, dentes multicuspidados, membranas branquiais unidas e livres do istmo, extremidade posterior da maxila não se estendendo até o olho, origem da nadadeira dorsal geralmente posterior ao meio do corpo, nadadeira anal relativamente longa (Géry, 1977, Vari, 1977). O gênero difere de *Iguanodectes* por possuir uma nadadeira peitoral longa e uma quilha se estendendo do istmo até a inserção das nadadeiras pélvicas. As espécies têm uma faixa longitudinal brilhante, às vezes sobrepondo-se à faixa lateral mais escura (Moreira, 2003). O gênero possui três espécies válidas: *P. dentatus* distribuído pelas drenagens costeiras do nordeste do Brasil, Guiana Francesa, Suriname, Guiana e Venezuela; *P. melanostoma* distribuído no sistema Paraná-Paraguai e alto Rio Madeira ocorrendo na Argentina, Brasil, Bolívia, Paraguai, Peru e Equador; *P. caudomaculatus* endêmico do Rio Mamoré/Madeira.

As três espécies do gênero *Piabucus* diferem entre si por dados merísticos. *Piabucus caudomaculatus* difere-se de *P. melanostoma* por diferenças nas contagens da linha lateral para a até a junção do hipural (75-76 em *P. caudomaculatus* vs. 82-87 em *P. melanostomus* vs 80-84 em *P. dentatus*), raios dorsais (8-9 vs. 11 vs. 8, respectivamente), e raios da nadadeira anal (36-38 vs. 44-46 vs. 45-46, respectivamente), e pela ausência de nadeira adiposa em *P. caudomaculatus*, caracter encontrado tanto em *P. melanostoma* como em *P. dentatus*. Vari (1977) relatou que a pigmentação escura na mandíbula inferior seria encontrada somente em *P. caudomaculatus* e *P. melanostoma*, mas Guimarães et al. (2016) também encontrou o mesmo caracter em *P. dentatus* do rio Pindaré, nordeste do Brasil. Por fim, *P. dentatus* diferencia-se de *P. caudomaculatus* e *P. melanostoma* por possuir duas fileiras de dentes no pré-maxilar (fileira interna com seis dentes e fileira externa com um dente menor) (Guimarães et al., 2016). Géry (1977) compara *P. melanostoma* e *P. dentatus* como sendo muito semelhantes entre si, mas Vari (1977) levanta a hipótese de que *P. melanostoma* e *P. caudomaculatus* seriam mais próximas por não possuírem uma segunda fileira de dentes no pré-maxilar.

O gênero *Iguanodectes* possui oito espécies: *I. adujai* (Negro e Orinoco) *I. geisleri* (Madeira, Negro e Orinoco), *I. gracilis* (Negro), *I. polylepis* (Madeira e Purus), *I. purusii* (bacia do Amazonas), *I. rachovii* (bacia do Amazonas), *I. spilurus* (bacias do Amazonas e Orinoco) e *I. variatus* (Branco, Guaporé, Trombetas e Urubu) (Figura 1 e 2). Assim como no gênero *Piabucus*, *Iguanodectes* possui corpo alongado, dentes multicuspidados, membranas

branquiais unidas e livres do istmo, extremidade posterior da maxila não se estendendo até o olho, origem da nadadeira dorsal geralmente posterior ao meio do corpo, nadadeira anal relativamente longa (Géry, 1977, Vari, 1977). A maioria das espécies de *Iguanodectes* possui uma faixa lateral escura, lobo superior da nadadeira caudal com pigmentação escura ou nos seus raios medianos.

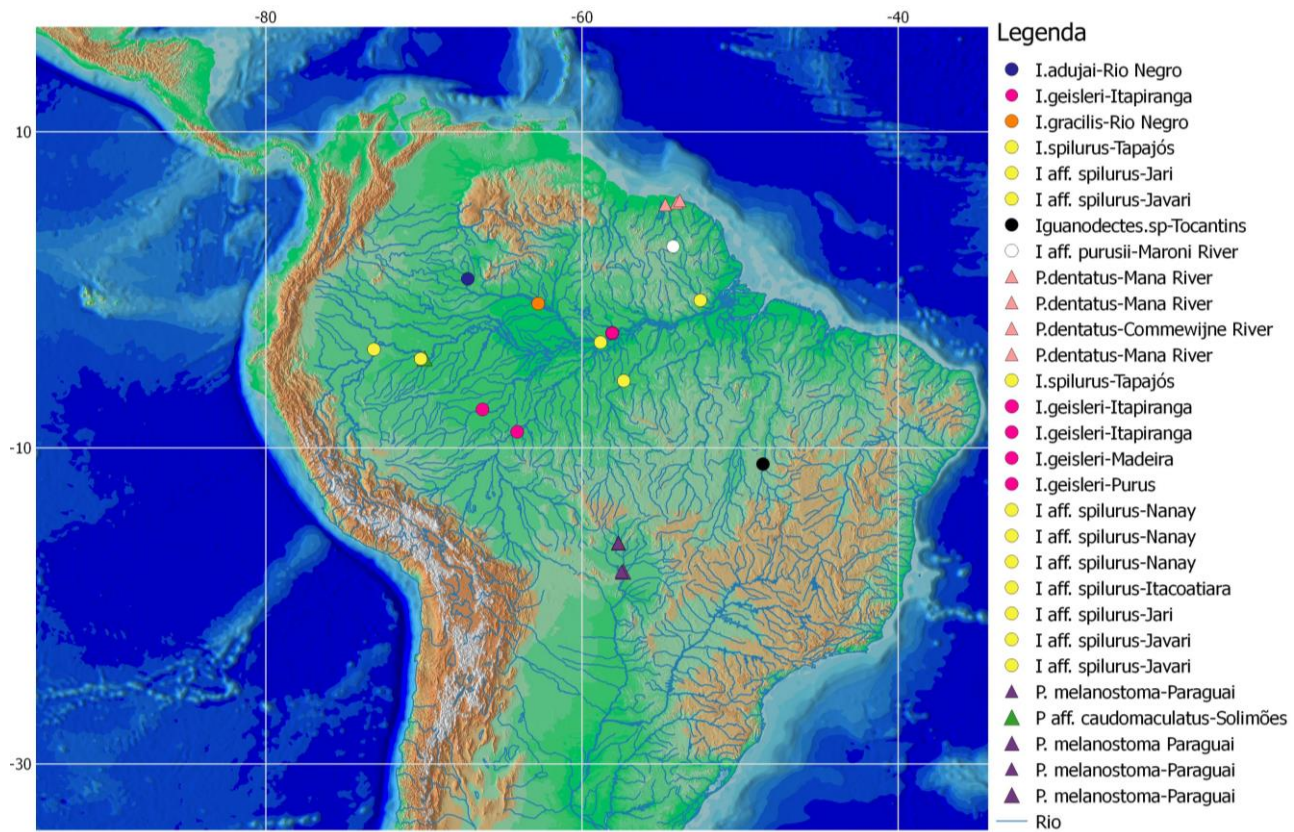


Figura 1. Distribuição das linhagens de *Iguanodectes* e *Piabucus* nas bacias hidrográficas.

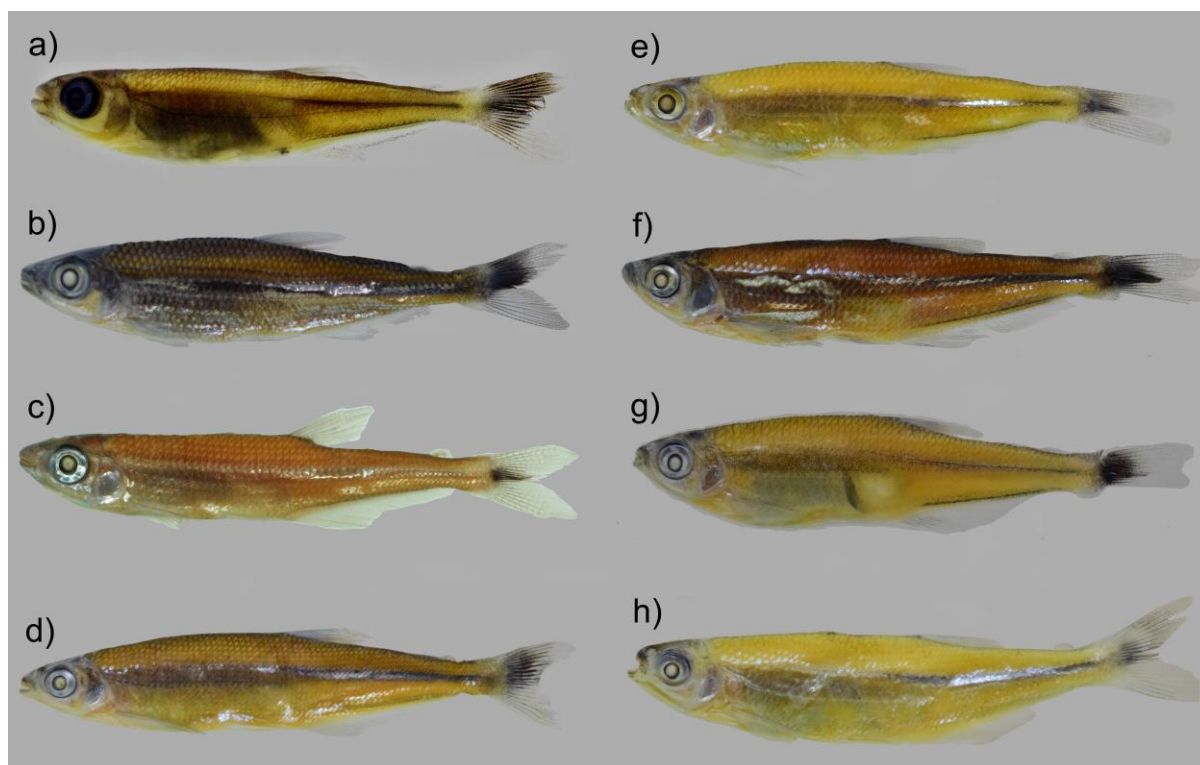


Figura 2. Representantes de oito linhagens de *Iguanodectes*: a) *I. adujai*, b) *I. geisleri*, c) *I. gracilis*, d) *I. spilurus*-Tapajós, e) *I. aff. spilurus*-Nanay, f) *I. aff. spilurus*-Jari, g) *I. aff. spilurus*-Javari, h) *Iguanodectes* sp.-Tocantins. O exemplar "b" representa *I. geisleri* proposto por Géry (1970) como subgênero *Iguanobrycon* devido as seguintes diferenças morfológicas: origem da nadadeira dorsal anterior ao meio do corpo, e nadadeira anal mais curta.

Embora vários trabalhos tenham sido publicados com descrições de espécies para o gênero *Bryconops* (e.g., Silva-Oliveira et al., 2015; Guedes et al., 2016; Lucinda & Guedes, 2018; Silva-Oliveira et al., 2018; Wingert et al., 2018; Silva-Oliveira, Lima & Bogotá-Gregory, 2018; Guedes et al., 2019; Silva-Oliveira et al., 2019), ainda não há estudos com delimitações de subgrupos dentro dos três gêneros de Iguanodectidae.

Iguanodectidae possui uma história evolutiva bastante complexa e uma difícil discriminação morfológica entre as espécies, principalmente *Iguanodectes spilurus* que foi considerada por Géry (1993) como uma espécie polimórfica com ampla distribuição geográfica estando presente na bacia do rio Amazonas, Orinoco, Tocantins e bacias costeiras do Amazonas, além de uma estreita semelhança com alguns exemplares de *I. purusii* do rio Madeira como descrito por Queiroz et al (2013), quase que indistinguíveis morfológicamente, diferenciando somente pelo número reduzido de escamas pré-dorsais em *I. spilurus* 26 vs. 27 ou mais em *I. purusii*, e o menor número de escamas perfuradas da linha lateral 60-64 em *I. spilurus* vs. mais de 65 em *I. purusii*. Os autores ainda concluem que o menor número de escamas poderia se tratar apenas de uma variação que ocorre com as populações distribuídas em algumas regiões da bacia amazônica e que tal variação pode suscitar dúvidas quanto à

distinção entre *I. spilurus* e *I. purusii*.

Devido à grande dificuldade em diferenciar morfologicamente essas espécies de *Iguanodectes*, torna-se possível com a utilização de ferramentas adicionais para diferenciar essas espécies. Dentre essas ferramentas adicionais, a técnica de *DNA barcoding* (Hebert et al., 2003) que se demonstrou uma técnica eficaz na identificação de espécies (Carvalho et al., 2011, Cardoso et al., 2018, Pereira et al., 2011, 2013, Rosso et al., 2012, Machado et al., 2018, Wang et al., 2020). Atualmente, vários métodos de análise usando dados de *DNA barcoding*, os quais são aplicados na delimitação de espécies tem sido utilizada para diversos grupos de peixes Neotropicais (e.g., Costa-Silva et al., 2015; Roxo et al., 2015), incluindo Characiformes (e.g., Melo et al., 2016; 2018; Mateussi et al., 2019; 2020; Serrano et al., 2019; Dorini et al., 2020).

