

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 21/02/2023.

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

CHARACINAE (ACTINOPTERYGII: CHARACIFORMES:
CHARACIDAE): IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E ESTUDO DAS
RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE ESPÉCIES

CAMILA DA SILVA DE SOUZA

BOTUCATU-SP

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

CHARACINAE (ACTINOPTERYGII: CHARACIFORMES: CHARACIDAE): IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E ESTUDO DAS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE ESPÉCIES

Discente: Camila da Silva de Souza

Orientador: Dr. Claudio de Oliveira

Co-orientador: Dr. Bruno Francelino de Melo

Tese 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 Doutorado.

BOTUCATU-SP

2022

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

Souza, Camila da Silva de.

Characinae (actinopterygii: characiformes: characidae) :
identificação molecular e estudo das relações filogenéticas
entre espécies / Camila da Silva de Souza. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Claudio de Oliveira

Coorientador: Bruno Francelino de Melo

Capes: 20400004

1. Characinae. 2. Biodiversidade. 3. Filogenia.
4. Zoologia - Classificação. 5. Código de barras de DNA
taxonômico.

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

AVISO

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

NOTICE

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

Esta pesquisa foi financiada com recursos da
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo
Número: 2017/06551-0 e 2019/04602-1



"It seems to me that the natural world is the greatest source of excitement; the greatest source of visual beauty; the greatest source of intellectual interest. It is the greatest source of so much in life that makes life worth living." (David Attenborough)

À vida

AGRADECIMENTOS

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

Ao auxílio financeiro concedido pelo processo nº 2017/06551-0 e 2019/04602-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao Dr. Claudio de Oliveira, pela orientação acadêmica em todas as fases do projeto, e às oportunidades oferecidas desde a iniciação científica, essenciais para a minha formação.

Ao Dr. Bruno F. Melo pela orientação, amizade e imensurável motivação!

Ao Dr. Ricardo Benine pela oportunidade em realizar o estágio de docência sob sua orientação e pelas discussões e ensinamentos.

Ao Dr. George M.T. Mattox e Dr. Mônica Toledo-Piza pelas grandiosas colaborações e conhecimento compartilhado.

Ao Dr. Brian L. Sidlauskas, por ter me acolhido e orientado na Oregon State University - USA durante o doutorado-sanduíche e pelos valiosos exemplos e ensinamentos sobre a vida profissional e pessoal.

Ao Dr. Adamm Summers, pela oportunidade de obter dados para o meu projeto do doutorado-sanduíche no Friday Harbor Laboratories - University of Washington - USA.

Ao Dr. Thaddaeus Buser, Álvaro Cortés, Hakan Aydogan e Jonathan Huie pela ajuda e colaboração durante o doutorado-sanduíche.

À Dr. Luz Ochoa e Dr. Nadayca Mateussi pela amizade e por compartilharem seus conhecimentos para a execução desse trabalho e terem sido minhas maiores referências próximas da representatividade feminina na ictiologia.

À Dr. Rafaela Ota e ao Dr. Victor Tagliacollo, Dr. Fernando Carvalho e Dr. Fernando Jerep por todos os ensinamentos e sugestões na última etapa deste trabalho.

A todos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, em especial a Angélica Dias, Beatriz Dorini, Bruno Mora, Cristiane Shimabukuro-Dias, Crithian Conde, Diogo Freitas, Daniela Oliveira, Duílio Zerbinato, Érica Serrano, Fabilene Gomes, Fabio Roxo,

Gabriel Costa e Silva, Guilherme J. da Costa Silva, Junior Flausino, Lais Reia, Maria Ligia, Natalia Mendez, Sâmia Mouallem, Silvana Melo e Renato Devidé, por todos os momentos de descontração, incentivo e colaboração.

As grandes amigas Aline Veríssimo, Carolina Magalhães, Laura Borgatto e Milene Pereira, por todo companheirismo e motivação ao longo da vida acadêmica e pessoal.

À Eric. V. Ywamoto por ter chegado na minha vida no começo desse projeto e ser um dos motivos de eu seguir em frente e finalizá-lo. Meus sinceros agradecimentos por toda ajuda, companheirismo e por sempre acreditar em mim, muitas vezes mais do que eu mesma.

A toda minha família que são fonte de motivação e inspiração e em especial a Giulia, Mirella, Miguel, Bruna, Tiago, David, Felipe, Cinthia, Rosa e William.

E, finalmente, deixo meu eterno agradecimento aos meus pais, Valdomiro e Silvana, pelo amor, suporte e por sempre incentivarem minhas aventuras pelo mundo em busca de experiências e sabedoria.

RESUMO

Characinae é uma das subfamílias mais diversas de Characidae com 85 espécies válidas amplamente distribuídas pelas América do Sul e Central. A subfamília é representada por espécies de pequeno a médio porte que adotam diferentes estratégias alimentares, tais como carnívoria, onívoria e lepidofagia. As relações filogenéticas dentro de Characinae e desta com outras subfamílias de Characidae têm sido objeto de alguns estudos morfológicos, porém, não há, até o momento, hipóteses de relacionamento incluindo uma significativa representatividade de espécies de Characinae usando caracteres morfológicos ou moleculares. Além disso, os estudos publicados ainda apresentam incongruências nas relações intergenéricas e interespecíficas. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos testar as hipóteses de relações filogenéticas da subfamília Characinae através de análises filogenômicas utilizando os elementos ultraconservados (UCEs) e construir um banco de dados genéticos de DNA *barcode* para identificar geneticamente as espécies de Characinae. Os resultados das análises filogenéticas corroboram a hipótese morfológica em relação à monofilia de Characinae e revelam novas hipóteses de relações intergenéricas e interespecíficas. Com base na filogenia obtida, analisamos origem e diversificação, assim como a evolução do tamanho e formato do corpo. Os resultados das identificações moleculares reconheceram uma diversidade antes subestimada que deverá contribuir para ampliação do conhecimento sobre a diversidade das espécies de Characinae.

