

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta  
tese será disponibilizado  
somente a partir de  
25/03/2024.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (GENÉTICA)

**BIOGEOGRAFIA HISTÓRICA E FILOGENÔMICA DE ERYTHRINOIDEA E  
TAXONOMIA INTEGRATIVA PARA O ESTUDO DO GÊNERO NEOTROPICAL  
HOPLERYTHRINUS (CHARACIFORMES: ERYTHRINIDAE)**

CRISTHIAN CAMILO CONDE SALDAÑA

**BOTUCATU-SP**

**2022**

# **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (GENÉTICA)

## **BIOGEOGRAFIA HISTÓRICA E FILOGENÔMICA DE ERYTHRINOIDEA E TAXONOMIA INTEGRATIVA PARA O ESTUDO DO GÊNERO NEOTROPICAL HOPLERYTHRINUS (CHARACIFORMES: ERYTHRINIDAE)**

**Discente:** Cristhian Camilo Conde Saldaña

**Orientador:** Prof. Dr. Claudio Oliveira

**Co-orientadora:** Dr(a). Mônica de Toledo-Piza Ragazzo

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

**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

Conde, Cristhian Camilo.

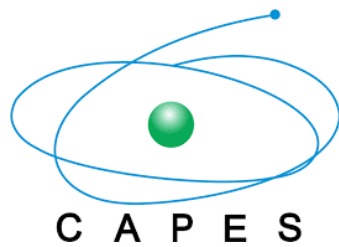
Biogeografia histórica e filogenômica de Erythrinidae e taxonomia integrativa para o estudo do gênero neotropical *Hoplerythrinus* (Characiformes: Erythrinidae) / Cristhian Camilo Conde. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Claudio Oliveira  
Coorientador: Mônica de Toledo-Piza Ragazzo  
Capes: 20000006

1. Peixes de água doce - Filogenia. 2. Biogeografia.  
3. Amazonas, Rio. 4. Código de barras de DNA taxonômico.

Palavras-chave: Biogeografia histórica; DNA *barcode*;  
Filogenômica; Peixes neotropicais de água doce; Rio Amazonas.

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: 2018/09767-6 e 2019/16999-3



**A mi familia**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas e instituciones que de alguna forma contribuyeron para el desarrollo de este trabajo y mi formación a lo largo de este proceso.

A la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por la financiación para la consecución de este proyecto a través de los procesos nº 2018/09767-6 y 2019/16999-3.

A la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Al Dr. Claudio de Oliveira por la confianza, el apoyo y orientación en las distintas etapas de este proyecto. Gracias por la oportunidad.

Al Dr. James Albert por la amistad, sus enseñanzas y haberme acogido durante mi estadía en la University of Louisiana at Lafayette – USA y el desarrollo del proyecto BEPE.

A la Dr. Mônica Toledo Piza por sus enseñanzas y acompañamiento a lo largo de este proceso.

Al Dr. Bruno Melo por la amistad y acompañamiento incondicional durante todas las etapas de este proyecto.

Al Dr. Fabio Roxo por la amistad y colaboración durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Francisco Villa por la amistad, colaboración y enseñanzas desde mis inicios en la ictiología.

A Mark Sabaj y Mariangeles Arce por la gran acogida y disposición en mi visita a la ANSP en Philadelphia, USA.

A Carlos DoNascimento, Juan Gabriel Albornoz y Alejandro Méndez por la disposición y ayuda durante mi visita al IAvH en Villa de Leyva, Colombia.

Agradezco a todos los integrantes y exintegrantes del Laboratório de Biologia e Genética de Peixes por la amistad, compañerismo y enseñanzas, en especial a Luz Ochoa, Gabriel Costa e Silva, Lais Regia, Bruno Morales, Rafaela Ota, Silvana Melo, Camila Souza, Angélica Dias, Acacio Nogueira, Giovana Ribeiro, Nadayca Mateussi, Aisni Mayumi, Lucas Peres, Ricardo da Silva, Renato Devidé, Fabilene Gomes, Najila Cerqueira, Gabriela Omura, Beatriz Boza, Beatriz Dorini, Andressa Galasso, Lucas Lasmar, André Nobile, Vanessa Paes e Duílio Zerbinato.

A Juan Gabriel Albornoz, Diana Montoya, Margarita Roa, Daniela Bedoya, Jose Poveda por la amistad y aprendizaje en este mundo de los peces.

A los integrantes y exintegrantes del Albert's Lab en Lafayette por la amistad y enseñanzas, en especial a Jesse Figueiredo, Kevin Torgersen, Shannon Kuznar, Aaron Fronk e Jon Allen.

A mis amigos y compañeros de casa en Botucatu, por el apoyo y amistad, en especial a Bruno Melo, André Nobile, Fabio Cardoso, Felipe Lima, Lucas Lasmar, Ricardo da Silva e Cristian Araya.

Finalmente, agradezco a mi familia, mis padres Gustavo, Lyda y a mi hermanita Vivi por el amor incondicional e incentivo para recorrer estos caminos de aprendizaje.