O *DNA barcoding* associados a métodos analíticos tais como Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD; Puillandre et al., 2012) e Bayesian Poisson Tree Process (bPTP) (Zhang, Kapli, Pavlidis, & Stamatakis, 2013). O ABGD que utiliza a lacuna entre organismos pertencentes à mesma espécie e organismos de espécies diferentes como um limite para a delimitação de espécies, enquanto que o bPTP (Zhang, Kapli, Pavlidis, & Stamatakis, 2013) modela a especiação em termos do número de substituições. Assim, uma ampla aplicação de conhecimento taxonômico combinada com a utilização de marcadores moleculares para delimitar unidades taxonômicas válidas e crípticas podem esclarecer muitas questões sobre a biodiversidade e a história evolutiva de diversos grupos de peixes.

Tendo em vista a complexidade taxonômica em Iguanodectidae, empregamos a técnica de *DNA barcoding* associada à métodos modernos de delimitação de espécies e análises morfológicas para buscar compreender os limites de espécies em *Iguanodectes* e *Piabucus* e testar a hipótese de Géry (1970) de que *I. geisleri* pertença ao subgênero *Iguanobrycon*.

Materiais e Métodos

Amostragem

As amostras utilizadas foram obtidas na Coleção de Peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil (LBP). A identificação morfológica foi realizada através da consulta da literatura disponível incluindo descrições originais, revisões e chaves de identificação (Géry, 1970, 1977; Vari, 1977; Van der Sleen &

Moreira, 2017). Foram utilizadas 43 espécies de Iguanodectidae, 12 obtidas dos bancos de dados GenBank (ncbi.nlm.nih.gov/genbank) ou BOLD (boldsystems.org), sendo 20 espécimes de *Iguanodectes* (cinco espécies; 62,5%), 15 espécimes de *Piabucus* (três espécies; 100%) três amostras de *Bryconops* sp., quatro amostras de *Bryconops affinis*, uma amostra de *Bryconops melanurus* e uma amostra de *Brycon nattereri* usada como grupo externo. Os vouchers foram fixados em 95% etanol ou 10% formalina e transferidos para 70% etanol para armazenamento permanente e posteriormente depositados no LBP (Tabela 1).

Tabela 1. Exemplares da família Iguanodectidae pré-identificadas e depositadas no LBP com informações de vouchers e localidade.

Lote	Nº do tecido	Família	Espécie	Drenagem
LBP 8101	37545	Bryconidae	<i>Brycon nattereri</i>	Rio Grande, Brasil
LBP 15635	64323	Iguanodectidae	<i>Bryconops melanurus</i>	Rio Araguaia, Brasil
ITAPE17515	17515	Iguanodectidae	<i>Bryconops</i> sp.	Rio Itapecuru, Brasil
ITAPE17615	17615	Iguanodectidae	<i>Bryconops</i> sp.	Rio Itapecuru, Brasil
ITAPE17415	17415	Iguanodectidae	<i>Bryconops</i> sp.	Rio Itapecuru, Brasil
BSB21610	21610	Iguanodectidae	<i>Bryconops affinis</i>	Rio São Francisco, Brasil
BSB21710	21710	Iguanodectidae	<i>Bryconops affinis</i>	Rio São Francisco, Brasil
BSB21510	21510	Iguanodectidae	<i>Bryconops affinis</i>	Rio São Francisco, Brasil
DCC01211	01211	Iguanodectidae	<i>Bryconops affinis</i>	Rio São Francisco, Brasil
LBP 28508	23993	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes gracilis</i>	Rio Negro, Brasil
LBP18092	72792	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes geisleri</i>	Rio Amazonas, Itapiranga, Brasil
LBP18092	72793	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes geisleri</i>	Rio Amazonas, Itapiranga, Brasil
LBP18092	72791	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes geisleri</i>	Rio Amazonas, Itapiranga, Brasil
LBP11135	50921	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes geisleri</i>	Rio Purus, Brasil
LBP12108	51774	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes geisleri</i>	Rio Madeira, Brasil
LBP19191	77560	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes.sp</i>	Rio Tocantins, Brasil
LBP25095	94486	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes spilurus</i>	Rio Tapajós, Brasil
LBP25095	94487	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes spilurus</i>	Rio Tapajós, Brasil
LBP7040	34120	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes adujai</i>	Rio Negro, Brasil
MHNG2607	PAG-2607	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes</i> aff. <i>purusii</i>	Maroni River, Guiana Francesa
LBP18030	72580	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes</i> aff. <i>spilurus</i>	Rio Amazonas, Brasil

LBP20449	80758	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes</i> aff. <i>spilurus</i>	Rio Jari, Brasil
LBP5421	27137	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes</i> aff. <i>spilurus</i>	Rio Jari, Brasil
LBP28512	24484	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes gracilis</i>	Rio Negro, Brasil
LBP12504	53924	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes</i> aff. <i>spilurus</i>	Rio Nanay, Iquitos, Peru
LBP12504	53923	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes</i> aff. <i>spilurus</i>	Rio Nanay, Iquitos, Peru
LBP12504	53922	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes</i> aff. <i>spilurus</i>	Rio Nanay, Iquitos, Peru
LBP26142	95998	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes</i> aff. <i>spilurus</i>	Rio Javari, Brasil
LBP26142	95996	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes</i> aff. <i>spilurus</i>	Rio Javari, Brasil
LBP26142	95997	Iguanodectidae	<i>Iguanodectes</i> aff. <i>spilurus</i>	Rio Javari, Brasil
TZGAA00306	00306	Iguanodectiane	<i>Piabucus dentatus</i>	Waini River, Guiana
TZGAA03006	03006	Iguanodectiane	<i>Piabucus dentatus</i>	Waini River, Guiana
TZGAA04206	04206	Iguanodectiane	<i>Piabucus dentatus</i>	Waini River, Guiana
TZGAA05406	05406	Iguanodectiane	<i>Piabucus dentatus</i>	Waini River, Guiana
TZGAA06606	06606	Iguanodectiane	<i>Piabucus dentatus</i>	Waini River, Guiana
MHNG15129	HYD15-129	Iguanodectidae	<i>Piabucus dentatus</i>	Mana River, Guiana Francesa
MHNG15-174	HYD15-174	Iguanodectidae	<i>Piabucus dentatus</i>	Mana River, Guiana Francesa
MHNG15-129	SUJM-126	Iguanodectidae	<i>Piabucus dentatus</i>	Commewijne River, Suriname
MHNG15-131	HYD15-131	Iguanodectidae	<i>Piabucus dentatus</i>	Mana river, Guiana Francesa
LBP22562	86567	Iguanodectidae	<i>Piabucus</i> aff. <i>caudomaculatus</i>	Rio Solimões, Brasil
LBP5109	26150	Iguanodectidae	<i>Piabucus melanostoma</i>	Rio Paraguai, Brasil
LBP38	3527	Iguanodectidae	<i>Piabucus melanostoma</i>	Rio Paraguai, Brasil
LBP38	3603	Iguanodectidae	<i>Piabucus melanostoma</i>	Rio Paraguai, Brasil
LBP13642	56655	Iguanodectidae	<i>Piabucus melanostoma</i>	Rio Paraguai, Brasil
LBP13410	55833	Iguanodectidae	<i>Piabucus melanostoma</i>	Rio Paraguai, Brasil
LBP17830	13452	Iguanodectidae	<i>Piabucus melanostoma</i>	Rio Paraguai, Brasil
LBP4632	24716	Iguanodectidae	<i>Piabucus melanostoma</i>	Rio Paraguai, Brasil

Extração do DNA, amplificação e sequenciamento

Amostras de tecido foram coletadas de fígados, brânquias, nadadeiras ou músculos. O DNA total foi isolado usando o kit Qiagen "DNeasy Blood & Tissue" (Qiagen, Hilden, Alemanha),

de acordo com as instruções do fabricante. Os segmentos parciais do gene citocromo c oxidase subunidade I (COI) foram amplificados por PCR usando os primers L5698-Asn (5'-AGGCCTCGATCCTACAAAGKTTTA-3') (Miya & Nishida, 2000) e H7271-COXI (5'-GTGGTGGGCTCATAACAATAAA-3') (Melo et al., 2011). As reações de PCR foram realizadas em um volume de reação 12,5 µL contendo: 8,15 µl de H₂O, 1,25 µl de 10x Taq buffer (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl), 0,4 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µl de dNTP (8 mM), 0,25 µl de cada primer (10µM), 0,2 µl (5U/µl) de Taq polimerase (Phoneutria®), e 1,5 µl de DNA (50 ng/µl). As condições de PCR consistiram em 3 min at 95°C (denaturação inicial) seguido por 35 ciclos de 45s a 94°C (denaturação), 30s a 50–54°C (hibridização), e 60s a 68°C (extensão nucleotídica). Após os ciclos, nós realizamos uma extensão final a 68°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram checados em gel de agarose 1%, e foram então purificados usando ExoSAP-IT (USB Corporation) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos foram usados para sequenciar as duas cadeias de DNA usando BigDye Terminator v3.1 Kit de reação para sequenciamento (Applied Biosystems) e sequenciado em um sequenciador ABI3130 (Applied Biosystems) no LBP, Botucatu, Brasil.

Alinhamento e análises de delimitação de espécies

Os consensos das sequências foram obtidos e editados usando o programa Geneious v. 7.1.3 (Kearse et al., 2012) e foram alinhadas usando o algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) acoplado ao Geneious v. 7.1.3. Gaps e *stopcodons* foram checados visualmente. O melhor modelo de evolução foi obtido no MEGA (Kumar et al., 2018). Realizamos uma abordagem de máxima verossimilhança (ML) para ambas as matrizes usando RAxML HPC on XSEDE v8.2.12 (Stamatakis, 2014) implementado no CIPRES (Miller et al., 2010) usando o modelo GTRGAMMA (Stamatakis et al., 2008) com outros parâmetros em *default*. Mil pseudo-réplicas de bootstrap testaram os relacionamentos obtidos. Uma árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) e 1.000 pseudo-réplicas foram geradas no MEGA v7.0 (Kumar et al., 2018) (Figura 3).

Os métodos usados para as análises de delimitação de espécies foram: 1) Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD; Puillandre et al., 2012) realizada no servidor do ABGD (www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html), com modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980), número de passos em *default*, relative gap width (X) de 0.0016, partição inicial com *prior maximal distance* P= 0.001000, para ambos os grupos; 2) Bayesian Poisson Tree Process (bPTP) (Zhang, Kapli, Pavlidis, & Stamatakis, 2013) usando a melhor árvore ML gerada pelo RAxML, 100,000 gerações (thinning = 100), e outros

parâmetros em default no servidor bPTP (<https://species.h-its.org>).

Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*, PCA) foi usada para verificar a variação geral entre os espécimes de *Iguanodectes*, incluindo diferenças na morfometria entre as linhagens. O PCA é um procedimento estatístico que usa transformação ortogonal para converter um conjunto de observações de variáveis possivelmente correlacionadas em um conjunto de valores de variáveis linearmente não-correlacionadas chamadas componentes principais (Jolliffe, 2002). As análises foram feitas usando 25 medidas morfométricas seguindo Fink & Weitzman (1974) e Machado-Allison et al. (1993). Espécimes menores que 25 mm comprimento padrão (*standard length*, SL) foram excluídas das análises. Foram realizadas 25 medidas logaritmicamente transformadas para reduzir a influência do tamanho obtida usando o programa Past versão 1.28 (Hammer et al., 2004). Espécimes do gênero *Piabucus* não foram incluídos nas análises pois *n* amostral foi insuficiente.

Resultados

A matriz final apresentou 44 sequências de *Iguanodectes* e *Piabucus* com um total de 450 pb das quais 137 posições eram conservadas e 313 variáveis, com 22,1% de adenina, 29,4% citosina, 17,7% guanina e 30,7% timina. Alterações sequenciais dos tipos *stopcodons*, deleções e inserções não foram observadas. A matriz de distância genética K2P variou de 0,9 a 27,8% entre as espécies de *Iguanodectes* com valores de distância interespecíficos apresentando o menor valor $0,009 \pm 0,004$ entre *P. aff. caudomaculatus*-Solimões e *P. dentatus*-Mana River e o maior valor de $0,278 \pm 0,032$ entre *I. geisleri* e *Iguanodectes* sp.-Tocantins (Tabela 3).