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

ABSTRACT

Characinae is one of the most speciose subfamilies of Characidae and widely distributed throughout South and Central America. The subfamily contains small to medium-sized species that adopt distinct feeding strategies as carnivory, omnivory and lepidophagy. Phylogenetic relationships within the Characinae and with other subfamilies have been subject of a few morphological studies, although none hypothesis included a representative number of Characinae species using either morphological or molecular characters. Furthermore, the proposed hypotheses still present inconsistencies at intergeneric and interspecific levels. In this context, the present study aimed to test the hypotheses of phylogenetic relationships of the subfamily Characinae through phylogenomic analyzes using ultraconserved elements (UCEs) and to generate a barcode DNA genetic database for molecular identification of Characinae. The results of the phylogenetic analyses corroborate the morphological hypothesis about the monophyly of Characinae and reveal new hypotheses of intergeneric and interspecific relationships. Based on the phylogeny obtained, we analyzed the origin, diversification, and the evolution of body size and body shape. The results of molecular identification recognized a previously underestimated diversity that should contribute to the expansion of knowledge about the diversity of Characinae.

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

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
JUSTIFICATIVA	21
OBJETIVOS	22
CAPÍTULO 1. Phylogenomic analysis of the Neotropical fish subfamily Characinae using ultraconserved elements (Teleostei: Characidae)	29
Introduction	31
Materials and Methods	36
Results and Discussion	42
Bibliography	54
Supplementary information	63
CAPÍTULO 2. Evolution and ecomorphology of the subfamily Characinae (Actinopterygii: Characiformes: Characidae)	83
Introduction	85
Materials and Methods	87
Results	98
Discussion	105
Bibliography	108
Supplementary information	115
CAPÍTULO 3. Molecular identification and description of a new species of <i>Phenacogaster</i> (Characidae: Characinae)	119
Introduction	120
Materials and Methods	122
Results	124
Discussion	134
Bibliography	137
Supplementary information	140

CAPÍTULO 4. Molecular species delimitation of the Cynopotamini genera <i>Acestrocephalus</i>, <i>Cynopotamus</i>, and <i>Galeocharax</i> (Teleostei: Characidae: Characinae)	145
Introduction	146
Materials and Methods	149
Results	151
Discussion	155
Bibliography	158
Supplementary information	163

CAPÍTULO 5. Molecular identification of species of the tribe Characini (Teleostei: Characidae: Characinae)	168
Introduction	170
Materials and Methods	172
Results	174
Discussion	179
Bibliography	182
Supplementary information	188

INTRODUÇÃO GERAL

Subfamília Characinae

Characinae Eigenmann, 1910 representa a terceira maior subfamília de Characidae (Teleostei: Characiformes) (Fricke *et al.*, 2022) e *sensu* Mattox & Toledo-Piza, 2012 compreende 85 espécies (Fricke *et al.*, 2022) agrupadas em sete gêneros: *Acanthocharax* Eigenmann, 1912, *Acestrocephalus* Eigenmann 1910, *Charax* Scopoli 1777, *Cynopotamus* Valenciennes 1850, *Phenacogaster* Eigenmann 1907, *Galeocharax* Fowler 1910 e *Roeboides* Günther, 1864 (Tabela 1). As espécies de Characinae são conhecidas popularmente como peixes-cachorra, peixes-cigarra, dentudos e tetra-vidros (*glass tetras*), dentre outros nomes (Géry 1977; Mattox & Toledo-Piza 2012) e estão amplamente distribuídas pela região Neotropical desde o sul do México até afluentes da bacia dos rios Paraguai e Uruguai na Argentina, com ocorrência principalmente em rios de fluxo lento associados com a vegetação marginal (Lucena & Menezes 2003; Mattox *et al.*, 2017). A maioria das espécies são facilmente reconhecidas devido ao formato alto do corpo, especialmente na região anterior onde uma gibosidade é característica, embora esta esteja ausente em *Phenacogaster* e *Acestrocephalus* (Lucena & Menezes 2003). São espécies de pequeno a médio porte que apresentam diferentes hábitos alimentares, como a carnivorina adquirida pela maioria dos gêneros, a onivoria presente nas espécies do gênero *Phenacogaster* e a lepidofagia nas espécies de *Roeboides*, que apresentam modificações especializadas como dentes mamiliformes externos para esse tipo de hábito alimentar (Géry 1977; Sazima & Machado 1982; Sazima 1984; Lucena & Menezes 2003). As espécies de Characinae não exercem grande importância para a economia pesqueira, mas apresentam importância para a pesca de subsistência de populações ribeirinhas e é de interesse da aquariofilia, sendo reconhecidas como espécies com potencial ornamental (Venere & Garutti 2001; Hercos *et al.*, 2009).