## RESUMO

Erythrinioidea é um clado de Characiformes composto pela enigmática família Tarumaniidae, representada por uma única espécie altamente especializada, *Tarumania walkerae*, que habita poças isoladas da floresta amazônica central, e pela família de ampla distribuição geográfica Erythrinidae, que habita em ambientes lênticos e lóticos na maioria das drenagens da América Central e do Sul. Erythrinidae é composta por três gêneros com representantes viventes (*Erythrinus*, *Hoplias* e *Hoplerythrinus*), onde complexos de espécies têm sido hipotetizados com base na notável variação cariotípica e uniformidade nos dados merísticos e morfométricos. A diversidade e os padrões de distribuição geográfica, bem como os aspectos ecológicos de Erythrinioidea, levantam questões interessantes com relação à diversificação evolutiva de suas linhagens. A maioria dos estudos taxonômicos e filogeográficos têm sido focados em *Hoplias*, no entanto, *Erythrinus* e *Hoplerythrinus* aguardam revisões detalhadas abrangendo toda a sua distribuição geográfica. O presente trabalho tem como objetivo principal investigar padrões biogeográficos e cronológicos de diversificação da superfamília Erythrinioidea e implementar uma abordagem integrativa para investigar a diversidade e a história evolutiva de um grupo particular dentro deste clado, o gênero *Hoplerythrinus*. Combinando dados filogenômicos com elementos ultraconservados (UCEs), paleontológicos (calibrações fósseis), biogeográficos e fontes geológicas, encontramos que a origem de Erythrinioidea é estimada para o Cretáceo Superior ca. 80 Ma, com divergência de clados principais durante o Paleogeno ca. 51-31 Ma, e Erythrinidae se diversificou rapidamente após a formação do rio Amazonas transcontinental ca. 10 Ma, de oito linhagens para pelo menos 28 espécies atuais. Padrões de diversificação em Erythrinioidea também são discutidos à luz da evolução da paisagem. Por outro lado, a integração de DNA *barcode*, filogenômica com UCEs e informações morfológicas forneceram evidências para investigar a história evolutiva de *Hoplerythrinus* e definir este táxon como um gênero monotípico geograficamente difundido na região Neotropical. Aqui também discutimos detalhes sobre a variação fenotípica e níveis de diferenciação genômica considerando o tempo de divergência e suas afinidades ecológicas.

**Palavras chave:** Rio Amazonas, DNA *barcode*, biogeografia histórica, peixes neotropicais de água doce, filogenômica, América do Sul, elementos ultraconservados.

## ABSTRACT

Erythrinoidae is a characiform clade composed of the enigmatic family Tarumaniidae, represented by a single highly-specialized species, *Tarumania walkerae*, that inhabits isolated pools in the forest floor of central Amazon rainforests, and the geographically widespread family Erythrinidae, which occurs in lentic and lotic habitats in most drainages of Central and South America. Erythrinidae is composed of three extant genera (*Erythrinus*, *Hoplias*, and *Hoplerythrinus*), where species complex had been hypothesized based on remarkable karyotypic variation and uniformity in meristic and morphometric data. Diversity and geographic distribution patterns, as well as ecological aspects of Erythrinoidae, arouse interesting questions concerning to evolutionary diversification of its lineages. Most taxonomic and phylogeographic studies have been focused on *Hoplias*, however, *Erythrinus* and *Hoplerythrinus* are waiting for detailed revisions encompassing their entire distribution. The present work has as the main goal, to investigate biogeographic and chronological patterns of diversification in the superfamily Erythrinoidae and to implement an integrative approach to investigate the diversity and evolutionary history of a particular group within this clade, the genus *Hoplerythrinus*. Combining data from phylogenomics of ultraconserved elements (UCEs), paleontological (fossil calibrations), biogeographic, and geological sources, we found that Erythrinoidae is estimated to have originated in the Late Cretaceous ca. 80 Ma, with divergence of major clades during the Paleogene ca. 51-31 Ma, and Erythrinidae diversified rapidly after the formation of the transcontinental Amazon River ca. 10 Ma, from eight lineages to at least 28 species today. Diversification patterns in Erythrinoidae are also discussed in light of landscape evolution. On the other hand, integrating DNA barcode, phylogenomics of UCEs, and morphological information provided evidence to investigate the evolutionary history of *Hoplerythrinus*, and to define this taxon as a geographically widespread monotypic genus in the Neotropical region. Here, we also discussed details about the phenotypic variation and levels of genomic differentiation considering the divergence time and its ecological affinities.

**Keywords:** Amazon River, DNA barcode, historical biogeography, Neotropical freshwater fishes, phylogenomics, South America, ultraconserved elements.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	17
<b>OBJETIVOS</b> .....	18
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	19
<b>CHAPTER 1</b> .....	<b>29</b>
<b>Landscape evolution drives continental diversification in Neotropical erythrinoid fishes (Teleostei, Characiformes)</b> .....	29
Introduction.....	31
Material and Methods .....	35
Results.....	40
Discussion.....	50
Acknowledgments.....	59
References.....	59
Supplementary material .....	76
<b>CHAPTER 2</b> .....	<b>89</b>
<b>Is <i>Hoplerythrinus</i> (Characiformes, Erythrinidae) a geographically widespread monotypic fish genus? An integrative approach using phylogenomic, DNA barcode, and morphological data</b> .....	89
1. Introduction.....	91
2. Material and Methods .....	93
3. Results.....	99
4. Discussion.....	117
Acknowledgments.....	126
References.....	126
Supplementary material .....	146