A análise de ABGD resultou em oito partições variando de 18 a 22 o número de prováveis grupos, sendo duas partições indicando 22 prováveis espécies (*prior maximum distance* 0,001-0,002) correspondentes à 20 linhagens de Iguanodectidae: *P. melanostoma*-Paraguai, *P. dentatus*-Mana River, *I. spilurus*-Tapajós, *I. adujai*-Negro, *Iguanodectes* sp.-Tocantins, *I. aff. purusii*-Maroni River, *I. aff. spilurus*-Jari/Itacoatiara, *I. gracilis*-Negro, *I. aff. spilurus*-Nanay, *I. aff. spilurus*-Javari, *Bryconops melanurus*-Araguaia, *I. geisleri*-Madeira/Purus, *I. geisleri*-Itapiranga, *I. geisleri*-Itapiranga, *P. dentatus*-Waini River, *P.*

melanostoma-Paraguai, *P. aff. caudomaculatus*-Solimões, *Bryconops* sp.-Itapecuru. *Bryconops affinis*-São Francisco, além de uma linhagem de *Brycon nattereri*. O ABGD também gerou três partições indicando 21 prováveis espécies (*prior maximum distance* 0,003-0,008) correspondentes à *B. nattereri*, *I. geisleri* e uma linhagem com as demais espécies e outras três partições indicando 17 prováveis espécies (*prior maximum distance* 0,013-0,035). A análise de bPTP reconheceu 21 linhagens de Iguanodectidae mais o grupo externo. Os valores de bPTP foram relativamente altos para *I. adujai*-Negro (1,000), *Iguanodectes* sp.-Tocantins (0,997), *I. aff. purusii*-Maroni River (0,990), *I. gracilis*-Negro (0,900), *Bryconops melanurus* (0,878), *Bryconops.sp* (0,878), *I. spilurus*-Tapajós (0,733), *I. gesileri*-Itapiranga (0,728), *I. aff. spilurus*-Jari/Itacoatiara (0,648), *I. geisleri*-Itapiranga (0,590), *I. aff. spilurus*-Nanay (0,488), *I. geisleri*-Madeira/Purus (0,465), *P. dentatus*-Waini River (0,445), *I. aff. spilurus*-Javari (0,427), *P. melanostoma*-Paraguai (0,425), *P. dentatus*-Waini River (0,383), *P. dentatus*-Waini River (0,383), *I. aff. spilurus*-Javari (0,0314), *I. aff. spilurus*-Nanay (0,293), *B. affinis*-São Francisco (0,199), *P. dentatus*-Mana River (0,179) (Figura 2).

A distribuição das linhagens de *Iguanodectes* está representada no mapa da Figura 4.

Tabela 3. Valores de distância genética K2P \pm a variância de 1000 pseudo-réplicas de bootstrap entre as linhagens de *Iguanodectes* e *Piabucus* analisadas. Valores transversais em negrito representam distância genética intraespecíficas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1- <i>P.melanostoma</i> Paraguai	0,005\pm0,002												
2- <i>P.dentatus</i> Mana River	0,088 \pm 0,015	0,000\pm0,000											
3- <i>P.aff.caudomaculatus</i> Solimões	0,094 \pm 0,016	0,009 \pm 0,004	N/C										
4- <i>I.spilurus</i> Tapajós	0,218 \pm 0,027	0,190 \pm 0,025	0,197 \pm 0,026	0,002\pm0,002									
5- <i>I.adujai</i> Negro	0,198 \pm 0,026	0,201 \pm 0,027	0,208 \pm 0,028	0,183 \pm 0,024	N/C								
6- <i>Iguanodectes</i> .sp Tocantins	0,180 \pm 0,025	0,220 \pm 0,028	0,220 \pm 0,028	0,165 \pm 0,023	0,175 \pm 0,024	N/C							
7- <i>I.aff.purusii</i> Maroni River	0,187 \pm 0,026	0,217 \pm 0,028	0,214 \pm 0,028	0,163 \pm 0,022	0,162 \pm 0,023	0,141 \pm 0,021	N/C						
8- <i>I.aff.spilurus</i> Jari/Itacoatiara	0,207 \pm 0,027	0,209 \pm 0,026	0,207 \pm 0,026	0,179 \pm 0,024	0,162 \pm 0,021	0,139 \pm 0,020	0,139 \pm 0,019	0,022\pm0,006					
9- <i>I.gracilis</i> Negro	0,214 \pm 0,028	0,230 \pm 0,028	0,222 \pm 0,027	0,206 \pm 0,026	0,183 \pm 0,025	0,173 \pm 0,024	0,145 \pm 0,021	0,102 \pm 0,016	N/C				
10- <i>I.aff.spilurus</i> nanay	0,183 \pm 0,024	0,188 \pm 0,024	0,180 \pm 0,023	0,168 \pm 0,022	0,166 \pm 0,022	0,149 \pm 0,021	0,126 \pm 0,019	0,103 \pm 0,016	0,078 \pm 0,013	0,009\pm0,003			
11- <i>I.aff.spilurus</i> Javari	0,200 \pm 0,026	0,201 \pm 0,026	0,191 \pm 0,025	0,182 \pm 0,023	0,153 \pm 0,021	0,157 \pm 0,022	0,123 \pm 0,019	0,096 \pm 0,016	0,075 \pm 0,013	0,049 \pm 0,010	0,014\pm0,005		
12- <i>I.geisleri</i> Itapiranga	0,264 \pm 0,030	0,246 \pm 0,028	0,245 \pm 0,028	0,273 \pm 0,030	0,274 \pm 0,031	0,278 \pm 0,032	0,254 \pm 0,028	0,241 \pm 0,027	0,275 \pm 0,031	0,257 \pm 0,029	0,254 \pm 0,030	0,054\pm0,008	
13- <i>P.dentatus</i> Waini River	0,106 \pm 0,017	0,069 \pm 0,013	0,079 \pm 0,015	0,182 \pm 0,024	0,206 \pm 0,028	0,203 \pm 0,027	0,196 \pm 0,026	0,218 \pm 0,028	0,234 \pm 0,028	0,209 \pm 0,027	0,211 \pm 0,027	0,266 \pm 0,030	0,001\pm0,001

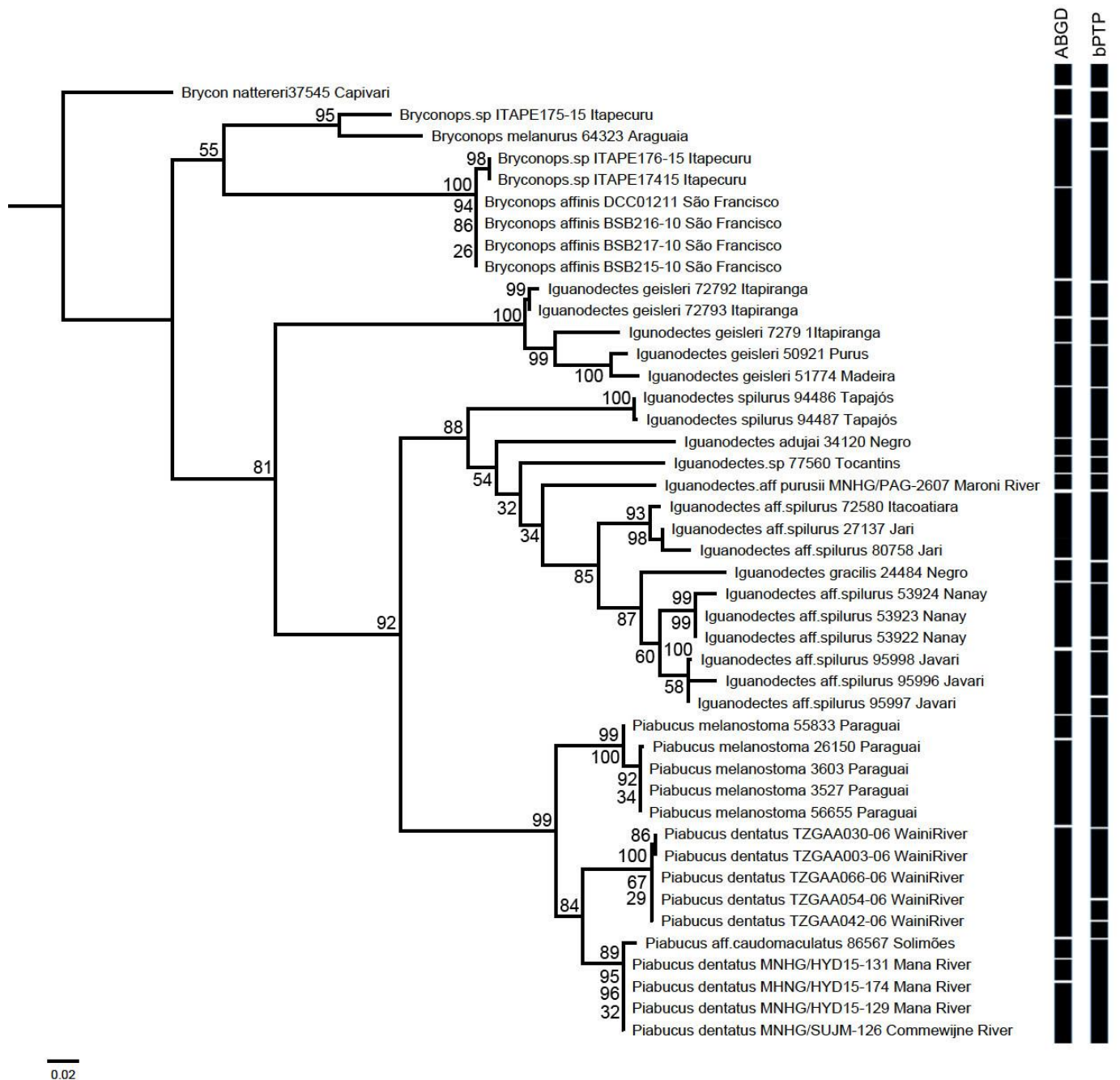
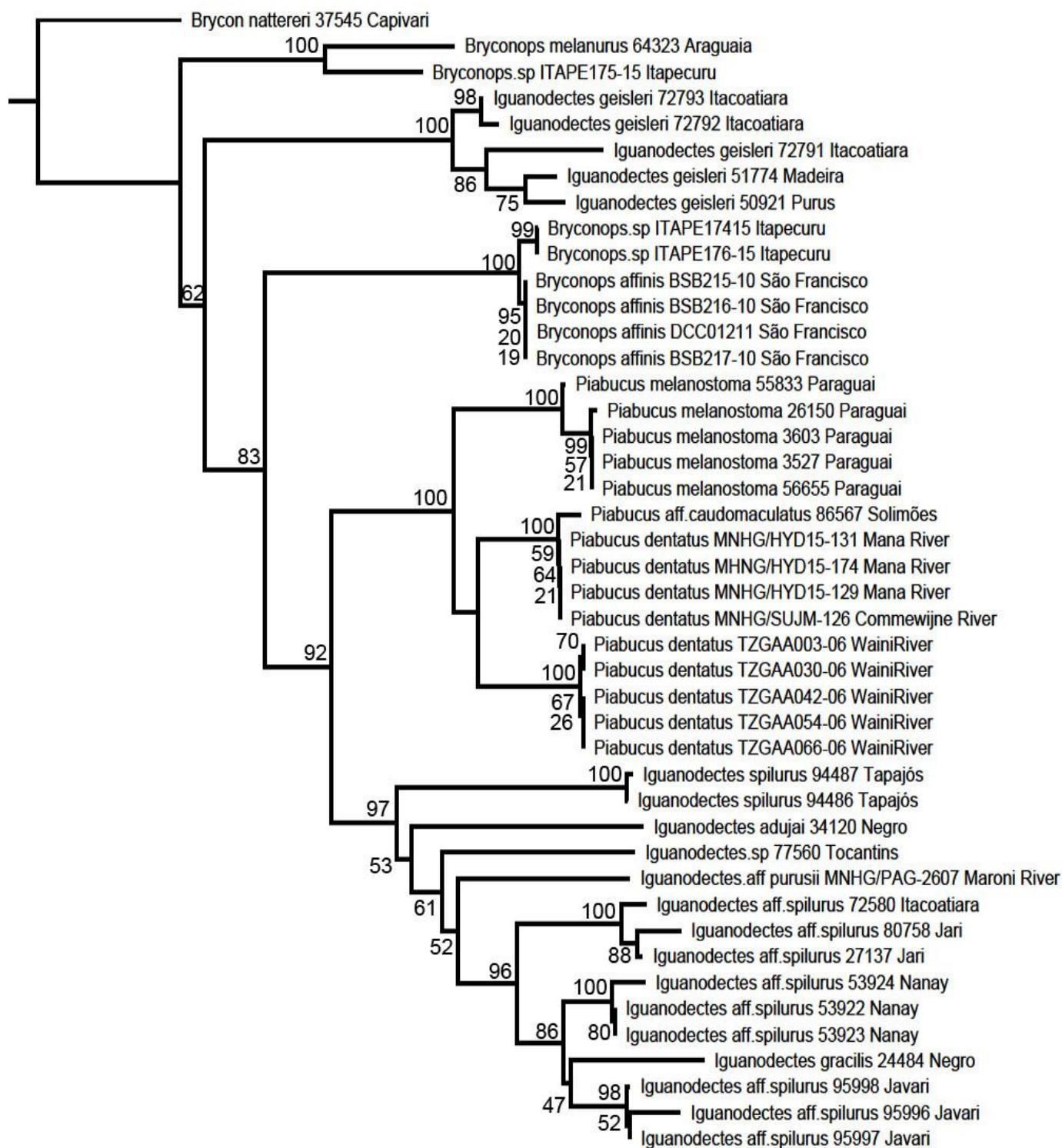


Figura 3. Melhor árvore de máxima verossimilhança de Iguanodectidae com base em sequências parciais do gene *citocromo c oxidase subunidade I* obtida pelo RAxML. Valores entrenós representam porcentagens de *bootstrap*.