Na sistemática Characinae tem uma notória importância por conter *Charax*, o gênero-tipo da família e da ordem. Apesar dessa notoriedade a história taxômica de Characinae foi baseada por muito tempo a agrupamentos que incluíram representantes da família Characidae (Eigenmann 1910, 1912; Myers 1960; Géry 1966, 1977; Weitzman & Vari 1987; Lucena 1998, Lucena & Menezes 2003). A última definição de agrupamento foi proposto por Lucena & Menezes, 2003 que incluiu 12 gêneros *Acanthocharax*; *Acestrocephalus*; *Charax*; *Cynopotamus*; *Galeocharax*; *Gnathocharax* Fowler 1913; *Heterocharax* Eigenmann 1912; *Hoplocharax* Géry 1966; *Lonchogenys* Myers 1927; *Phenacogaster*; *Priocharax* Weitzman & Vari 1987; *Roeboides*) baseados no formato do corpo, presença de mais de 20 dentes cônicos na maxila, pseudotímpano na frente da primeira costela pleural e nadadeira peitoral larval em espécimes de até 41,0 mm de comprimento.

Mirande (2009, 2010) baseado em dados filogenéticos morfológicos e da literatura recuperou a monofilia de Characinae incluindo oito dos 12 gêneros (*sensu* Lucena & Menezes, 2003): *Acanthocharax*, *Acestrocephalus*, *Charax*, *Cynopotamus*, *Galeocharax*, *Phenacogaster*, *Priocharax* e *Roeboides*. Adicionalmente, propôs três gêneros, *Bryconexodon* Géry, 1980, *Exodon* Müller & Troschel 1844 e *Roeboexodon* Géry 1959 como pertencente a Characinae formando um clado-irmão de todos os gêneros remanescentes da subfamília. No entanto, mais recentemente com um conjunto mais amplo de táxons e caracteres, reinterpretou esses resultados e atribuiu *Bryconexodon*, *Exodon* e *Roeboexodon* para sua própria subfamília, Exodontinae (Mirande 2019: 296).

Mattox & Toledo-Piza (2012) realizaram o primeiro estudo filogenético de Characinae baseado em caracteres morfológicos. Seus resultados indicaram Characinae irmã de *Tetragonopterus* Cuvier, 1816 e internamente restringida ao clado (*Phenacogaster* ((*Charax*+*Roeboides*) (*Acanthocharax* (*Cynopotamus* (*Acestrocephalus*+*Galeocharax*))))). *Priocharax* é recuperado numa politomia composta por *Lonchogenys*, *Heterocharax* e *Hoplocharax* dentro de Heterocharacinae. Os autores ainda propõem/redefinem as tribos Phenacogasterini (*Phenacogaster*), Characini (*Charax* e

Roeboides) e Cynopotamini (*Acanthocharax*, *Acestrocephalus*, *Cynopotamus* e *Galeocharax*). Os demais gêneros propostos por Lucena & Menezes, 2003 foram incluídos em Heterocharacinae e constituíram a tribo Heterocharacini (*Gnatocharax* (*Lonchogenys* (*Heterocharax*+*Hoplocharax*))) irmã de Roestini (*Roestes* Günther 1864 + *Gilbertolus* Eigenmann 1907) e distante dos Characinae (*sensu* Lucena & Menezes 2003).

Outros estudos de Characiformes também incluíram representantes de Characinae usando dados moleculares (Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Tagliacollo *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2016; Betancur- R *et al.*, 2019) e análise de evidência total (Mirande 2019). Estes estudos concordam sobre a relação entre Characinae e Tetragonopterinae (Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Tagliacollo *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2016; Mirande, 2019; Betancur- R *et al.*, 2019); no entanto, os estudos moleculares não corroboram a monofilia de *Cynopotamus* (Oliveira *et al.*, 2011; Tagliacollo *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2016) e de *Roeboides* (Betancur-R *et al.*, 2019). Adicionalmente, *Acanthocharax* é hipotetizado como o grupo irmão de (*Charax*+*Roeboides*) ou (*Cynopotamus* (*Acestrocephalus*+*Galeocharax*)) em estudos morfológicos (Lucena 1998; Mattox & Toledo-Piza 2012), mas ainda não foram incluídos em estudos moleculares.

Relações interespecíficas em Characinae

Hipóteses de relações interespecíficas em Characinae ainda são escassas e restritas às análises morfológicas, revisões taxonômicas ou descrições de espécies. *Phenacogaster*, um dos gêneros mais diversos, ainda necessita de descrições de muitas espécies e da definição de subgrupos (Lucena & Malabarba 2010). Das 23 espécies válidas, quatro (*P. beni* Eigenmann 1911, *P. microstictus* Eigenmann 1909, *P. pectinata* (Cope 1870) e *P. suborbitalis* Ahl 1936) apresentam ampla distribuição e compõem o complexo *P. pectinata* (Lucena & Malabarba 2010). Além delas, várias espécies não descritas compõem este grupo (Lucena & Malabarba 2010) e a dificuldade em

diagnosticar essas espécies tem sido explicada pela ampla distribuição geográfica e ausência de diferenças morfológicas consistentes (Géry 1972; Lucena 2003; Lucena & Malabarba 2010).