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

2  
3 Os peixes neotropicais de água doce (NFF) são conhecidos por sua notável diversidade, com mais  
4 de 6.350 espécies representando ~ 18% de todas as espécies de peixes na Terra, exibindo a maior  
5 disparidade fenotípica e diversidade de características funcionais de qualquer fauna de peixes  
6 continentais (Reis et al. 2016; Su et al. 2019; Fricke et al. 2022). A maioria das espécies de NFF  
7 pertencem a um único clado, Ostariophysi, distribuídas em três ordens: Siluriformes (bagres e  
8 cascudos), Characiformes (lambarias., piabas, curimbas, piranhas, traíras, entre outros) e  
9 Gymnotiformes (peixes elétricos neotropicais) (Albert et al. 2020). Particularmente,  
10 Characiformes constitui um grupo extremamente diverso com aproximadamente 2.200 espécies e  
11 22 famílias, com representantes habitando ecossistemas tropicais de África e o Neotropico (Nelson  
12 et al. 2016; Fricke et al. 2022). A superfamília Erythrinioidea representa um clado enigmático  
13 dentro de Characiformes, recentes filogenias moleculares a tem definido como um clado composto  
14 por as família Tarumaniidae, representada por uma única espécie altamente especializada,  
15 *Tarumania walkerae*, que habita poças isoladas na floresta central amazônica (de Pinna et al.  
16 2017), e Erythrinidae, uma família com ampla distribuição geográfica, ocorrendo em habitats  
17 lênticos e lóticos na maioria das drenagens da América Central e do Sul, da Costa Rica ao norte  
18 da Argentina (Oyakawa and Mattox 2018).

19  
20 Representantes da família Erythrinidae, conhecidos popularmente como jejus, aimarás e traíras,  
21 são importantes predadores de insetos, crustáceos e outros peixes (Marrero et al. 1997; Lasso and  
22 Meri 2001; Oliveira and Garavello 2003; Lasso et al. 2011; Sánchez-Duarte et al. 2011), e em  
23 muitas regiões representam componentes importantes dentro da pesca comercial ou de consumo  
24 local (Lasso et al. 2011; Oyakawa et al. 2013). Também são bem conhecidos por suas adaptações  
25 fisiológicas que lhes permitem tolerar ambientes tóxicos e hipóxicos (Liem 1988; Moraes et al.  
26 2004; Moron et al. 2009; Pelster 2021), e sua capacidade de residir em diversos habitats (Oyakawa  
27 et al. 2013; Oyakawa and Mattox 2018). A família é composta por três gêneros com representantes  
28 viventes: *Erythrinus*, *Hoplerythrinus* e *Hoplias* (Oyakawa 2003), que englobam complexos de  
29 espécies e representam um interessante modelo para estudos evolutivos, permitindo relacionar os  
30 padrões de dispersão, diversificação e distribuição com a história geográfica da região Neotropical  
31 (Bertollo et al. 2000; Santos et al. 2009; Pereira et al. 2013b; Martinez et al. 2016; Sassi et al.

32 2021). Erythrinidae também contém o gênero extinto *Paleohoplias*, com uma única espécie  
33 †*Paleohoplias assisbrasilensis* Bocquentin & Negri 2003, descrita com base em restos fósseis da  
34 Formação Solimões (final do Mioceno-Plioceno) no Brasil (Gayet et al. 2003).

35  
36 Os representantes da família Erythrinidae caracterizam-se por corpos cilíndricos, nadadeira caudal  
37 arredondada, nadadeira dorsal com 12-16 raios, origem da nadadeira dorsal situada anteriormente  
38 à vertical que passa pela origem da nadadeira anal, nadadeira anal curta (10-11 raios), 34-48  
39 escamas na linha lateral e ausência de nadadeira adiposa (Oyakawa et al. 2013; Oyakawa and  
40 Mattox 2018). Possuem outras características como a presença de cinco raios branquiostégios,  
41 suprapreoperculo lamelar, extremidade anterior do primeiro infra-orbital bifurcada e ausência do  
42 antorbital que são úteis para diagnosticar o grupo (Oyakawa 2003). Os três gêneros podem ser  
43 distinguidos entre eles por algumas características como a divisão transversal do sexto infraorbital,  
44 padrões de coloração e comprimento da maxila (Oyakawa and Mattox 2018), no entanto, a  
45 morfologia externa dentro de cada gênero é altamente conservada, revelando uma grande  
46 uniformidade em dados merísticos e morfométricos ao longo da distribuição das espécies  
47 (Oyakawa et al. 2013). O gênero *Hoplias* está distribuído na maioria das bacias hidrográficas da  
48 região trans e cisandina, e atualmente consiste em 15 espécies válidas (Fricke et al. 2022).  
49 Alternativamente, *Erythrinus* e *Hoplerythrinus* têm uma ampla distribuição cisandina,  
50 apresentando uma aparente menor diversidade (Oyakawa 2003; Fricke et al. 2022).

51  
52 Para o gênero *Erythrinus* são consideradas duas espécies válidas (Fricke et al. 2022), *E. kessleri*  
53 Steindachner, 1876 descrita para Salvador (Brasil), e *E. erythrinus* (Bloch e Schneider, 1801)  
54 descrita para Suriname, sendo esta reconhecida como uma espécie de ampla distribuição  
55 geográfica, ocorrendo nas bacias do rio Orinoco, Amazonas, Paraná-Paraguay e rios costeiros das  
56 Guianas (Oyakawa 2003). O gênero *Hoplerythrinus* também possui uma espécie reconhecida de  
57 ampla distribuição, *H. unitaeniatus* (Agassiz, em Spix e Agassiz, 1829), descrita para o rio São  
58 Francisco (Brasil), e ocorrendo na maioria das drenagens cisandinas da América do sul (Oyakawa  
59 2003; Oyakawa et al. 2013). Adicionalmente, são listadas outras duas espécies válidas: *H. cinereus*  
60 (Gill, 1858) da ilha de Trinidad e *H. gronovii* (Valenciennes, em Cuvier e Valenciennes, 1847)  
61 descrita para Cayenne (Guiana Francesa) (Oyakawa 2003; Fricke et al. 2022); porém estas duas  
62 espécies são conhecidas apenas do material tipo e apresentam diagnoses incipientes, resultando na

63 necessidade de uma avaliação detalhada do status taxonômico das espécies do gênero (Oyakawa  
64 et al. 2013).