0.02

Figura.4 Árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) de Iguanodectidae com base no gene *citocromo c oxidase subunidade I*. Valores entrenós representam porcentagens de *bootstrap*.

Análises Morfológicas

O primeiro (PC1) e o segundo (PC2) eixo principal da nossa análise explicaram 74,8% e 13,9%, respectivamente, da variação na forma do corpo para todas as amostras de *Iguanodectes* analisadas. A variação é parcialmente distribuída entre populações e, aparentemente, representa uma distribuição contínua da morfologia externa, como podemos observar no gráfico de dispersão do PCA (Figura 5). Nossos resultados também mostraram que as medidas com maiores variações (valores em negrito) foram, respectivamente: 1- Maior Altura do Corpo (0,2809), 2- Origem da nadadeira dorsal até a origem da nadadeira anal (0,2664), altura do pedúnculo caudal (0,2979), Origem da n.dorsal até a origem da pélvica (0,2739), comprimento da cabeça (0,4967) e escamos pré-dorsais (-0,3807) As variâncias de PCA são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Variâncias no primeiro e segundo eixos da análise de componentes principais sem tamanho (eixo 1 e eixo 2) de amostras combinadas de *Iguanodectes* valores em negrito representam as medidas com as maiores variações.

	Axis 1	Axis 2
Comprimento padrão	0,2024	0,00528
Maior altura do corpo	0,2809	0,02911
Nariz até a origem da nadadeira dorsal	0,2125	-0,1107
Nariz até a origem da nadadeira peitoral	0,1479	0,1407
Nariz até a origem da nadadeira pélvica	0,1841	0,07889
Nariz até a origem da nadadeira anal	0,2102	0,06155
Nariz até o anus	0,2127	0,1012
Origem da dorsal até junção do hipural	0,1706	0,151
Origem da dorsal até a origem da anal	0,2664	0,2178
Origem da dorsal até a origem da pelvica	0,2739	-0,2316
Origem da dorsal até a origem da peitoral	0,2561	-0,2027
altura do pedunculo caudal	0,2979	-0,0553
Comprimento da nadeira peitoral	0,2443	-0,274
Comprimento da nadadeira pelvica	0,2174	0,0213

Comprimento da nadeira dorsal	0,1957	0,1025
Comprimento da cabeça	0,186	0,4967
Comprimento do nariz	0,1058	0,2691
Diametro da orbita do olho	0,0840	0,1848
Comprimento pos orbital	0,1509	0,1831
Distancia interorbital	0,156	0,169
Escamas da linha lateral	0,0826	-0,0890
Escamas depois da junção do hipural	0,1171	-0,309
Escamas entre a linha lateral e orig. dorsal	0,0941	-0,0859
Escamas entre a linha lateral e orig. pélvica	0,2262	-0,1472
Escamos pré-dorsais	0,1855	-0,3807

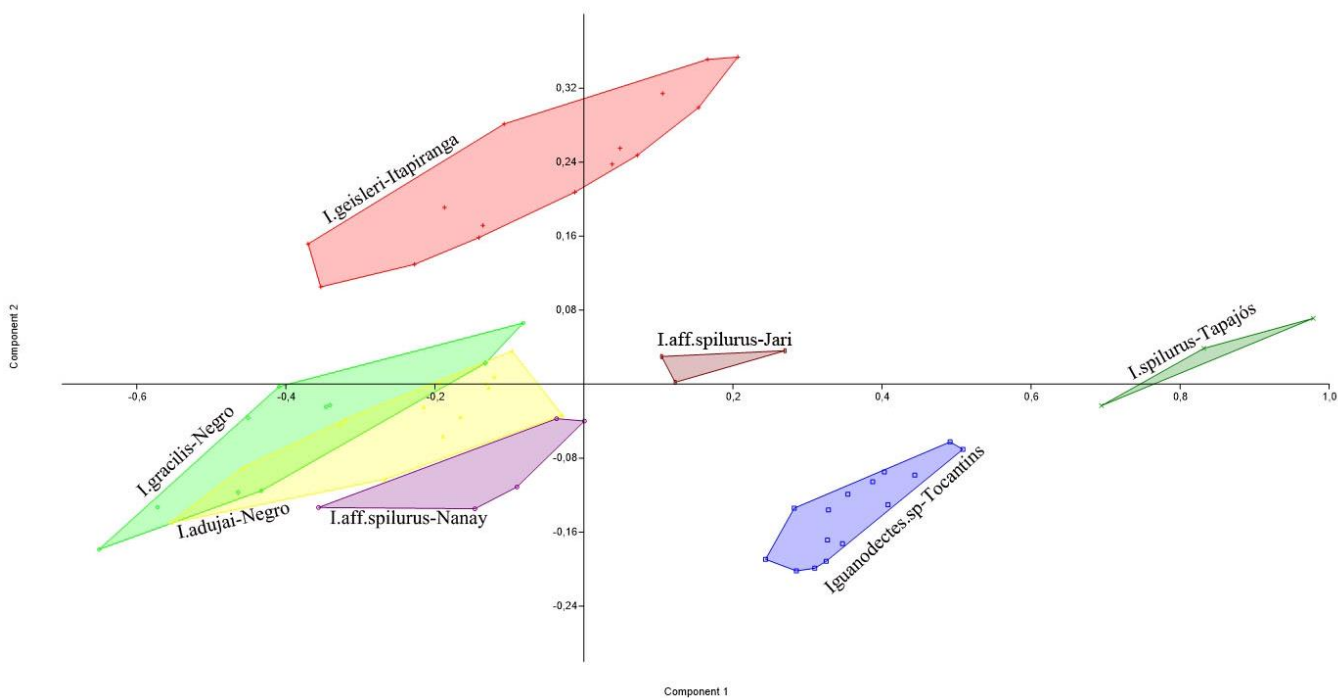


Figura 5. Gráfico de dispersão da Análise de Componentes Principais (PCA) de sete linhagens de *Iguanodectes* (n = 65), indicando a presença de variação contínua da morfologia externa.

Discussão

As análises de delimitação de espécies revelaram resultados distintos para Iguanodectidae com os métodos ABGD e bPTP dividindo Iguanodectidae entre 21 e 22 linhagens distintas. O método ABGD separa *Iguanodectes adujai*, *Iguanodectes geisleri* em três linhagens sendo duas de *Iguanodectes geisleri*-Itapiranga e uma para *Iguanodectes geisleri*-Madeira/Purus, *Iguanodectes gracilis*, *Iguanodectes spilurus*-Tapajós, *Iguanodectes* aff. *purusii*-Maroni River, *Iguanodectes* aff. *spilurus*-Itacoatiara/Jari *Iguanodectes* sp.-Tocantins, *Iguanodectes* aff. *spilurus*-Nanay, *Iguanodectes* aff. *spilurus*-Javari, *Piabucus melanostoma*-Paraguia e duas linhagens, *Piabucus dentatus*-Mana River, *Piabucus* aff. *caudomaculatus*-Solimões, *Piabucus dentatus*-Waini River e linhagens de *Bryconops* sp.-Itapecuru, *Bryconops affinis*-São Francisco, *Bryconops melanurus*-Rio Capivari. O método bPTP separa *Iguanodectes* aff. *spilurus*-Nanay em duas linhagens e *Iguanodectes* aff. *spilurus*-Javari em duas outras linhagens, separa *Piabucus dentatus*-Waini River em três linhagens e coloca *Piabucus caudomaculatus*-Solimões na mesma linhagem de *Piabucus dentatus*-Mana river.

Os dois métodos usados tem se mostrado muito relevantes em trabalhos de delimitação de espécies como em Hypostomini (Anjos et al., 2019), *Pygocentrus* (Mateussi et al., 2019) e *Characidium* (Serrano et al., 2019), sendo o ABGD computacionalmente muito eficiente por apresentar um bom desempenho para divergências intraespecíficas máximas (Puillandre et al., 2012) enquanto que o método bPTP possui uma vantagem muito importante por modelar a especiação em termos do número de substituições contornando o processo propenso a erros e intensivo em computação para gerar árvores ultramétricas calibradas com tempo (Zhang et al., 2013).

Dos resultados encontrados, tanto o ABGD como o bPTP separam a linhagem de *Iguanodectes geisleri* das demais espécies de *Iguanodectes* e *Piabucus*. Os dados moleculares obtidos tais como uma alta distância genética interespecífica em relação aos outros *Iguanodectes* (Tabela 3) associadas à grande variação morfométrica de *I. geisleri* reforçam a posição de *I. geisleri* como um grupo distinto dos demais Iguanodectidae. *Iguanodectes geisleri* possui algumas características únicas dentre os membros da família tais como: nadadeira dorsal no meio do corpo vs. nadadeira dorsal geralmente posterior ao meio do corpo, nadadeira anal curta vs. nadadeira anal longa, ausência de dentes maxilares vs. presença de dentes na maxila, presença de dois dentes

pré-maxilares externos vs. presença de um dente pré-maxilar externo. A soma dessas evidências aponta *Iguanodectes geisleri* como espécie distinta dos outros *Iguanodectes* e *Piabucus* corroborando os dados encontrados por Géry (1970) que, devido às diversas diferenças morfológicas em relação a outros *Iguanodectes* como, por exemplo, ausência de dentes maxilares e nadadeira anal mais curta (Moreira 2003), propôs o subgênero *Iguanobrycon* (Gery, 1970). A inclusão de dados moleculares adicionais combinado com dados morfológicos nas demais espécies de *Iguanodectes* (*I. polylepis*, *I. rachovii* e *I. variatus*) irá permitir testar a hipótese da elevação do subgênero ao nível de gênero para alocar *Iguanodectes geisleri*.

Altos valores de distância genética foram observados dentro dos dois gêneros (4,9% a 27,8% em *Iguanodectes*; 0,9% a 10,6% em *Piabucus*). Diversos estudos em Characiformes têm demonstrado altas distâncias genéticas interespecíficas usando mtDNA, como por exemplo em Curimatidae (Melo et al., 2016), Lebiasinidae (Benzaquem et al., 2015), Parodontidae (Bellafronte et al., 2013), Bryconidae (Machado et al., 2017) Crenuchidae (Serrano et al., 2019) e Characidae (Melo et al., 2011; Silva et al., 2016). Diferenças genéticas encontradas entre as três linhagens de *I. spilurus* pelos dois métodos ABGD e bPTP suportam Géry (1993), que a considera uma espécie polimórfica com uma ampla distribuição pelas bacias do Amazonas, Orinoco, e Tocantins, com variações morfológicas ao longo da sua distribuição. Considerando que a localidade-tipo de *I. spilurus* é o Rio Cupari, afluente do médio Rio Tapajós, a linhagem genética mais próxima e, portanto, a provável representante da espécie é *I. spilurus*-Tapajós.