Lucena (1998) propõe quatro subunidades de *Roeboides*: grupo *dispar* (*R. dispar* Lucena 2001), grupo *microlepis* (*R. araguaito* Lucena, 2003, *R. margareteae* Lucena 2003, *R. microlepis* (Reinhardt 1851) e *R. myersii* Gill 1870), grupo *affinis* [*R. affinis* (Günther, 1868), *R. biserialis* (Garman, 1890), *R. descavadensis* Fowler 1932, *R. numerosus* Lucena 2000, *R. oligistos* Lucena 2000, *R. paranensis* Pignalberi 1975 (= *R. descavadensis*), *R. prognathus* (Boulenger 1895) (= *R. affinis*), *R. thurni* Eigenmann 1912 (= *R. affinis*), *R. xenodon* (Reinhardt 1851) e *R. sazimai* Lucena 2007)] e grupo *guatemalensis* (*R. bouchellei* Fowler 1923, *R. carti* Lucena 2000, *R. dayi* (Steindachner 1878), *R. dientonito* Schultz 1944, *R. guatemalensis* (Günther 1864), *R. ilsea* Bussing 1986, *R. occidentalis* Meek & Hildebrand 1916 e *R. loftini* Lucena 2011). O grupo *microlepis* é hipotetizado como mais relacionado às espécies transandinas do grupo *guatemalensis* (Lucena 2000). Alternativamente, Mattox & Toledo-Piza (2012), mostraram a relação (*R. dientonito* ((*R. affinis* + *R. descavadensis*) (*R. myersii* (*R. occidentalis* + *R. xenodon*))))).

Recentemente publicada, a revisão de *Charax* inclui a redescrição de todas as espécies além da descrição de *C. delimai* Menezes & Lucena 2014 e a sinonimização de *C. unimaculatus* Lucena 1989 em *C. michaeli* Lucena 1989 (Menezes & Lucena 2014). A única hipótese de relacionamento é apresentada baseada em caracteres morfológicos e inclui quatro das 17 espécies (Mattox & Toledo-Piza 2012). Esta filogenia recupera a relação ((*C. condei* + *C. stenopterus*) (*C. gibbosus* + *C. pauciradiatus*)).

Cynopotamus contém 12 espécies (Fricke *et al.*, 2022) e apenas a relação (*C. xinguano* Menezes 2007 (*C. gouldingi* Menezes 1987 (*C. kincaidi* (Schultz 1950) (*C. juruena* Menezes 1987 + *C. tocantinenses* Menezes 1987)))) foi hipotetizada através de caracteres morfológicos (Mattox & Toledo-Piza 2012). Dados moleculares não recuperaram a monofilia de *Cynopotamus*, sendo *C.*

kincaidi irmão de *Roeboides guatemalensis* e *C. venezulae* (Schultz 1944) irmão de *Acestrocephalus*+*Galeocharax* (Oliveira *et al.*, 2011).

Acestrocephalus teve cinco espécies descritas recentemente num total de oito (Menezes 2006) e a única hipótese existente consiste na relação (*A. acutus* Menezes 2006 (*A. sardina* (Fowler 1913) (*A. pallidus* Menezes 2006 + *A. stigmatus* Menezes 2006))) (Mattox & Toledo-Piza 2012).

Galeocharax foi recentemente revisado (Giovannetti *et al.*, 2017) e apenas três espécies foram consideradas como válidas (*G. gulo* (Cope 1870), *G. goeldii* (Fowler 1913), *G. humeralis* (Valenciennes 1834), e com *G. knerii* (Steindachner 1879) considerada sinônima de *G. gulo*). A filogenia morfológica de Characinae contendo todas as espécies de *Galeocharax* não resolve as relações, apresentando uma politomia (Mattox & Toledo-Piza 2012). Nenhuma filogenia molecular entre espécies desses gêneros, nem estudos aplicando técnicas de filogenômica foram realizadas em Characinae até presente momento.

DNA Barcode

Estudos baseados em identificação molecular usando a metodologia DNA barcode (Hebert *et al.*, 2003) tem revelado números subestimados de espécies antes não reconhecidas e vem se mostrando resolutivos para questões taxonômicas em diferentes grupos de peixes neotropicais, tais como Characidae (Pereira *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013, Barreto *et al.*, 2018), Lebiasinidae (Benzaquem *et al.*, 2015), Loricariidae (Costa-Silva *et al.*, 2015; de Borba *et al.*, 2019; Fagundes *et al.*, 2020), Serrasalminidae (Machado *et al.*, 2018; Mateussi *et al.*, 2020; Ota *et al.*, 2020) e Curimatidae (Melo *et al.*, 2016b). O uso dessa técnica pode então ser promissor para Characinae podendo possivelmente revelar uma diversidade ainda não reconhecida, uma vez que não há estudos de identificação molecular para Characinae e os estudos recentes têm identificado novas espécies (Menezes & Lucena 2014; Lucena, Antonetti & Lucena 2018; Guimarães, Brito, Ferreira & Ottoni 2018; Lucena

& Lucena 2019) principalmente em *Roeboides* e *Phenacogaster* que existem espécies de ampla distribuição e em *Phenacogaster* que apresenta o complexo *P. pectinata* e outras espécies ainda não descritas (Lucena & Malabarba 2010). Com isso, o DNA barcoding foi utilizado no presente estudo de Charcinae a fim de elucidar as unidades taxonômicas que os compõem e no direcionamento dos estudos filogenômicos.

Elementos ultraconservados (UCEs)

Os elementos ultraconservados (*ultraconserved elements* - UCEs) são regiões do genoma extremamente conservadas e assim compartilhadas entre grupos pertencentes a linhagens muito distintas, como, por exemplo, aves e humanos (Bejerano *et al.*, 2004). Eles foram descritos por Bejerano *et al.* (2004), que encontraram 481 segmentos maiores de 200 pares de bases que eram absolutamente (100%) conservados em regiões ortólogas de humanos, ratos e camundongos e altamente conservados nos genomas de galinhas e cães (95–99%, respectivamente). Estudos posteriores mostraram que os UCEs também estão presentes em diversos outros organismos, como outros vertebrados, insetos e fungos (Siepel *et al.*, 2005; Faircloth *et al.*, 2012).