65 Hipóteses filogenéticas realizadas com dados moleculares para Characiformes, indicaram que os  
66 gêneros *Erythrinus* e *Hoplerythrinus* formam um grupo monofiletico que é o grupo irmão do  
67 gênero *Hoplias* (Oliveira et al. 2011; Melo et al. 2021). No entanto, os estudos taxonômicos e  
68 evolutivos recentes em nível de gênero dentro de Erythrinidae tem se concentrado principalmente  
69 no gênero *Hoplias*, avaliando o status taxonômico, descrição de novas espécies (Mattox et al. 2006,  
70 2014; Oyakawa and Mattox 2009; Azpelicueta et al. 2015; Rosso et al. 2016, 2018; Guimarães et  
71 al. 2021) e alguns trabalhos tem estudado as relações evolutivas e filogeográficas do complexo *H.*  
72 *malabaricus*, incluindo dados cariotípicos de populações ao longo da sua ampla distribuição  
73 geográfica (Dergam et al. 2002; Santos et al. 2009).

74 Ainda não existem estudos que utilizem marcadores moleculares ou revisões detalhadas para o  
75 gênero *Hoplerythrinus*, embora tenham sido publicados estudos citogenéticos que têm revelado  
76 uma grande diversidade cariotípica, propondo *H. unitaeniatus* como um complexo de espécies  
77 (Giuliano-Caetano et al. 2001; Martinez et al. 2016). As variações numéricas e estruturais têm  
78 revelado um número cariotípico  $2n = 48$  até  $2n=52$  cromossomos e número fundamental (NF) de  
79 92 a 102, marcações simples e múltiplos de Ag-NOR (Martinez et al. 2016) e polimorfismos com  
80 o mapeamento dos rDNA 18S e 5S (Diniz and Bertollo 2003; Martinez et al. 2016). A variabilidade  
81 cariotípica dentro do gênero revela a necessidade de ampliar estudos genéticos no grupo, que  
82 permitam identificar as linhagens e suas relações com a história geográfica em sua área de  
83 distribuição. Uma avaliação detalhada do status taxonômico das espécies que compõem o gênero  
84 *Hoplerythrinus* é necessária, além de estudos usando marcadores moleculares para reconstruir a  
85 história evolutiva do grupo, incluindo o maior número de populações ao longo da sua distribuição.

86  
87 O avanço da tecnologia tem desenvolvido mecanismos eficientes em escala genômica, permitindo  
88 uma profundidade sem precedentes nas análises de relações entre organismos (McCormack et al.  
89 2013; Zarza et al. 2018). Assim mesmo, o estudo da diversidade e formulação de hipóteses de  
90 separação de linhagens em grupos taxonomicamente complexos, tem sido favorecido pela  
91 implementação de enfoques integrativos, avaliando níveis de diferenciação genômica, variação  
92 fenotípica e tempos de divergência (Struck et al. 2018). Dentro do sequenciamento de nova-

93 geração tem surgido o uso de elementos ultraconservados (UCEs) como marcadores resolutivos  
94 de baixo custo em filogenômica, úteis para uma melhor compressão das relações filogenéticas e  
95 os mecanismos evolutivos que regem os grupos de peixes neotropicais (Faircloth et al. 2012;  
96 Harrington et al. 2016; Chakrabarty et al. 2017; Alda et al. 2019; Melo et al. 2021). Igualmente,  
97 recentes esforços tem integrado diferentes métodos para explorar a diversidade e caracterizar  
98 linhagens evolutivas de NFF, como sequencias de *DNA barcode*, tomografia computadorizada e  
99 morfometria geométrica e/ou tradicional (Loureiro et al. 2018; Agudelo-Zamora et al. 2020; Anjos  
100 et al. 2020; Henschel et al. 2020; Ochoa et al. 2020b; Armbruster et al. 2021; Garavello et al.  
101 2021).

102

### 103 *DNA barcode*

104 A metodologia do *DNA barcode* foi proposta como um método de identificação de espécies, na  
105 qual utiliza-se fragmentos (~650 bp) do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI)  
106 (Hebert et al. 2003). Este gene caracteriza-se por apresentar um forte sinal filogenético, possui  
107 primers universais robustos e sua evolução é rápida o suficiente para permitir a discriminação não  
108 só de espécies próximas, mas também de grupos filogeográficos dentro de uma única espécie  
109 (Hebert et al. 2003; Ward et al. 2005; Ivanova et al. 2007), portanto, utilizado amplamente junto  
110 com outros marcadores para estimar filogenias moleculares (Patwardhan et al. 2014). Com o  
111 desenvolvimento de diferentes modelos para o delineamento de espécies, baseados no marco  
112 teórico da coalescência e a teoria filogenética (Puillandre et al. 2012; Ratnasingham and Hebert  
113 2013; Zhang et al. 2013; Hubert and Hanner 2015), o *DNA barcode* tem se tornado uma importante  
114 ferramenta para revelar diversidade críptica ou identificar novos táxons em grupos problemáticos  
115 com taxonomia incipiente (Hubert et al. 2008; Pereira et al. 2013a; Rossini et al. 2016; Ochoa et  
116 al. 2020b).