As análises de bPTP e ABGD delimitaram *Iguanodectes spilurus* como possíveis espécies distintas: o método ABGD delimita 4 possíveis espécies e o método bPTP delimita 6 possíveis espécies. Os resultados da análise morfológica de PCA (Figura 5) também demonstraram variação intraespecífica substancial em ambas as linhagens separando as espécies de *I. spilurus* em quatro possíveis espécies distintas, somado aos resultados da distância genética das sequências mtDNA COI que indicaram valores altos com uma variação intraespecífica entre as linhagens (Tabela 3). Essas diferenças podem estar relacionadas à presença de espécies crípticas. Muitos estudos sugerem que as faunas tropicais contêm uma grande proporção de espécies morfológicamente indistinguíveis (i.e., espécies crípticas *sensu* Mayr, 1942) (Bickford et al., 2007; Fouquet et al., 2007, Murray et al., 2011; Melo et al., 2016). Entre as espécies analisadas, *Iguanodectes* sp.-Tocantins destaca-se dos demais por apresentar

uma alta distância genética interespecífica (Tabela 3) em relação a *I. spilurus*-Tapajós e aos demais *I. spilurus*. As análises de PCA (figura 5) também corroboram com as diferenças morfológicas encontradas entre os demais *Iguanodectes* analisados. Além disso, alguns caracteres diferem dos demais *I. spilurus* tais como maior número de escamas na linha lateral (69-70 vs. 60-64), maior número de escamas entre a linha lateral e origem da dorsal (10 vs. 8), e ausência de dentes na fileira externa do pré-maxilar vs. presença nos demais *Iguanodectes* analisados e descritos na literatura (Géry, 1970; 1993), possuindo de 1 a 2 dentes na fileira externa do pré-maxilar. Esses indícios indicam que a linhagem genética distinta *Iguanodectes* sp.-Tocantins possa pertencer a uma espécie não descrita de *Iguanodectes*.

Tanto as análises do ABGD como bPTP delimitam *Iguanodectes adujai* como uma espécie distinta dos demais. *Iguanodectes adujai* foi descrita por Géry (1970) distinguindo-se de *I. spilurus* por possuir um corpo mais alongado. No entanto, Géry (1970) destacou formas intermediárias que apresentam uma forma do corpo mais curta que poderiam realocar *I. adujai* como uma subespécie devido à uma afinidade com *I. spilurus*, colocando em dúvida a validade de *I. adujai* como espécie. Em nossas análises, encontramos *I. adujai* com uma alta distância genética interespecífica em relação a *I. spilurus*-Tapajós e aos demais *I. spilurus* (Tabela 3), estando também separada morfometricamente de *I. spilurus*-Tapajós dos outros *I. spilurus* nas análises de PCA (Figura 5), ficando mais próxima de *I. aff. spilurus*-Nanay. O exame morfológico de espécimes de *I. aff. spilurus*-Nanay indica que apresentam uma forma do corpo não tão alongada como os demais *I. spilurus*. Sendo assim, apesar do questionamento da validade da espécie feito por Géry (1970), nossas análises suportam a validade de *I. adujai* com base em dados genéticos e morfológicos.

Uma questão relevante sobre *I. aff. spilurus*-Nanay é em relação à sua localização geográfica próxima da localidade-tipo de *Iguanodectes tenuis*. A espécie foi descrita por Cope (1872) do rio Ambyiacu, Peru, e posteriormente considerada por Böhlke (1984) que, após revisar as espécies do gênero, concluiu que *I. tenuis* Cope, 1872 seria então um sinônimo junior de *I. spilurus* (Günther, 1864). Posteriormente, Moreira (2003) manteve *I. tenuis* como sinônimo junior de *I. spilurus*. Nossos resultados indicam que *I. aff. spilurus*-Nanay representa uma linhagem diferente de *I. spilurus*-Tapajós, com uma distância genética relativamente alta em comparação a *I. spilurus*-Tapajós (Tabela 3) e uma diferença morfológica considerável (Figura 5). Assim, nossos dados indicam a possibilidade de aplicação do nome disponível *I. tenuis*

a essa linhagem genética de *I. aff. spilurus*-Nanay. Dados adicionais com mais representantes da Amazônia ocidental poderão clarificar e dar maior suporte à essa questão.

As análises de bPTP e ABGD delimitaram *Iguanodectes gracilis* como uma espécie distinta dos demais *Iguanodectes*. Similarmente, Géry (1970) demonstra que *I. gracilis* se distingue claramente dos demais *Iguanodectes* por caracteres merísticos (nadadeiras dorsal e peitorais com menor número de raios e marca caudal, estritamente mediana, sem extensão nos lobos) hipotetizando que *I. adujai* seja próxima de *I. gracilis*, assim como já comentado sobre *I. spilurus*. As análises revelam uma alta distância genética interespecífica entre essas duas espécies, e em relação à análise de PCA, *I. adujai* e *I. gracilis* estão bem próximos morfologicamente (Figura 2), com uma pequena sobreposição no morfo-espaço, que também seria explicado pela forma do *I. adujai* como citado acima.

Os resultados apoiam a monofilia do grupo composto por *Iguanodectes* e *Piabucus* embora a adição de mais espécies de *Bryconops* seja determinante. A monofilia dos dois gêneros foi proposta por Vari (1977) baseada em caracteres associados à bexiga natatória, que seria derivada da forma encontrada em *Piabucus* apoiando assim a monofilia de Iguanodectinae. Nossas análises demonstram que o gênero *Piabucus* encontra-se mais proximamente relacionado do grupo composto pelos demais *Iguanodectes* exceto *I. geisleri*, tornando o gênero *Iguanodectes* parafilético. Adicionalmente a isso, as análises de delimitação de espécies reconheceram cinco possíveis linhagens distintas para *Piabucus* sendo duas *Piabucus melanostoma*-Paraguai, uma para *Piabucus aff. caudomaculatus*-Solimões, uma *Piabucus dentatus*-Mana River e uma *Paibucus dentatus*-Waini River.

O método ABGD separou em duas linhagens *Piabucus melanostoma*-Paraguai. Após o exame morfológico dos vouchers e comparações com a literatura (Britski et al., 1999), não foi identificado variações morfológicas ou diagnósticas para propor a descrição formal dessas linhagens genéticas (ou espécies em potencial). Em análises cariotípicas, Silva et al. (2011) demonstraram que *P. melanostoma* habita corpos lânticos de regiões associadas as macrófitas em busca de alimentos e abrigo, fazendo com que essas populações se tornem isoladas e acumulem alterações no cariótipo. Aparentemente essas alterações não seguem os padrões do mtDNA ou da morfologia.

A análise do ABGD recupera *Piabucus aff. caudomaculatus* junto a *P. dentatus*-Mana River French Guiana, os resultados aqui apresentados revelaram uma baixa

variação genética entre as duas espécies como exemplificado na tabela de distâncias interespecíficas (Tabela 3).

O espécime de *Piabucus* foi identificado como *Piabucus* aff. *caudomaculatus* devido a alguns dados merísticos tais como 73 escamas na linha lateral, nove raios na nadadeira dorsal, 42 raios na nadadeira anal, ausência da dentição do pré-maxilar externo. Algo relevante indetificado no espécime de *P. aff. caudomaculatus* é a presença da nadadeira adiposa, diferindo do espécime de *P. caudomaculatus* descrito por Vari (1977), onde tanto o holótipo como os parátipos apresentavam nadadeira adiposa. Analisando os espécimes segundo a descrição de Vari (1977), *P. caudomaculatus* diverge de *P. dentatus* por possuir apenas uma fileria de dentes na pré maxila enquanto que *P. dentatus* possui duas fileiras de dentes na pré-maxila (fileira interna com seis e externa com um dente menor) (Eigenmann & Myers, 1929; Guimarães et al., 2016). Além da baixa divergência genética entre *Piabucus* aff. *caudocamulatus* e *Piabucus dentatus*, apenas um caracter aproxima essas duas espécies: presença de nadadeira adiposa.

Conforme descrito por Vari (1977), *P. caudomaculatus* parece estar mais intimamente relacionado a *P. melanostoma* compartilhando a perda da fileira externa de dentição no pré-maxilar e presença de pigmentação na mandíbula inferior, ambos os caracteres que até então eram desconhecidos em outros membros da família. Guimarães et al. (2016), após examinar exemplares de *P. dentatus* do nordeste do Brasil, mostra que alguns espécimes possuíam pigmentação na mandíbula inferior e outros não, concluindo que esse padrão não seria útil para discriminar espécies. Já os dois métodos ABGD e bPTP separaram *P. dentatus* em duas linhagens para as Guianas, uma de *P. dentatus*-Mana River e outra *P. dentatus* Waini River. Essas duas possíveis espécies são separadas por uma distância genética considerável de 6,9%. Segundo informações de alguns trabalhos sobre a diversidade e riqueza de espécies (De Merona et al., 2012; Le Bail et al., 2012; Mol et al., 2012), as duas linhagens de *P. dentatus* estão em bacias separadas compondo a ictiofauna guianesa, e isso pode configurar em diferenças ecológicas pelo menos entre essas duas linhagens. Análises morfológicas aprofundadas desses espécimes permitirão uma melhor definição dessas duas linhagens.

Por fim destaca-se a criação desse banco genético de *DNA barcoding* para a Iguanodectidae, com a adição de 13 sequências de várias linhagens sul-americanas. Assim, contribuímos com dados genéticos e morfológicos que nos permite compreender a diversidade molecular das espécies de *Iguanodectes* e *Piabucus*, identificar possíveis

espécies crípticas, e questionar as hipóteses de validação do subgênero *Iguanobrycon*, *I. adujai* e *I. tenuis*. A associação de abordagens integrativas de métodos moleculares e morfológicos cooperam com a delimitação das espécies de Iguanodectidae, assim como diversos estudos realizados em outras famílias de Characiformes.

Considerações finais

Paralelamente às análises de delimitação molecular de espécies com a metodologia de *DNA barcoding* e análises morfológicas de PCA, conseguiu-se com esses dados iniciais compreender os limites de espécies em *Iguanodectes* e *Piabucus* e testar a hipótese de que *I. geisleri* pertença ao subgênero *Iguanobrycon* como proposta por Géry (1970), e que possivelmente possa ser elevado ao nível de gênero após análises aprofundadas com mais dados. Esses dados também indicam uma alta variação genética de espécimes amplamente distribuídos de *I. spilurus* na bacia amazônica.

Sendo assim, nossos estudos demonstram a grande necessidade de revisões taxonômicas envolvendo mais dados genéticos e morfológicos para determinar a presença de potenciais espécies não descritas. Os resultados também indicaram que a inclusão das demais espécies de *Iguanodectes* permitirá definir melhor os limites, principalmente em relação à *I. spilurus*. Estudos posteriores com *Bryconops* também podem auxiliar no entendimento da diversidade de espécies nesse gênero, contribuindo assim, com o avanço na sistemática de Iguanodectidae, e embasando futuros estudos genético-populacionais, taxonômicos e filogenéticos na família. Por fim, estudos de delimitação de espécies combinados com análises de características morfológicas em associação com a taxonomia se revelaram uma eficaz ferramenta para compreender os limites de espécies e a biodiversidade subestimada na região amazônica.

Referências Bibliográficas

- ABE, K. T., MARIGUELA, T. C., AVELINO, G. S., CASTRO, R. M. C. & OLIVEIRA, C. 2013. Multilocus molecular phylogeny of Gasteropelecidae (Ostariophysi: Characiformes) reveals the existence of an unsuspected diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69, 1209–1214.
- ALBERT, J. S., & REIS, R. E. 2011. Introduction to neotropical freshwaters. In J. S. Albert & R. E. Reis (Eds.), *Historical biogeography of neotropical freshwater fishes*. Berkeley and Los Angeles: University of California Press. 3–21.
- ALLANDER, T., EMERSON, S. U., ENGLE, R. E., PURCELL, R. H. & BUKH, J. 2001. A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98. 20, 11609–11614.
- ALMEIDA, O., LORENZEN, K., & MCGRATH, D. 2004. The commercial fishing sector in the regional economy of the Brazilian Amazon. Paper presented at the Proceedings of the Second International Symposium on The Management of Large Rivers for Fisheries, Phnom Penh, Kingdom of Cambodia.
- ARCILA, D., G. ORTÍ, R. VARI, J. W. ARMBRUSTER, M. L. J. STIASSNY, K.D. KO, M. H. SABAJ, J. LUNDBERG, L. J. REVELL, AND R. BETANCUR-R. 2017. Genomewide interrogation advances resolution of recalcitrant groups in the tree of life. *Nat. Ecol. Evol.* 1:0020.
- ARROYAVE, J, DENTON JSS, STIASSNY MLJ. 2013. Are characiform Fishs Gondwanan in Origin ? Insights from a Time-Scaled Molecular Phylongeny of the Citharinoidei (Ostariophysi:Characiformes). *Plos ONE* 8.1 0 e77269.
- AVISE, J. C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. New York: Chapman & Hall. 511.pp
- BALDWIN, CAROLE & WEIGT, LEE. 2012. A New Species of Soapfish (Teleostei:

Serranidae: *Rypticus*), with Redescription of *R. subbifrenatus* and Comments on the Use of DNA Barcoding in Systematic Studies. *Copeia*. 2012, 1, 23-36.