O papel dos UCEs no genoma ainda não está esclarecido (Dermitzakis *et al.*, 2005), embora os UCEs tenham sido associados com regulação gênica ou desenvolvimento (Sandelin *et al.*, 2004; Woolfe *et al.*, 2004) e se tem assumido que os UCEs são importantes pela sua natureza extremamente conservada entre grupos muito distantes filogeneticamente. Os UCEs são identificados nos organismos pelo alinhamento de vários genomas e por regiões desse alinhamento com áreas com conservação de sequências muito altas (95–100%) e filtradas utilizando critérios específicos como o comprimento das sequências (e.g. Bejerano *et al.*, 2004). Suas sequências conservadas permitem uma fácil identificação e alinhamento entre genomas e a premissa de contínua variabilidade nas sequências que flanqueiam cada UCE sugere que eles podem ser um tipo

de “fóssil molecular”, retendo um sinal de história evolutiva em diversas escalas de tempo, dependendo da distância da região central dos UCEs (Faircloth *et al.*, 2012).

Faircloth *et al.* (2012) introduziram os UCEs como uma nova classe de marcadores moleculares em estudos filogenéticos através do enriquecimento de bibliotecas genômicas contendo centenas ou milhares de loci, utilizando sequenciamento de nova geração (Faircloth *et al.*, 2012). Como as sequências de UCEs são altamente conservadas elas são utilizadas para o anelamento de sondas (probes), a partir das quais as sequências flanqueadoras dos UCEs são lidas. A presença de regiões com diferentes níveis de variabilidade tem tornado esta técnica muito promissora no campo da sistemática filogenética (Pennisi 2013). Além disso, os UCEs têm sido utilizados em muitos níveis de comparação entre organismos, de populações até grandes grupos (McCormack *et al.*, 2012, 2013; Crawford *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2014; Starrett *et al.*, 2016).

Em peixes o primeiro estudo foi realizado por Faircloth *et al.* (2013). Nesse estudo foram sequenciados 500 loci de cerca de 30 espécies de Actinopterygii e as filogenias obtidas mostram nós altamente resolvidos em todos níveis (recentes e antigos). Os resultados suportaram as relações entre *Amia* e *Lepisosteus* (Holostei) e revelaram que os Elopomorpha e depois os Osteoglossomorpha são as primeiras linhagens a divergir entre as linhagens dos teleósteos. Em sequência, outros trabalhos foram realizados mostrando os UCEs como promissor e excelente marcador molecular para estudos filogenéticos: Amarsipidae (Harrington *et al.*, 2016), Characiformes (Chakrabarty *et al.*, 2017); Acanthomorpha (Alfaro *et al.*, 2018), Loricariidae (Roxo *et al.*, 2019), Trichomycteridae (Ochoa *et al.*, 2020), Serrasalminidae (Mateussi *et al.*, 2020) e Heptapteridae (Silva *et al.*, 2021).

Em comparação com os estudos baseados em marcadores moleculares multi-locus o uso dos UCEs tem se mostrado bastante eficiente. A razão para este rápido crescimento está ligada a diferentes características de sua abordagem, como a obtenção de dados de eventos de divergência

recente e antiga (Crawford *et al.*, 2012; Harvey *et al.*, 2016; Manthey *et al.*, 2016) e alto custo-benefício em função do tempo e baixo custo dada a grande quantidade de dados gerados.

JUSTIFICATIVA

Várias questões no âmbito da sistemática de Characinae ainda permanecem não resolvidas como levantadas acima e aqui sumarizadas: 1) a posição de *Acanthocharax* ainda é incerta, devido à falta de amostragem para evidência molecular; 2) a posição de *Priocharax* ainda não foi testada utilizando dados moleculares; 3) a monofilia de *Cynopotamus* foi rejeitada pelas hipóteses moleculares de Oliveira *et al.* (2011), Tagliacollo *et al.* (2012) e Melo *et al.* (2016) e de *Roeboides* em Betancur-R *et al.* (2019); 4) as relações interespecíficas em cada um dos gêneros necessitam de uma maior amostragem de táxons terminais; 5) a diversidade molecular de espécies não é conhecida. A Tabela 1 mostra o número de táxons analisados pelos principais estudos morfológicos e moleculares de Characidae (Mirande 2018), morfológico da subfamília Characinae (Mattox & Toledo-Piza 2012) e molecular de Characidae (Oliveira *et al.*, 2011). Pode-se notar uma necessidade de maior amostragem de espécies de Characinae para geração de hipóteses filogenéticas mais robustas. Além disso, vários problemas taxonômicos ainda existentes em vários gêneros de Characinae podem ser esclarecidos com a identificação molecular de espécies. Finalmente, os recentes avanços na sistemática molecular com a utilização de supermatrizes em escala genômica tem proporcionado uma ótima oportunidade para obter filogenias mais robustas, e sua consequente utilização em estudos macroevolutivos.

Tabela 1. Número de espécies analisadas por gênero de Characinae em estudos anteriores e em nosso estudo.