117 A metodologia é baseada na diferença entre a divergência genética intraespecífica e  
118 interespecífica, conhecido como *barcoding gap* (Meier et al. 2008), permitindo identificar  
119 diversificações crípticas (Valdez-Moreno et al. 2009; Pereira et al. 2011; Melo et al. 2016).  
120 Estudos em comunidades de peixes de água doce têm confirmado a eficácia da metodologia do  
121 *DNA barcode* para identificar espécies, discriminando acima de 95% das espécies estudadas (De  
122 Carvalho et al., 2011; Lara et al., 2010; Pereira et al., 2013). No entanto, o uso do gene mitocondrial

123 COI nem sempre avalia de forma abrangente o fluxo gênico ou o isolamento reprodutivo (Struck  
124 et al. 2018), e tem sido menos útil em alguns casos de diversificação rápida ou recente divergência  
125 em clados NFF (Rossini et al. 2016; de Queiroz et al. 2020; Ramirez et al. 2020). Porém, a  
126 integração do *DNA barcode* como uma rotina na taxonomia atual pode ser considerado um ponto  
127 de partida para revisões sistemáticas (DeSalle 2006; Hubert and Hanner 2015). Adicionalmente,  
128 as sequências do *barcode* podem ser disponibilizadas através do projeto *International Barcoding*  
129 *of life* (BOLD), gerando um repositório de dados que permite o acesso à informação primária para  
130 o uso em outras aplicações (Ratnasingham and Hebert 2007).

131

### 132 *Elementos ultraconservados (UCEs)*

133 Os elementos ultraconservados (*ultraconserved elements* - UCEs) são regiões do genoma  
134 altamente conservadas e compartilhadas entre organismos de diferentes táxons. Os UCEs foram  
135 primeiramente descritos por Bejerano et al. (2004) no genoma humano, no qual encontraram 481  
136 segmentos maiores que 200 pares de bases exclusivos de regiões de RNA ribossômico (rRNA), e  
137 amplamente distribuídas no genoma, exceto nos cromossomos 21 e Y. Estudos posteriores  
138 mostraram que os UCEs estão presentes em diversos outros organismos, como outros vertebrados,  
139 insetos, vermes e fungos (Siepel et al. 2005; Faircloth et al. 2012). O papel dos UCEs no genoma  
140 ainda não está bem esclarecido (Dermitzakis et al. 2005), tendo sido associados com a regulação  
141 gênica (Pennacchio et al. 2006) ou no desenvolvimento (Sandelin et al. 2004; Woolfe et al. 2005),  
142 e normalmente se tem assumido que os UCEs são importantes pela sua natureza extremamente  
143 conservada entre grupos muito distantes filogeneticamente.

144 Os UCEs caracterizam-se por ser encontrados em grande quantidade ao longo de um genoma  
145 (Stephen et al. 2008), têm poucas inserções de retroelementos (Simons et al. 2006), e a premissa  
146 de contínua variabilidade nas sequências que flanqueiam cada UCE sugere que eles podem ser um  
147 tipo de “fóssil molecular”, retendo um sinal de história evolutiva em diversas escalas de tempo,  
148 dependendo da distância da região central dos UCEs (Faircloth et al. 2012; Gilbert et al. 2015).  
149 Para que possam ser utilizados como marcadores genéticos, é comum que aqueles UCEs que  
150 aparecem duplicados sejam removidos para evitar paralogia. Dessa maneira, os locus resultantes  
151 são altamente conservados e ortólogos, sendo facilmente usados como marcadores moleculares.  
152 Os UCEs foram introduzidos como uma nova classe de marcadores moleculares em estudos



153 filogenéticos através do enriquecimento de bibliotecas genômicas contendo centenas ou milhares  
154 de loci nucleares, utilizando sequenciamento de nova-geração (Faircloth et al. 2012). Como o *core*  
155 ou região central das sequências de UCEs são altamente conservadas elas são utilizadas para o  
156 anelamento de sondas (*probes*), a partir das quais as regiões flangeadoras são lidas.

157  
158 Atualmente, estudos vêm sendo conduzidos com Ostariophysi e novas *probe sets* foram  
159 desenhadas para capturar cerca de 1500-2000 loci de UCEs (Faircloth et al. 2020). Estes  
160 marcadores tem sido utilizados eficientemente para estudar radiações antigas em Gymnotiformes  
161 (Alda et al. 2019), entender padrões notáveis de diversidade e diversificação em Characiformes  
162 (Melo et al. 2021), e inferir relacionamentos filogenéticos em outros grupos particulares como  
163 Serrasalminidae (Mateussi et al. 2020), Trichomycteridae (Ochoa et al. 2020a), Loricariidae (Roxo  
164 et al. 2019), Pseudopimelodidae (Silva et al. 2021a) e Heptapteridae (Silva et al. 2021b). Assim, o  
165 uso de estes marcadores tem aumentado nos últimos anos, sendo altamente resolutivo no estudo  
166 de peixes de água doce neotropicais, sendo favorecido pelas suas características, como a obtenção  
167 de informação para estudar eventos de divergência recente e antiga (Faircloth et al. 2013; McGee  
168 et al. 2016; Alda et al. 2019) e o baixo custo relativo, dada a grande quantidade de dados gerados.