BALDWIN, C. C., C. I. CASTILLO, L. A. WEIGT, AND B. C. VICTOR. 2011. Seven new species within western Atlantic *Starksia atlantica*, *S. lepicoelia*, and *S. sluiteri* (Teleostei: Labrisomidae), with comments on congruence of DNA barcodes and species. *ZooKeys*. 79, 21–72.

BALDWIN, C. C., L. A. WEIGT, D. G. SMITH, AND J. H. MOUNTS. 2009. Reconciling genetic lineages with species in western Atlantic *Coryphopterus* (Teleostei: Gobiidae), p. 113–140. In: Proceedings of the Smithsonian Marine Science Symposium. M. A. Lang, I. G. Macintyre, and K. Ru'tzler (eds.). Smithsonian Contributions to the Marine Sciences 38.

BARRETT, R. D. H. & P. D. N. HEBERT. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*. 83, 481-491.

BARTHEM, R., & GOULDING, M. 2007. An unexpected ecosystem: The Amazon as revealed by fisheries. Lima, Peru: Gráfico Biblos & Missouri Botanical Garden. 241pp.

BELLAFRONT E., MARIGUELA T. C., PEREIRA L. H. GARCIA, 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.

BENZAQUEM, D. C., OLIVEIRA, C., DA SILVA BATISTA, J., ZUANON, J. & PORTO, J. I. R. 2015. DNA Barcoding in Pencilfishes (Lebiasinidae: *Nannostomus*) reveals cryptic diversity across the Brazilian Amazon. *PLoS One*. 10. 4 e0112217

BEHEREGARAY, L. B., CHAE, J., CHAO, N. L. & CACCONE, A. 2005. of microsatellite loci for the Amazonian rummy-nose tetra, *Hemigrammus bleheri* (Teleostei, Characidae). *Molecular Ecology Notes*. 5. 536–537.

BETANCUR-R, R., ARCILA, D., VARI, R. P., HUGHES, L. C., OLIVEIRA, C.,

- SABAJ, M. H., & ORTÍ, G. 2019. Phylogenomic incongruence, hypothesis testing, and taxonomic sampling: The monophyly of characiform fishes. *Evolution*. 73. 2, 329-345.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D.J.; SODHI, N.S.; NG, P.K.L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K.K.; DAS, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 22, 148–155.
- BORBA, R. S., SILVA, E. L., PONZETTO, J. M., POZZOBON, A. P. B., CENTOFANTE, L., ALVES, A. L. & PARISE-MALTEMPI, P. P. 2013. Genetic structure of the ornamental tetra fish species *Piabucus melanostomus* Holmberg, 1891 (CHARACIDAE, IGUANODECTINAE) in the Brazilian Pantanal wetlands inferred by mitochondrial DNA sequences. *Biota Neotrop.* 13. 1, 42-46
- BUCKLIN, A., GUARNIERI, M., HILL, R. S., BENTLEY, A. M. & KAARTVEDT, S. 1999. Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive, species-specific PCR. *Hydrobiology*. 401, 239–254.
- BURNS, MICHAEL & SIDLAUSKAS, BRIAN. 2019. Ancient and contingent body shape diversification in a hyperdiverse continental fish radiation. *Evolution*. 73, 1-19
- BRITSKI, H.A., SILIMON, K.S. & LOPES, B.S. 2007. Peixes do Pantanal: Manual de identificação. Embrapa, Brasília. 230 pp.
- BRITSKI, H. A. 1999. et al. Peixes do Pantanal: manual de identificação. Corumbá: Embrapa. 184 pp.
- BÖHLKE, E. B. 1984. Catalog of type specimens in the ichthyological collection of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. *Acad. Nat. Sci. Philad., Spec. Publ.* 14-246 pp.
- BROWN, B., EMBERSON, R.M. & PATERSON, A.M. 1999. Mitochondrial COI and II provide useful markers for *Weiseana* (Lepidoptera, Hepialidae) species identification. *Bull. Entomol. Res.* 89, 287–294.

CARDOSO, DOMINGOS & SÄRKINEN, TIINA & ALEXANDER, SARA & AMORIM, ANDRÉ & BITTRICH, VOLKER & CELIS, MARCELA & DALY, DOUGLAS & FIASCHI, PEDRO & FUNK, VICKI & GIACOMIN, LEANDRO & GOLDENBERG, RENATO & HEIDEN, GUSTAVO & IGANCI, JOÃO & KELLOFF, CAROL & KNAPP, SANDRA & LIMA, HAROLDO & MACHADO, ANDERSON & SANTOS, RUBENS & MELLO-SILVA, RENATO & FORZZA, RAFAELA. 2017. Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. Proceedings of the National Academy of Sciences. 114. 40, 10695-10700

CARDOSO YP, ROSSO JJ, MABRAGAÑA E, GONZALEZ-CASTRO M, DELPIANI M, AVIGLIANO E, BOGAN S, COVAIN R, SCHENONE NF & DÍAS DE ASTARLOA JM. 2018. A continental-wide molecular approach unraveling mtDNA diversity and geographic distribution of the Neotropical genus *Hoplias*. PLoS ONE. 13.8,1-25

CARVALHO, M. L., OLIVEIRA, C., NAVARRETE, M. C., FROEHLICH, O. & FORESTI, F. 2002. Nuclear DNA content determination in Characiformes fish (Teleostei, Ostariophysi) from the neotropical region. Genet. Mol. Biol. 25. 1, 49-55.

CARVALHO DC, OLIVEIRA DAA, POMPEU PS, LEAL CG, OLIVEIRA C, HANNER R .2011. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River Basin. Mitochondr DNA. 22, 80–86

CENTOFANTE, L., BERTOLLO, L.A.C. & MOREIRA-FILHO, O. 2006. Chromosomal differentiation between populations of *Oligosarcus hepsetus* (Teleostei, Characidae) from small tributaries at opposite margins of the Paraíba Do Sul River (Brazil). Braz. Arch. Biol. Technol. 49, 981-987.

CHERNOFF B, MACHADO-ALLISON A .1999. *Bryconops colaroja* and *B. colanegra*, two new species from the Cuyuni and Caroni drainages of South America (Teleostei: Characiformes). Ichthyol Explor Freshw. 10, 355–370

COPE, E. D., 1872. On the fishes of the Ambyiacu River. Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.

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. 9, 1–12.

CORIN SE, LESTER PJ, ABBOTT KL, RITCHIE PA. 2007. Inferring historical introduction pathways with mitochondrial DNA: The case of introduced Argentine ants (*Linepithema humile*) into New Zealand. Diversity Distrib.13, 510–518.

CRAWFORD AJ, LIPS KR, BERMINGHAM E. 2010. Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity and evolutionary history in the highlands of central Panama. Proceedings of the National Academy of Sciences. 107. 31, 13777-13782

DAGOSTA, FERNANDO & DE PINNA, MARIO. 2019. The Fishes of the Amazon: Distribution and Biogeographical Patterns, with a Comprehensive List of Species. Bulletin of the American Museum of Natural History. 431. 1-163

DAWNAY N, OGDEN R, MCEWING R, CARVALHO GR, THORPE RS. 2007. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. Forensic Sci Int .173,1–6.

DE CARVALHO, D. C., OLIVEIRA, D. A. A., POMPEU, P. S., LEAL, C. G., OLIVEIRA, C. & HANNER, R. 2011. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishers: the case of the São Francisco River Basin. Mitochondrial DNA. 22. s1, 80–86.

DE MERONA, B., TEJERINA-GARRO, F.L., VIGOUROUX, R. 2012. Fishhabitat relationships in French Guiana rivers: a review. Cybium. 36, 7–15.

DESALLE R. 2006. Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: response to Rubinoff. Conservation Biology. 20, 1545–1547.

DORINI BF, RIBEIRO-SILVA LR, FORESTI F, OLIVEIRA C, MELO BF. 2020. Molecular phylogenetics provides a novel hypothesis of chromosome evolution in Neotropical fishes of the genus *Potamorhina* (Teleostei, Curimatidae). *JZool Syst Evol Res.* 2020.00, 1–9.

EDGAR, R. C. DRIVE R. M. & VALLEY M. 2004. MUSCLE: Multiple Musequence Alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research.* 32.5, 1792–97.

EIGENMANN, C. H. 1910. Catalogue of the fresh-water fishes of tropical and South temperate America. In: Reports of the Princeton University expeditions to Patagonia 1896-1899. *Zoology. Fishes Patagonia.* 375-511.

EIGENMANN, C. H., AND G. S. MYERS. 1929. The American Characidae. *Mem. Mus. Comp. Zool., Harvard College.* 43. 5, 429-574.

ESCOBAR-CAMACHO D, BARRIGA R, RON SR. 2015. Discovering Hidden Diversity of Characins (Teleostei: Characiformes) in Ecuador’s Yasuní National Park. *PLoS ONE.*10.8, 1-13 e0135569.

ESCHMEYER, W.N., FONG, J.D. 2020. Species of fishes by family/subfamily. *Catal. Fish.* 2020.

ESSELSTYN, J. A., EVANS, B. J., SEDLOCK, J. L., KHAN, F. A. A., & HEANEY, L. R. 2012. Single-locus species delimitation: a test of the mixed Yule–coalescent model, with an empirical application to Philippine round-leaf bats. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences.* 279, 3678–3686.

FARIAS, I. P., HRBEK, T., BRINKMANN, H., SAMPAIO, I. & MEYER, A. 2003. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. *Molecular Ecology Notes.* 3, 128–130.

FARIAS, I. P., TORRICO, J. P., GARCIA-DAVILA, C., SANTOS, M. C. F., HRBEK,

- T. & RENNO, J.-F. 2010. Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes) *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56, 1129–1135.
- FINK, W. L. & S. H. WEITZMAN. 1974. The so-called Cheirodontin fishes of Central America with description of two new species (Pisces: Characidae). *Smithsonian Contributions to Zoology*. 172, 1-46.
- FOUQUET A, GILLES A, VENCES M, MARTY C, BLANC M, GEMMELL NJ. 2007. Underestimation of species richness in neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS One*. 2, 1-10 e1109.
- FITZHUGH, K. 2006. DNA barcoding: an instance of technology-driven science? *Bioscience*. 56, 462–463.
- FLECKER AS. 1996. Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. *Ecology*. 77, 1845-1854.
- FRICKE, R., ESCHMEYER, W. N. & FONG, J. D. 2020. Species by family/subfamily. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Versão eletrônica acessada em 01 de março de 2020.
- FOLMER, O., M. BLACK, W. HOEH, R. LUTZ & R. VRIJENHOEK. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 5, 294-299.
- FUJISAWA, T. & BARRACLOUGH, T. G. 2013. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulated datasets. *Systematic Biology*. 62.5, 707–724.
- GÉRY, J. 1970. Le genre *Iguanodectes* Cope (Pisces, Characoidei). *Amazoniana*. 2.4, 417-433.

GÉRY, J. 1977. Characoids of the World. TFH Publications, Neptune City, NJ, USA. 672 pp.

GÉRY, J. 1993. Description de trois espèces nouvelles du genre *Iguanodectes* (Pisces, Characiformes, Characidae), avec quelques données récentes sur les autres espèces. Rev. Fr. Aquariol.19. (4, for 1992), 97-105.

GOULDING, M. 1980. The Fishes and the Forest. Explorations in Amazonian Natural History. University of California Press, Berkeley. 33. 2, 257

GOULDING, M., LEAL CARVALHO, M., FERREIRA, E.G. 1988. Rio Negro, Rich Life in Poor Water: Amazonian Diversity and Foodchain Ecology as Seen Through Fish Communities. SPB Academic Publishing, The Hague. 64. 4, 514-514

GOULDING, M.J., R. BARTHEM, AND E. FERREIRA. 2003. The Smithsonian atlas of the Amazon. Washington: Smithsonian Books. 253 pp.

GOMES, L.C., PESSALI, T.C., SALES, N.G., POMPEU, P.S., AND CARVALHO, D.C. 2015. Integrative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a neotropical river basin. Genetica. 143. 5, 581–588.

GUEDES, T. L. O., E. F. OLIVEIRA & P. H. F. LUCINDA. 2016. A new species of *Bryconops* (Ostariophysi:Characiformes: Characidae) from the upper rio Tocantins drainage, Brazil. Neotropical Ichthyology. 14.2 e150176.

GUEDES, T. O., OLIVEIRA, E. F., & LUCINDA, P. F. 2019. *Bryconops hexalepis* (Teleostei: Characidae), a new species from the rio Tocantins drainage, Brazil. Ichthyological Exploration of Freshwaters. 1115, 1-7.