Gênero	Espécies válidas	Oliveira <i>et al.</i> , 2011	Mattox & Toledo-Piza, 2012	Mirande, 2018	Este estudo
<i>Acanthocharax</i>	1	0	1	0	1
<i>Acestrocephalus</i>	8	1	4	1	3
<i>Charax</i>	17	1	4	2	10
<i>Cynopotamus</i>	12	2	5	1	9
<i>Galeocharax</i>	3	1	3	1	3
<i>Phenacogaster</i>	23	1	4	3	13
<i>Roeboides</i>	21	1	6	2	18
Total	85	7	27	10	57

OBJETIVOS

Com base nas hipóteses prévias de relacionamentos interespecíficos e intergenéricos da subfamília Characinae, e desta com outras subfamílias de Characidae, o presente projeto teve como objetivos:

- 1) Elaborar e testar as hipóteses de relações filogenéticas entre os gêneros da subfamília Characinae e desta com os demais membros de Characidae;
- 2) Elaborar e testar as hipóteses de relações filogenéticas entre as espécies de cada um dos gêneros de Characinae;
- 3) Realizar a reconstrução ancestral da dieta de Characinae e testar se as mudanças na dieta influenciaram a diversificação morfológica do tamanho e forma do corpo;
- 4) Gerar sequências utilizando a técnica de DNA *barcode* para permitir uma identificação molecular dos peixes da subfamília Characinae;
- 5) Identificar linhagens/ espécies descritas ou não descritas.

BIBLIOGRAFIA

- Alfaro, M. E., Faircloth, B. C., Harrington, R. C., Sorenson, L., Friedman, M., Thacker, C. E., ... & Near, T. J. (2018). Explosive diversification of marine fishes at the Cretaceous–Palaeogene boundary. *Nature Ecology & Evolution*, 2(4), 688-696.
- Antonetti, D. A., Lucena, C. A. S., & Lucena, Z. M. S. (2018). Two new species of *Phenacogaster* (Actinopterygii: Characidae) from the rio Tocantins drainage, Brazil. Verlag Dr. Friedrich Pfeil.
- Barreto, S. B., Silva, A. T., Batalha-Filho, H., Affonso, P. R. A., & Zanata, A. M. (2018). Integrative approach reveals a new species of *Nematocharax* (Teleostei: Characidae). *Journal of fish biology*, 93(6), 1151-1162.
- 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(2), e0112217.
- 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.
- Bejerano, G., Pheasant, M., Makunin, I., Stephen, S., Kent, W. J., Mattick, J. S., & Haussler, D. (2004). Ultraconserved elements in the human genome. *Science*, 304(5675), 1321-1325.
- 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), e0135075.
- Dermitzakis E.T., Reymond A. & Antonarakis S.E. (2005). Conserved non-genic sequences — an unexpected feature of mammalian genomes. *Nature Reviews Genetics* 6, 151–157.
- Chakrabarty, P., Faircloth, B. C., Alda, F., Ludt, W. B., McMahan, C. D., Near, T. J., ... & Sorenson, L. (2017). Phylogenomic systematics of ostariophysan fishes: ultraconserved elements support the surprising non-monophyly of Characiformes. *Systematic Biology*, 66(6), 881-895.
- Crawford, N. G., Faircloth, B. C., McCormack, J. E., Brumfield, R. T., Winker, K., & Glenn, T. C. (2012). More than 1000 ultraconserved elements provide evidence that turtles are the sister group of archosaurs. *Biology letters*, 8(5), 783-786.
- Crawford, N.G., Parham, J.F., Sellas, A.B., Faircloth, B.C., Glenn, T.C., Papenfuss, T.J., Henderson, J.B., Hansen, M.H. & Simison, W.B. (2015) A phylogenomic analysis of turtles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 83, 250–257.

- de Borba, R. S., Mariotto, S., Centofante, L., Henrique Zawadzki, C., & Pasquali Parise-Maltempi, P. (2019). Molecular discrimination of *Ancistrus* lineages (Siluriformes: Loricariidae) using barcode DNA tool. *Mitochondrial DNA Part A*, 30(4), 602-608.
- Eigenmann, C. H. (1910). Catalogue of the fresh-water fishes of tropical and south temperate America, p. 375–511.
- Eigenmann, C. H. (1912). The freshwater fishes of British Guiana, including a study of the ecological grouping of species and the relation of the fauna of the plateau to that of the lowlands (No. 114). Carnegie Institute.
- Faircloth B.C., McCormack J.E., Crawford N.G., Harvey M.G., Brumfield R.T. & Glenn T.C. (2012). Ultraconserved elements anchor thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary timescales. *Systematic Biology* 61, 717–726.
- Faircloth B.C., Sorenson L., Santini F. & Alfaro M.E. (2013). A Phylogenomic Perspective on the Radiation of Ray-Finned Fishes Based upon Targeted Sequencing of Ultraconserved Elements (UCEs). *PLoS ONE* 8, e65923.
- Fagundes, P. C., Pereira, E. H., & Reis, R. E. (2020). Iterative taxonomic study of *Pareiorhaphis hystrix* (Siluriformes, Loricariidae) suggests a single, yet phenotypically variable, species in south Brazil. *PloS one*, 15(9), e0237160.
- Fricke, R., Eschmeyer, W. N. & R. van der Laan. (2022). Eschmeyer's catalog of fishes: genera, species, references. Available at <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> (last accessed 12 Jan 2022).
- Géry, J. (1966). *Hoplocharax goethei*, a new genus and species of South American characoid fishes, with a review of the sub-tribe Heterocharacini. *Ichthyologica*, 38, 281-296.
- Géry, J. (1972). Corrected and supplemented descriptions of certain characoid fishes described by Henry W. Fowler, with revisions of several of their genera. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 7(1), 1-35.
- Géry J. (1977). *Characoids of the world*. Neptune City, NJ: THF Publications.
- Giovannetti, V., Toledo-Piza, M., & Menezes, N. A. (2017). Taxonomic revision of *Galeocharax* (Characiformes: Characidae: Characinae). *Neotropical Ichthyology*, 15(1).
- Guimarães, E. C., OTTONI, F. P., Ferreira, B. R. A., & BRITO, P. S. D. (2018). A new species of *Charax* (Ostariophysi, Characiformes, Characidae) from northeastern Brazil.
- Harrington, R. C., Faircloth, B. C., Eytan, R. I., Smith, W. L., Near, T. J., Alfaro, M. E., & Friedman, M. (2016). Phylogenomic analysis of carangimorph fishes reveals flatfish asymmetry arose in a blink of the evolutionary eye. *BMC Evolutionary Biology*, 16(1), 224.