169

170

171 **JUSTIFICATIVA**

172  
173 Erythrinioidea, composta por duas famílias (Erythrinidae e Tarumaniidae) e quatro gêneros  
174 (*Erythrinus*, *Hoplias*, *Hoplerythrinus* e *Tarumania*) é conhecida por suas adaptações fisiológicas  
175 que lhes permitem tolerar ambientes tóxicos e hipóxicos (Liem 1988; Moraes et al. 2004; Moron  
176 et al. 2009; Pelster 2021) e sua capacidade de residir em diversos habitats ao longo da sua  
177 distribuição geográfica, desde Costa Rica ao norte da Argentina (Oyakawa et al. 2013; de Pinna et  
178 al. 2017; Oyakawa and Mattox 2018). Devido a suas características, este clado amplamente  
179 distribuído pode representar um alvo interessante para estudos biogeográficos, fornecendo  
180 informações para investigar os efeitos da evolução da paisagem na formação da biodiversidade  
181 (Machado et al. 2018; Capobianco and Friedman 2019; Albert et al. 2020; Fontenelle et al. 2021).  
182 Além disso, os representantes de Erythrinioidea são reconhecidos por uma taxonomia desafiadora,  
183 onde complexos de espécies têm sido propostos baseados em sua variação cariotípica e  
184 uniformidade em dados merísticos e morfométricos ao longo da distribuição das espécies (Bertollo  
185 et al. 2000; Cioffi et al. 2012; Oyakawa et al. 2013; Martinez et al. 2016). No entanto, estudos  
186 taxonômicos e evolutivos tem se concentrado principalmente no gênero *Hoplias* (Mattox et al.  
187 2006, 2014; Oyakawa and Mattox 2009; Azpelicueta et al. 2015; Rosso et al. 2016, 2018;  
188 Guimarães et al. 2021), enquanto os gêneros *Erythrinus* e *Hoplerythrinus* aguardam estudos  
189 integrativos com o intuito de avaliar detalhadamente o status taxonômico de suas espécies e  
190 investigar sua história evolutiva.

191

192 **OBJETIVOS**

193

194 *Objetivo Geral:*

195

196 O principal objetivo deste trabalho foi investigar padrões biogeográficos e cronológicos de  
197 diversificação para a superfamília Erythroidea e implementar um enfoque integrativo para  
198 investigar a diversidade e a história evolutiva de um grupo particular dentro de este clado, o gênero  
199 *Hoplerythrinus*.

200

201 *Objetivos específicos*

202

- 203 • Investigar e estimar datas de diversificação e reconstruir distribuições geográficas  
204 ancestrais em Erythroidea.
- 205 • Correlacionar padrões de diversificação de Erythroidea com eventos geomorfológicos e  
206 evolução da paisagem na região Neotropical.
- 207 • Avaliar o status taxonômico das espécies do gênero *Hoplerythrinus* integrando sequências  
208 de código de barras de DNA, um conjunto de dados filogenômicos de elementos  
209 ultraconservados (UCEs), informações morfológicas e uma ampla cobertura da sua  
210 distribuição geográfica
- 211 • Relacionar os padrões de diversidade dentro de *Hoplerythrinus* com sua história de  
212 diversificação.

213

214 **BIBLIOGRAFIA**

215

216 Agudelo-Zamora H.D., Tavera J., Murillo Y.D., Ortega-Lara A. 2020. The unknown diversity of  
217 the genus *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae) in the Chocó biogeographic region,  
218 Colombian Andes: Two new species supported by morphological and molecular data. *J.*  
219 *Fish Biol.* 97:1662–1675.

220 Albert J.S., Tagliacollo V.A., Dagosta F. 2020. Diversification of Neotropical Freshwater Fishes.  
221 *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 51:27–53.

222 Alda F., Tagliacollo V.A., Bernt M.J., Waltz B.T., Ludt W.B., Faircloth B.C., Alfaro M.E.,  
223 Albert J.S., Chakrabarty P. 2019. Resolving Deep Nodes in an Ancient Radiation of  
224 Neotropical Fishes in the Presence of Conflicting Signals from Incomplete Lineage Sorting.  
225 *Syst. Biol.* 68:573–593.

226 Anjos M.S., Bitencourt J.A., Nunes L.A., Sarmiento-Soares L.M., Carvalho D.C., Armbruster  
227 J.W., Affonso P.R.A.M. 2020. Species delimitation based on integrative approach suggests  
228 reallocation of genus in Hypostomini catfish (Siluriformes, Loricariidae). *Hydrobiologia.*  
229 847:563–578.

230 Armbruster J.W., Lujan N.K., Bloom D.D. 2021. Redescription of the Guiana Shield Darter  
231 Species *Characidium crandellii* and *C. declivirostre* (Crenuchidae) with Descriptions of  
232 Two New Species. *Ichthyol. Herpetol.* 109:102–122.

233 Azpelicueta M. de las M., Benítez M., Aichino D., Mendez D. 2015. A new species of the genus  
234 *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae), a tararira from the lower Paraná River, in  
235 Misiones, Argentina. *Acta Zool. Lilloana.* 59:71–82.

236 Bejerano G., Pheasant M., Makunin I., Stephen S., Kent W.J., Mattick J.S., Haussler D. 2004.  
237 Ultraconserved elements in the human genome. *Science* (80-. ). 304:1321–1325.

238 Bertollo L.A.C., Born G.G., Dergam J.A., Fenocchio A.S., Moreira-Filho O. 2000. A  
239 biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic  
240 survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations.  
241 *Chromosom. Res.* 8:603–613.

242 Capobianco A., Friedman M. 2019. Vicariance and dispersal in southern hemisphere freshwater  
243 fish clades: a palaeontological perspective. *Biol. Rev.* 94:662–699.

244 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 fishes: The case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial DNA*. 22:80–86.