GUIMARÃES, ERICK & OTTONI, FELIPE & KATZ, AXEL. 2016. Range extension of *Piabucus dentatus* (Koelreuter, 1763) for the Pindaré River drainage, Mearim River basin, Brazil (Characiformes: Iguanodectinae). Cybium. 41. 287-289.

GÜNTHER, A. 1864. Catalogue of the fishes in the British Museum. Catalogue of the

Physostomi, containing the families Siluridae, Characinidae, Haplochitonidae, Sternoptychidae, Scopelidae, Stomiatidae in the collection of the British Museum. Cat. Fishes. 5, 455 pp.

GREGORY, T. R. 2005. DNA barcoding does not compete with taxonomy. Nature. 434. 7037,1067

HAJIBABAEI, M., G. A. G. SINGER, E. L. CLARE & P. D. N. HEBERT. 2007. Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. BMC Biology. 5, 1-15.

HAJIBABAEI, M., G. A. C. SINGER & D. A. HICKEY. 2006. Benchmarking DNA barcodes: an assessment using available primate sequences. Genome. 49, 851-854.

HAMELS, J., GALA, L., DUFOUR, S., VANNUFFEL, P., ZAMMATTEO, N. & REMACLE, J. 2001. Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus*, species, and methicillin resistance. BioTechniques. 31, 1364–1372.

HAMMER O, HARPER DAT, RYAN PD. 2004. Past - Palaeontological Statistics, . Oslo: University of Oslo. 4,1-9

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L. & WAARD, JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B. 270. 1512, 313-321.

HEBERT, P.D.N., STOECKLE, M.Y., ZEMLAK, T. S. & FRANCIS, C. M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. PLoS Biology. 2. 10, 1657- 1663.

HEBERT, P. D. N & T. R. GREGORY. 2005. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. Systematic Biology. 54, 852-859.

HEBERT, P.D.N. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. Molecular Ecology Notes. 7, 535–543.

HOORN, C., AND F.P. WESSELINGH. 2010. Introduction: Amazonia, landscape and species evolution. *In* C. Hoorn and F.P. Wesselingh (editors), Amazonialandscape and species evolution: a look into the past: Oxford: Blackwell Publishing. 464 pp.

HUBERT, N., DUPONCHELLE, F., NUNEZ, 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*. 6, 2115–2136.

HUBERT, N., HANNER, R., HOLM, E., MANDRAK, N., TAYLOR, E., BURRIDGE, M., WATKINSON, D.A., DUMONT, P., CURRY, A., BENTZEN, P., ZHANG, J., APRIL, J., BERNATCHEZ, L. 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoS ONE*. 3, e2490.1-8

JANZEN, D. H., HALLWACHS, W., BLANDIN, P., BURNS, J. M., CADIOU, J., CHACON, I., WILSON, J. J. 2009. Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. *Molecular Ecology Resources*. 9, 1–26.

JARMAN, S. N. & ELLIOTT, N. G. 2000. DNA evidence for morphological and cryptic Cenozoic speciations in the Anaspididae, ‘living fossils’ from the Triassic. *J. Evol. Biol.* 13, 624–633.

JOLLIFFE IT. 2002. *Principal Component Analysis*. Springer Series in Statistics, 2nd ed, Springer, New York. 487 pp.

JUNK, WOLFGANG & BAYLEY, PETER & SPARKS, RICHARD. 1989. The Flood Pulse Concept in River-Floodplain Systems. *Can. Spec. Public Fish. Aquat. Sci.* 106, 110-127.

KAPLI, P., LUTTEROPP, S., ZHANG, J., KOBERT, K., PAVLIDIS, P., STAMATAKIS, A. & FLOURI, T. 2017. Multi-rate Poisson Tree Processes for single-locus species delimitation under Maximum Likelihood and Markov Chain Monte Carlo. *Bioinformatics*. 33. 11, 1630-1638.

KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C., AND TAMURA, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549.

KIMURA, M. 1980. Journal of Molecular Evolution A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.

KEARSE, M., MOIR, R., WILSON, A., STONES-HAVAS, S., CHEUNG, M., STURROCK, S., BUXTON, S., COOPER, A., MARKOWITZ, S., DURAN, C., THIERER, T., ASHTON, B., MEINTJES, P. & DRUMMOND, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinf.* 28. 12, 1647–1649.

KERR, K.C.R., STOECKLE, M.Y., DOVE, C.J., WEIGT, L.A., FRANCIS, C.M., HEBERT, P.D.N. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes.* 7, 535–543.

KERR, K.C.R., STOECKLE, M.Y., DOVE, C.J., WEIGT, L.A., FRANCIS, C.M., KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C., AND TAMURA, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549.

KNOWLTON, N. 1993. Sibling species in the sea. *A. Rev. Ecol. Syst.* 24, 189–216.

LÉVÊQUE, C., OBERDORFF, T., PAUGY, D., STIASSNY, M.L.J., AND TEDESCO, P.A. 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia.* 595. 1, 545–567.

LIMA, F.C.T., MALABARBA, L.R., BUCKUP, P.A., SILVA, J.F.P., VARI, R.P., HAROLD, A., BENINE, R.C., OYAKAWA, O.T., PAVANELLI, C.S., MENEZES, N.A., LUCENA, C.A.S., REIS, R.E., LANGEANI, F., CASATTI, L., BERTACO, V.A., MOREIRA, C.L.R. & LUCINDA, P.H.F. 2003. Genera Incertae Sedis in

Characidae. In: Reis, R.E., Kullander, S.O. & Ferraris, C.J. Jr. (Eds.), Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipurs. 106–169 pp.

LIPSCOMB, D., PLATNICK, N. & WHEELER, Q. 2003. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution*. 18, 65–66.

LUCINDA, P. H. F. & T. L. O. GUEDES. 2018. Taxonomic status of the South American characid fish *Cretochanes melanurus transitorius* Steindachner, 1915 (Teleostei: Characidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*. IEF-1057, 1-3.

LUNDBERG, J. G., MARSHALL, L. G., GUERRERO, J., HORTON, B., MALABARBA, M. C. S. L. & WESSELINGH, F. 1998. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S. & LUCENA, C. A S. 1998. *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS. 13-48.

MACHADO-ALLISON, A., P. A. BUCKUP, B. CHERNOFF & R. ROYERO. 1993. Las especies del genero *Bryconops* Kner, 1858 en Venezuela (Teleostei, Characiformes). *Acta Biologica Venezuelica*. 14, 1-20.

MACHADO, C. D. B., ISHIZUKA, T. K., FREITAS, P. D. D., VALIATI, V. H., & GALETTI, P. M., JR. 2017. DNA barcoding reveals taxonomic uncertainty in *Salminus* (Characiformes). *Systematics and Biodiversity*. 15. 4, 372–382.

NOGUEIRA MACHADO, VALERIA & COLLINS, RUPERT & OTA, RAFAELA & ANDRADE, MARCELO & FARIAS, IZENI & HRBEK, TOMAS. 2018. One thousand DNA barcodes of piranhas and pacus reveal geographic structure and unrecognised diversity in the Amazon. 8.1, 1-12.

MANWELL, C. & BAKER, C. M. A. 1963 A sibling species of seacucumber discovered by starch-gel electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol.* 10, 39–53.

MATEUSSI, N. T., MELO, B. F., FORESTI, F., & OLIVEIRA, C. 2019. Molecular Data Reveal Multiple Lineages in Piranhas of the Genus *Pygocentrus* (Teleostei,

Characiformes). *Genes*. 10. 5, 371.

MAYR E. 1942. *Systematics and the Origin of Species, from the View-point of a Zoologist*. New York: Harvard University Press. 372 pp.

MAYR, E. 1963. *Animal species and their evolution*; Harvard University Press: Cambridge, MA, USA; Oxford University Press: Oxford, UK. 797 pp.

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*. 9.1, 49–56.

MELO, B. F. & VARI, R. P. 2014. New species of *Cyphocharax* (Characiformes: Curimatidae) from the upper Rio Negro, Amazon basin. *Neotropical Ichthyology*. 12, 327–332.

MELO B.F., BENINE R. C., SILVA G. S., AVELINO G. S. & OLIVEIRA C. 2016a. Molecular phylogeny of the Neotropical fish genus *Tetragonopterus* (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Mol Phylogenet Evol*. 94, 709-717.

MELO, B. F., DORINI, B. F., FORESTI, F., & OLIVEIRA, C. 2018. Little divergence among mitochondrial lineages of *Prochilodus* (Teleostei, Characiformes). *Frontiers in Genetics*. 9, 107.

MIRANDE, J.M. 2019. Morphology, molecules and the phylogeny of Characidae (Teleostei, Characiformes). *Cladistics*. 35. 3, 282-300.

MIYA, M., AND NISHIDA, M. 2000. Use of mitogenomic information in Teleostean molecular phylogenetics: A tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Mol. Phylogenet. Evol*. 17, 437–455.

MOL, J.H., VARI, R.P., COVAIN, R., WILLINK, P.W., FISCH-MULLER, S. 2012. Annotated checklist of the freshwater fishes of Suriname. *Cybium*. 36, 263–292.

MOREIRA, C. 2003. Subfamily Iguanodectinae. Pages 172-173 in Check list of the freshwater fishes of South and Central America (Reis, R.E., S.O. Kullander & C.J. Ferraris, eds.). Edipucrs, Porto Alegre.

MORITZ, C. & CICERO, C. 2004. DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biology*. 2, 1529–1531.

MURRAY SW, CAMPBELL P, KINGSTON T, ZUBAID A, FRANCIS CM, KUNZ TH. 2011. Molecular phylogeny of hipposiderid bats from Southeast Asia and evidence of cryptic diversity. *Mol Phylogenet Evol*. Elsevier Inc. 2012. 62, 597–611.

NAGY, Z. T., SONET, G., GLAW, F., & VENCES, M. 2012. First large-scale DNA barcoding assessment of reptiles in the biodiversity hotspot of Madagascar, based on newly designed COI primers. *Public Library of Science ONE*. 7,1-11 e34506.

NANNEY, D. L. 1982. Genes and phenes in *Tetrahymena*. *Bioscience*. 32, 783–788.

NEAR, T. J., EYTAN, R. I., DORNBURG, A., KUHN, K. L., MOORE, J. A., DAVIS, M. P., SMITH, W. L. 2012. Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109. 34, 13698–13703.

NELSON LA, WALLMAN JF, DOWTON M, Using COI. 2007. barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Med Vet Entomol*. 21, 44–52.

NELSON, J.S. 200. *Fishes of the World*. 4th Edition, John Wiley & Sons, Hoboken, 601 pp.

NWANI CD, BECKER S, BRAID HE, UDE EF, OKOGWU OI, HANNER R. 2011. DNA barcoding discriminates freshwater fishes from southeastern Nigeria and provides river system-level phylogeographic resolution within some species. *Mitochondrial DNA*. 22, 43–51.

OCHOA, L. E., PEREIRA, L. H. G., COSTA-SILVA, G. J., ROXO, F. F., BATISTA, J. S., FORMIGA, K., FORESTI, F. & OLIVEIRA, C. 2015. Genetic structure and historical diversification of catfish *Brachyplatystoma platynemum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Amazon basin with implications for its conservation. *Ecology and Evolution*. 5, 2005–2020.

OLIVEIRA, C., AVELINO, G. S., ABE, K. T., MARIGUELA, T. C., BENINE, R. C., ORTÍ, G., VARI, P. R. & CORRÊA E CASTRO, R. M. 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*. 11. 275, 2-25

PACE, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*. 276, 734–740.

PAZ, A., & CRAWFORD, A. J. 2012. Molecular-based rapid inventories of sympatric diversity: A comparison of DNA barcode clustering methods applied to geography-based vs clade-based sampling of amphibians. *Journal of Biosciences*. 37. 5, 887–896.

PAULS SU, BLAHNIK RJ, ZHOU X, WARDWELL CT, HOLZENTHAL RW. 2010. DNA barcode data confirm new species and reveal cryptic diversity in Chilean *Smicridea* (*Smicridea*) (Trichoptera: Hydropsychidae). *Journal of the North American Benthological Society*. 29. 3, 1058–1074.

PATTON, J., M. SILVA, AND J. MALCOLM. 2000. Mammals of the Rio Jurua and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 244. 1-306.

PEREIRA L. H., 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 Paraná Basin of Brazil. *Mitochondrial DNA*. 22. s1, 87-96.

PEREIRA, L. H. G, G. M. G. MAIA, R. HANNER, F. FORESTI & C. OLIVEIRA.

2010. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul river Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA*. 21, 1-9.