- Harvey, M. G., Smith, B. T., Glenn, T. C., Faircloth, B. C., & Brumfield, R. T. (2016). Sequence capture versus restriction site associated DNA sequencing for shallow systematics. *Systematic biology*, 65(5), 910-924.
- Hercos, A. P., de Queiroz, H. L., & de Almeida, H. L. (2009). Peixes ornamentais do Amanã. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & De Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: *cytochrome c oxidase subunit 1* divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(suppl_1), S96-S99.
- Javonillo, R., Malabarba, L. R., Weitzman, S. H., & Burns, J. R. (2010). Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(2), 498-511.
- Lucena, C. D. (1998). Relações filogenéticas e definição do gênero *Roeboides* Günther (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, série Zoologia*, 11, 19-59.
- Lucena, C. D. (2000). Revisão taxonômica e filogenia das espécies transandinas do gênero *Roeboides* Günther (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, série Zoologia*, 13, 3-63.
- Lucena, C. A. S. (2003). Revisão taxonômica e relações filogenéticas das espécies de *Roeboides* grupo-*microlepis* (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). *Iheringia. Série Zoologia*, 93(3), 283-308.
- Lucena C. A. S., Menezes N. A. (2003). Subfamily Characinae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ Jr, orgs. Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, RS: EDIPUCRS, 200–208.
- Lucena, C. A. S. D. (2007). Revisão taxonômica das espécies do gênero *Roeboides* grupo-*affinis* (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). *Iheringia. Série Zoologia*, 97(2), 117-136.
- Lucena, Z. M. S. D., & Malabarba, L. R. (2010). Description of nine new species of *Phenacogaster* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) and notes on the other species of genus. *Zoologia (Curitiba)*, 27(2), 263-304.
- Lucena, Z. M. S. D., & Lucena, C. A. S. D. (2019). A new glass tetra species of *Phenacogaster* from the rio Salitre, rio São Francisco drainage, Brazil (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 17.
- Machado, V. N., Collins, R. A., Ota, R. P., Andrade, M. C., Farias, I. P., & Hrbek, T. (2018). One thousand DNA barcodes of piranhas and pacus reveal geographic structure and unrecognised diversity in the Amazon. *Scientific reports*, 8(1), 1-12.

- Manthey, J. D., Campillo, L. C., Burns, K. J., & Moyle, R. G. (2016). Comparison of target-capture and restriction-site associated DNA sequencing for phylogenomics: a test in cardinalid tanagers (Aves, Genus: *Piranga*). *Systematic biology*, 65(4), 640-650.
- Matamoros, W. A., Chakrabarty, P., Angulo, A., Garita-Alvarado, C. A., & McMahan, C. D. (2013). A new species of *Roeboides* (Teleostei: Characidae) from Costa Rica and Panama, with a key to the middle American species of the genus. *Neotropical ichthyology*, 11, 285-290.
- Mateussi, N. T., Melo, B. F., & Oliveira, C. (2020). Molecular delimitation and taxonomic revision of the wimple piranha *Catoprion* (Characiformes: Serrasalminidae) with the description of a new species. *Journal of Fish Biology*, 97(3), 668-685.
- Mateussi, N. T., Melo, B. F., Ota, R. P., Roxo, F. F., Ochoa, L. E., Foresti, F., & Oliveira, C. (2020). Phylogenomics of the Neotropical fish family Serrasalminidae with a novel intrafamilial classification (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 153, 106945.
- Mattox, G. M., & Toledo-Piza, M. (2012). Phylogenetic study of the Characinae (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 165(4), 809-915.
- Mattox, G. M., van der Sleen, P., Toledo-Piza, M. (2017). Subfamily Characinae—Characine Tetras. In: Van der Sleen P., Albert, J.S. editors. *Field Guide to the Fishes of the Amazon, Orinoco, and Guianas*. Princeton, New Jersey, Princeton University Press, p. 102-106.
- McCormack, J. E., Faircloth, B. C., Crawford, N. G., Gowaty, P. A., Brumfield, R. T., & Glenn, T. C. (2012). Ultraconserved elements are novel phylogenomic markers that resolve placental mammal phylogeny when combined with species-tree analysis. *Genome research*, 22(4), 746-754.
- McCormack, J. E., Hird, S. M., Zellmer, A. J., Carstens, B. C., & Brumfield, R. T. (2013). Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. *Molecular phylogenetics and evolution*, 66(2), 526-538.
- Melo, B. F., Benine, R. C., Silva, G. S., Avelino, G. S., & Oliveira, C. (2016). Molecular phylogeny of the Neotropical fish genus *Tetragonopterus* (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 94, 709-717.
- Melo, B. F., Ochoa, L. E., Vari, R. P., & Oliveira, C. (2016b). Cryptic species in the Neotropical fish genus *Curimatopsis* (Teleostei, Characiformes). *Zoologica Scripta*, 45(6), 650-658.
- Menezes, N. A. (2006). Description of five new species of *Acestrocephalus* Eigenmann and redescription of *A. sardina* and *A. boehlkei* (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 4(4), 385-400.
- Menezes, N. A. (2007). A new species of *Cynopotamus* Valenciennes, 1849 (Characiformes: Characidae) with a key to species of the genus. *Zootaxa*, 1635(1), 55-61.