Chakrabarty P., Faircloth B.C., Alda F., Ludt W.B., McMahan C.D., Near T.J., Dornburg A., Albert J.S., Arroyave J., Stiassny M.L.J., Sorenson L., Alfaro M.E. 2017. Phylogenomic Systematics of Ostariophysan Fishes: Ultraconserved Elements Support the Surprising Non-Monophyly of Characiformes. *Syst. Biol.* 66:881–895.

Cioffi M. de B., Molina W.F., Artoni R.F., Bertollo L.A.C. 2012. Chromosomes as Tools for Discovering Biodiversity – The Case of Erythrinidae Fish Family. In: Tirunilai P., editor. *Recent Trends in Cytogenetic Studies - Methodologies and Applications*. Rijeka, Croatia: InTech. p. 125–146.

Dergam J.A., Paiva S.R., Schaeffer C.E., Godinho A.L., Vieira F. 2002. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. *Biologia (Bratisl)*. 387:379–387.

Dermitzakis E.T., Reymond A., Antonarakis S.E. 2005. Conserved non-genic sequences — an unexpected feature of mammalian genomes. *Nat. Rev. Genet.* 6:151–157.

DeSalle R. 2006. Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: Response to Rubinoff. *Conserv. Biol.* 20:1545–1547.

Diniz D., Bertollo L.A.C. 2003. Karyotypic studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Erythrinidae) populations. A biodiversity analysis. *Caryologia*. 56:303–313.

Faircloth B.C., Alda F., Hoekzema K., Burns M.D., Oliveira C., Albert J.S., Melo B.F., Ochoa L.E., Roxo F.F., Chakrabarty P., Sidlauskas B.L., Alfaro M.E. 2020. A Target Enrichment Bait Set for Studying Relationships among Ostariophysan Fishes. *Copeia*. 108:47–60.

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. *Syst. Biol.* 61:717–26.

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.

Fontenelle J.P., Portella Luna Marques F., Kolmann M.A., Lovejoy N.R. 2021. Biogeography of the neotropical freshwater stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygoninae) reveals effects of continent-scale paleogeographic change and drainage evolution. *J. Biogeogr.* 48:1406–

276 1419.

277 Fricke R., Eschmeyer W.N., Van der Laan R. 2022. ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES:  
278 GENERA, SPECIES, REFERENCES. Available from  
279 <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.

280 Garavello J.C., Ramirez J.L., Oliveira A.K. de, Britski H.A., Birindelli J.L.O., Galetti Jr P.M.  
281 2021. Integrative taxonomy reveals a new species of Neotropical headstanding fish in genus  
282 *Schizodon* (Characiformes: Anostomidae). Neotrop. Ichthyol. 19:1–32.

283 Gayet M., Jégu M., Bocquentin J., Negri F.R. 2003. New Characoids from the Upper Cretaceous  
284 and Paleocene of Bolivia and the Mio-Pliocene of Brazil : Phylogenetic Position and  
285 Paleobiogeographic Implications. J. Vertebr. Paleontol. 23:28–46.

286 Gilbert P.S., Chang J., Pan C., Sobel E., Sinsheimer J.S., Faircloth B.C., Alfaro M.E. 2015.  
287 Genome-wide ultraconserved elements exhibit higher phylogenetic informativeness than  
288 traditional gene markers in percomorph fishes. Mol. Phylogenet. Evol. 92:140–146.

289 Giuliano-Caetano L., Jorge L.C., Moreira-Filho O., Bertollo L.A.C. 2001. Comparative  
290 Cytogenetic Studies on *Hoplerythrinus unitaeniatus* Populations (Pisces, Erythrinidae).  
291 Cytologia (Tokyo). 66:39–43.

292 Guimarães K.L.A., Rosso J.J., González-Castro M., Souza M.F.B., Díaz de Astarloa J.M.,  
293 Rodrigues L.R.R. 2021. A new species of *Hoplias malabaricus* species complex  
294 (Characiformes: Erythrinidae) from the Crepori River, Amazon basin, Brazil. .

295 Harrington R.C., Faircloth B.C., Eytan R.I., Smith W.L., Near T.J., Alfaro M.E., Friedman M.  
296 2016. Phylogenomic analysis of carangimorph fishes reveals flatfish asymmetry arose in a  
297 blink of the evolutionary eye. BMC Evol. Biol. 16:1–14.

298 Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., DeWaard J.R. 2003. Biological identifications through  
299 DNA barcodes. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 270:313–321.

300 Henschel E., Lujan N.K., Baskin J.N. 2020. *Ammoglanis natgeorum*, a new miniature pencil  
301 catfish (Siluriformes: Trichomycteridae) from the lower Atabapo River, Amazonas,  
302 Venezuela. J. Fish Biol. 97:1481–1490.

303 Hubert N., Hanner R. 2015. DNA Barcoding, species delineation and taxonomy: a historical  
304 perspective. DNA Barcodes. 3:44–58.