PEREIRA, L. H. G., MAIA, G. M. G., HANNER, R., FORESTI, F., & OLIVEIRA, C. 2011. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA*. 22. s1, 71– 79.

PEREIRA LHG, HANNER R, FORESTI F & OLIVEIRA C. 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genet*. 14. 20, 2-14

PERSIS, M., A. C. S. REDDY, L. M. RAO, G. D. KHEDKAR, K. RAVINDER & K. NASRUDDIN. 2009. COI (cytochrome oxidase-I) sequence based studies of Carangid fishes from Kakinada coast, India. *Molecular Biology Report*. 36, 1733-1740.

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. 4, 595–609.

PIGGOTT, M.P., CHAO, N.L., AND BEHEREGARAY, L.B. 2011. Three fishes in one: cryptic species in an Amazonian floodplain forest specialist. *Biol. J. Linn. Soc*. 102. 2, 391–403.

PÖPPE J, SUTCLIFF E P, HOOPER JNA, WÖRHEIDE G, ERPENBECK D. 2010. COI Barcoding Reveals New Clades and Radiation Patterns of Indo-Pacific Sponges of the Family Irciniidae (Demospongiae: Dictyoceratida). *PLoS ONE*. 5.4, 1-6 e9950.

PUIILLANDRE, N.; LAMBERT, A.; BROUILLET, S. & ACHAZ, G. A. B. G. D. 2012. Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*. 21. 8, 1864-1877.

PFENNINGER M, NOWAK C, KLEY C, STEINKE D, STREIT B. 2007. Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of larval community structure in

morphologically cryptic *Chironomus* (Diptera) species. *Mol Ecol.* 16,1957–1968.

QUEIROZ, L. J. 2013. *Iguanodectes spilurus*. In: Luiz Jardim de Queiroz; Gislene Torrente-Vilara; Willian Massaharu Ohara; Tiago Henrique da Silva Pires, Jansen Zuanon, Carolina Rodrigues da Costa Doria. (Org.). *Peixes do Rio Madeira*. 1ed. São Paulo: Dialto. 2013. 1, 288-289.

RATNASINGHAM S. & HEBERT P. D. 2013. A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) system. *PloS one.* 8.7, 1-16 e66213.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; Ferrari Jr, C. J. 2003. Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. *Edipucrs*, Porto Alegre. 742 pp.

RENNO, J. F., HUBERT, N., TORRICO, J. P., DUPONCHELLE, F., NUNEZ RODRIGUEZ, J., GARCIA DAVILA, C., WILLIS, S. C. & DESMARAIS, E. 2006. Phylogeography of *Cichla* (Cichlidae) in the upper Madeira basin (Bolivian Amazon). *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 41, 503–510.

RIBEIRO, A. C. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: Na example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology.* 4. 2, 225-246.

RIZZO, ELIZETE & SATO,, Y. & BARRETO,, B.P. & GODINHO, H. 2003. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology.* 60, 1059-70.

ROSSO, J. J., MABRAGAÑA, E., GONZÁLEZ CASTRO, M. & DÍAZ DE ASTARLOA, J. M. 2012. DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. *Molecular Ecology Resources.* 12, 999–1011.

ROXO, FÁBIO & OCHOA, LUZ & COSTA SILVA, GUILHERME & OLIVEIRA, CLAUDIO. 2015. Species delimitation in *Neoplecostomus* (Siluriformes: Loricariidae) using morphologic and genetic approaches. *DNA Barcodes.* 3. 1, 110-117.

- RUBINOFF D, HOLLAND BS. 2005. Between two extremes: mitochondrial DNA is neither the panacea nor the nemesis of phylogenetic and taxonomic inference. *Systematic Biology*. 54, 92–961.
- RUBINOFFD. 2006. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conserv Biol*. 20, 1026–1033.
- RUBINOFF, D., CAMERON S, WILL K. 2006. A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for “barcoding” identification. *J Hered*. 97, 581–594.
- SAZIMA, I. 1983. Scale-eating in characoids and other fishes. *Environ. Biol. Fishes*. 9, 87–101.
- SANTOS, M. C. F., RUFFINO, M. L. & FARIAS, I. P. 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. *Journal of Fish Biology*. 71, 33–44.
- SANTOS, M. D. C. F., HRBEK, T. & FARIAS, I. P. 2009. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. *Molecular Ecology Resources*. 9, 874–876.
- SCHEEL, J.J. 1973. Fish chromosome and their evolution. Internal Report of Danmarks Akvarium, Charlottenlund, Denmark. 22 pp.
- SERRANO, E. A., MELO, B. F., FREITAS-SOUZA, D., OLIVEIRA, M. L. M., UTSUNOMIA, R., OLIVEIRA, C., & FORESTI, F. 2019. Species delimitation in Neotropical fishes of the genus *Characidium* (Teleostei, Characiformes). *Zool Scr*. 2019. 48, 69–80.
- SILVA, G. S. C., MELO, B. F., OLIVEIRA, C., & BENINE, R. C. 2016. Revision of the South American genus *Tetragonopterus* Cuvier, 1816 (Teleostei: Characidae) with description of four new species. *Zootaxa*. 4200, 1–46.

SILVA-OLIVEIRA, C., CANTO, A. L. C. & RIBEIRO, F. R. V. 2015. *Bryconops munduruku* (Characiformes: Characidae), a new species of fish from the lower Tapajós River basin, Brazil. *Zootaxa*. 3994. 1, 133–141.

SILVA, E.L., PISCOR, D., PONZETO, J.M., CENTOFANTE, L., ALVES, A.L.& PARISE-MALTEMPI, P.P. 2011. Cytogenetic characterisation of the ornamental freshwater fish, *Piabucus melanostomus* (Iguanodectinae) from Brazilian wetlands and its relation with species of Characidae basal group. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 22. 2, 477-484.

SILVA-OLIVEIRA, C., LIMA, F. C. T.& BOGOTÁ-GREGORY J. D. 2018. A new species of *Bryconops Kner* (Characiformes: Iguanodectidae) from the Rio Maicuru, lower Amazon basin, Brazil. *Zootaxa*. 4514. 3, 372–382.

SOUZA, C.S. & OLIVEIRA, C. & PEREIRA, L.H.G. 2015. *Knodus moenkhausii* (Characiformes: Characidae): one fish species, three hydrographic basins - a natural or anthropogenic phenomenon? *DNA Barcodes*. 3, 29-138

STAMATAKIS A., HOOVER P., ROUGEMONT J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Syst. Biol.* 57 .5, 758–771.

Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 30, 1312–1313.

STOECKLE M. 2003. Taxonomy, DNA, and the barcode of life. *Bioscience*. 53, 796–797.

VALDEZ-MORENO M, IVANOVA NV, ELIAS-GUTIERREZ M, CONTRERAS-BALDERAS S, HEBERT PDN. 2009. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *J Fish Biol.* 74, 377–402.

VAN DER SLEEN, P. & MOREIRA, C. R. 2017. Family Iguanodectidae-Iguanodectidae characiformes. pag. 163-165, In: VAN DER SLEEN, P. & ALBERT,

- J.S (eds.) Field Guide to the Fishes of the Amazon, Orinoco, and Guianas. Princeton University Press. New Jersey, USA. 464 pp.
- VARI, R.P. 1977. Notes on the characoid subfamily Iguanodectinae, with a description of a new species. Am. Mus. Novit., no. 2612, 1-6.
- VINCENT, S., VIAN, J. M. & CARLOTTI, M. P. 2000. Partial sequencing of the cytochrome oxidase-b subunit gene. I. A tool for the identification of European species of blow flies for post mortem interval estimation. J. Forensic Sci. 45, 820–823.
- VICTOR, B. C. 2007. *Coryphopterus kuna*, a new goby (Perciformes: Gobiidae: Gobiinae) from the western Caribbean, with the identification of the late larval stage and an estimate of the pelagic larval duration. Zootaxa. 1526, 51–61.
- VICTOR, B. C. 2010. The redcheek paradox: the mismatch between genetic and phenotypic divergence among deeply- divided mtDNA lineages in a coral-reef goby, with the description of two new cryptic species from the Caribbean Sea. Journal of the Ocean Science Foundation. 2010, 1–16.
- TAYLOR BW, FLECKER AS, HALL RO JR. 2006. Disrupts carbon flow in a diverse tropical river. Science. 313, 833-836.
- TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A. & KUMAR S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30. 12, 2725–2729.
- TAGLIACOLLO, V. A., SOUZA-LIMA, R., BENINE, R. C. & OLIVEIRA, C. 2012. Molecular phylogeny of Aphyocharacinae (Characiformes, Characidae) with morphological diagnoses for the subfamily and recognized genera. Molecular Phylogenetics and Evolution. 64, 297–307.
- TELETSCHEA F. 2009. Molecular identification methods of fish species: Reassessment and possible applications. Rev Fish Biol Fish. 19, 265-293.

TERENCIO, M. L., SCHNEIDER, C. H. & PORTO, J. I. R. 2012. Molecular signature of the D-loop in the brown pencilfish *Nannostomus eques* (Characiformes, Lebiasinidae) reveals at least two evolutionary units in the Rio Negro basin, Brazil. *Journal of Fish Biology*. 81, 110–124.

TOFFOLI, D., T. HRBEK, M. L. G. ARAÚJO, M. P. ALMEIDA, P. CHARVET-ALMEIDA & I. P. FARIAS. 2008. A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). *Genetics and Molecular Biology*. 31, 324–336

TORNABENE, L., C. C. BALDWIN, L. A. WEIGT, AND F. PEZOLD. 2010. Exploring the diversity of western Atlantic *Bathygobius* (Teleostei: Gobiidae) using mitochondrial cytochrome c oxidase-I, with descriptions of two new species. *Aqua*. 16, 141–170.

TORRICO, J. P., HUBERT, N., DESMARAIS, E., DUPONCHELLE, F., NUÑEZ RODRIGUEZ, J., MONTOYA-BURGOS, J., GARCIA DAVILA, C., CARVAJAL-VALLEJOS, F. M., GRAJALES, A. A., BONHOMME, F. & RENNO, J.-F. 2009. Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): biogeographic and evolutionary implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 51, 588–594.

TREWICK, S. A. 2000. Mitochondrial DNA sequences support allozyme evidence for cryptic radiation of New Zealand *Peripatoides* (Onychophora). *Mol. Ecol*. 9, 269–282.

TURNER, T., MCPHEE, M. V., CAMPBELL, P. & WINEMILLER, K. O. 2004. Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. *Journal of Fish Biology*. 64, 186–201.

WANG, TAI & ZHANG, YANPING & YANG, ZHUOYU & LIU, ZHE & DU, YANYAN. 2020. DNA Barcoding Reveals Cryptic Diversity in the Genus *Triplophysa* (Cypriniformes: Cobitidae, Nemacheilinae) from the Northeastern Qinghai-Tibet Plateau. *BMC Evolutionary Biology*. 1, 1–28.

WARD, R. D., ZEMLAK, T. S., INNES, B. H., LAST, P. R. & HEBERT, P. D. N.

2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 360, 1847–1857.

WARD RD, HOLMES BH, YEARSLEY GK. 2008. DNA barcoding reveals a likely second species of Asian sea bass (barramundi) (*Lates calcarifer*). *Journal of Fish Biology*. 72, 458–463.

WARD, RD.; HANNER, R. & HEBERT, PDN. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*. 74. 2, 329–356.

WEBB, S.D. 1995. Biological implications of the Middle Miocene Amazon Seaway. *Science*. 269, 361-362.

WEITZMAN SH, VARI RP. 1988. Miniaturization in South American freshwater fishes; and overview and discussion. *Proc Biol Soc Wash*. 101, 444-465.

WIMBERGER, P.H. 1992. Plasticity of fish body shape. The effects of diet, development, family and age in two species of *Geophagus* (Pisces: Cichlidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 45. 3, 197–218.

WINGERT J. M.; CHUCTAYA, J.; MALABARBA, L. R. 2018. A new species of *Bryconops* (Characiformes: Iguanodectidae) from the Rio Tapajós basin, Brazil. *Zootaxa*. 4418. 4, 379– 387.

WOESE, C. R. & FOX, G. E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 97, 8392–8396.

ZHANG, J., KAPLI, P., PAVLIDIS, P., & STAMATAKIS, A. 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*. 29, 2869–2876.

ZEMPLAK TS, WARD RD, CONNELL AD, HOLMES BH, HEBERT PD. 2009. DNA barcoding reveals overlooked marine fishes. *Molecular Ecology Resources* .9.1, 327–242.

XIA X. 2013. DAMBE5: A Comprehensive Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Mol. Biol. Evol.* 30. 7, 1720–1728.