- Menezes, N. A., & Lucena, C. A. S. D. (2014). A taxonomic review of the species of *Charax* Scopoli, 1777 (Teleostei: Characidae: Characinae) with description of a new species from the rio Negro bearing superficial neuromasts on body scales, Amazon basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 12(2), 193-228.
- Mirande, J. M. (2009). Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). *Cladistics*, 25(6), 574-613.
- Mirande, J. M. (2010). Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology*, 8(3), 385-568.
- Mirande, J. M. (2019). Morphology, molecules and the phylogeny of Characidae (Teleostei, Characiformes). *Cladistics*, 35(3), 282-300.
- Myers, G. S. (1960). The South American characid genera *Exodon*, *Gnathoplax*, and *Roeboexodon*, with notes on the ecology and taxonomy of characid fishes.
- Ochoa, L. E., Datovo, A., DoNascimento, C., Roxo, F. F., Sabaj, M. H., Chang, J., ... & Oliveira, C. (2020). Phylogenomic analysis of trichomycterid catfishes (Teleostei: Siluriformes) inferred from ultraconserved elements. *Scientific reports*, 10(1), 1-15.
- Oliveira, C., Avelino, G. S., Abe, K. T., Mariguela, T. C., Benine, R. C., Ortí, G., ... & e Castro, R. M. C. (2011). Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC evolutionary biology*, 11(1), 275.
- Ota, R. P., Machado, V. N., Andrade, M. C., Collins, R. A., Farias, I. P., & Hrbek, T. (2020). Integrative taxonomy reveals a new species of pacu (Characiformes: Serrasalminae: Myloplus) from the Brazilian Amazon. *Neotropical Ichthyology*, 18(1).
- Pennisi, E. (2013). Large-scale gene comparisons boost tree of life studies.
- 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(sup1), 87-96.
- Sandelin A., Bailey P., Bruce S., Engström P.G., Klos J.M., Wasserman W.W., et al. (2004) Arrays of ultraconserved non-coding regions span the loci of key developmental genes in vertebrate genomes. *BMC Genomics* 5, 1–9.
- Sazima, I., & Machado, F. A. (1982). Habits and behavior of *Roebooides prognathus*, a scale-eating fish (Osteichthyes, Characoidei). *Boletim de Zoologia da Universidade de São Paulo* 7: 37–56.
- Sazima, I. (1984). Scale-eating in characoids and other fishes. In *Evolutionary ecology of neotropical freshwater fishes* (pp. 9-23). Springer, Dordrecht.

- Siepel, A., Bejerano, G., Pedersen, J. S., Hinrichs, A. S., Hou, M., Rosenbloom, K., ... & Haussler, D. (2005). Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome research*, 15(8), 1034-1050.
- Silva, G. S. C., Melo, B. F., Oliveira, C., & Benine, R. C. (2013). Morphological and molecular evidence for two new species of *Tetragonopterus* (Characiformes: Characidae) from central Brazil. *Journal of Fish Biology*, 82(5), 1613-1631.
- Silva, G. S., Roxo, F. F., Melo, B. F., Ochoa, L. E., Bockmann, F. A., Sabaj, M. H., ... & Oliveira, C. (2021). Evolutionary history of Heptapteridae catfishes using ultraconserved elements (Teleostei, Siluriformes). *Zoologica Scripta*.
- Smith, B.T., McCormack, J.E., Cuervo, A.M., Hickerson, M.J., Aleixo, A., Cadena, C.D., Pérez-Emán, J., Burney, C.W., Xie, X., Harvey, M.G., Faircloth, B.C., Glenn, T.C., Derryberry, E.P., Prejean, J., Fields, S. & Brumfield, R.T. (2014). The drivers of tropical speciation. *Nature* 515, 406–409.
- Starrett, J., Derkarabetian, S., Hedin, M., Bryson Jr, R. W., McCormack, J. E., & Faircloth, B. C. (2017). High phylogenetic utility of an ultraconserved element probe set designed for Arachnida. *Molecular ecology resources*, 17(4), 812-823.
- 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(2), 297-307.
- Venere, P. C., & Garutti, V. (2011). *Peixes do Cerrado: Parque Estadual da Serra Azul, rio Araguaia, MT*. São Carlos: RiMa Editora, FAPEMAT.
- Weitzman, S. H., & Vari, R. P. (1987). Two new species and a new genus of miniature characid fishes (Teleostei: Characiformes) from northern South America. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 100(3), 640-652.
- Woolfe A., Goodson M., Goode D.K., Snell P., McEwen G.K., Vavouri T., et al. (2004). Highly Conserved Non-Coding Sequences Are Associated with Vertebrate Development. *PLoS Biology* 3, e7