305 Hubert N., Hanner R., Holm E., Mandrak N.E., Taylor E., BurrIDGE M., Watkinson D., Dumont  
306 P., Curry A., Bentzen P., Zhang J., April J., Bernatchez L. 2008. Identifying Canadian

307 freshwater fishes through DNA barcodes. PLoS One. 3.  
308 Ivanova N. V., Zemlak T.S., Hanner R.H., Hebert P.D.N. 2007. Universal primer cocktails for  
309 fish DNA barcoding. Mol. Ecol. Notes. 7:544–548.  
310 Lara A., Ponce de León J.L., Rodríguez R., Casane D., Côté G., Bernatchez L., García-Machado  
311 E. 2010. DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: Evidence for cryptic species and  
312 taxonomic conflicts. Mol. Ecol. Resour. 10:421–430.  
313 Lasso C., Meri J. 2001. Estructura comunitaria de la ictiofauna en herbazales y bosques  
314 inundables del bajo río Guanipa, cuenca del Golfo de Paria, Venezuela. Mem. Fund. La  
315 Salle Cienc. Nat. 155:73–90.  
316 Lasso C.A., Morales-Betancourt M., Rivas-Lara T.S., Rincón C.E., González-Cañon G., Galvis-  
317 Galindo I. 2011. *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). Capítulo 7. In: Lasso  
318 C.A., Agudelo E., Jiménez-Segura L.F., Ramírez-Gil H., Morales-Betancourt M., Ajiaco-  
319 Martínez R.E., de Paula-Gutiérrez F., Usma J.S., Muñoz Torres S.E., Sanabria-Ochoa A.I.,  
320 editors. I. Catálogo de los Recursos Pesqueros Continentales de Colombia. Serie Editorial  
321 Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Bogotá, Colombia:  
322 Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). p.  
323 294–300.  
324 Liem K.F. 1988. Form and function of lungs: The evolution of air breathing mechanisms. Integr.  
325 Comp. Biol. 28:739–759.  
326 Loureiro M., de Sá R., Serra S.W., Alonso F., Lanés L.E.K., Volcan M.V., Calviño P., Nielsen  
327 D., Duarte A., Garcia G. 2018. Review of the family Rivulidae (Cyprinodontiformes,  
328 Aplocheiloidei) and a molecular and morphological phylogeny of the annual fish genus  
329 *Austrolebias* Costa 1998. Neotrop. Ichthyol. 16:1–20.  
330 Machado C.B., Galetti P.M., Carnaval A.C. 2018. Bayesian analyses detect a history of both  
331 vicariance and geodispersal in Neotropical freshwater fishes. J. Biogeogr. 45:1313–1325.  
332 Marrero C., Machado-allison A., González V., Velázquez J., Rodríguez-Olarte D. 1997. Los  
333 Morichales del Oriente de Venezuela: su importancia en la distribución y ecología de los  
334 componentes de la Ictiofauna dulceacuícola regional. Acta Biol. Venez. 17:65–79.  
335 Martinez J.F., Lui R.L., Traldi J.B., Blanco D.R., Moreira-Filho O. 2016. Comparative  
336 Cytogenetics of *Hoplerethrinus unitaeniatus* (Agassiz, 1829) (Characiformes, Erythrinidae)  
337 Species Complex from Different Brazilian Hydrographic Basins. Cytogenet. Genome Res.

338 149:191–200.

339 Mateussi N.T.B., Melo B.F., Ota R.P., Roxo F.F., Ochoa L.E., Foresti F., Oliveira C. 2020.

340 Phylogenomics of the Neotropical fish family Serrasalminidae with a novel intrafamilial

341 classification (Teleostei: Characiformes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 153:106945.

342 Mattox G.M.T., Bifi A.G., Oyakawa O.T. 2014. Taxonomic study of *Hoplias microlepis*

343 (Günther, 1864), a trans-Andean species of trahiras (Ostariophysi: Characiformes:

344 Erythrinidae). *Neotrop. Ichthyol.* 12:343–352.

345 Mattox G.M.T., Toledo-Piza M., Oyakawa O.T. 2006. Taxonomic Study of *Hoplias Aimara*

346 (Valenciennes, 1846) and *Hoplias macrophthalmus* (Pellegrin, 1907) (Ostariophysi,

347 Characiformes, Erythrinidae). *Copeia.* 2006:516–528.

348 McCormack J.E., Harvey M.G., Faircloth B.C., Crawford N.G., Glenn T.C., Brumfield R.T.

349 2013. A Phylogeny of Birds Based on Over 1,500 Loci Collected by Target Enrichment and

350 High-Throughput Sequencing. *PLoS One.* 8.

351 McGee M.D., Faircloth B.C., Borstein S.R., Zheng J., Hulsey C.D., Wainwright P.C., Alfaro

352 M.E. 2016. Replicated divergence in cichlid radiations mirrors a major vertebrate

353 innovation. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283:1–6.

354 Meier R., Zhang G., Ali F. 2008. The use of mean instead of smallest interspecific distances

355 exaggerates the size of the “barcoding gap” and leads to misidentification. *Syst. Biol.*

356 57:809–813.

357 Melo B.F., Ochoa L.E., Vari R.P., Oliveira C. 2016. Cryptic species in the Neotropical fish

358 genus *Curimatopsis* (Teleostei, Characiformes). *Zool. Scr.* 45:650–658.

359 Melo B.F., Sidlauskas B.L., Near T.J., Roxo F.F., Ghezelayagh A., Ochoa L.E., Stiassny M.L.J.,

360 Arroyave J., Chang J., Faircloth B.C., MacGuigan D.J., Harrington R.C., Benine R.C.,

361 Burns M.D., Hoekzema K., Sanches N.C., Maldonado-Ocampo J.A., Castro R.M.C., Foresti

362 F., Alfaro M.E., Oliveira C. 2021. Accelerated Diversification Explains the Exceptional

363 Species Richness of Tropical Characoid Fishes. *Syst. Biol.* 0:1–15.

364 Moraes G., Polez V.L., Iwama G.K. 2004. Biochemical responses of two erythrinidae fish to

365 environmental ammonia. *Braz. J. Biol.* 64:95–102.

366 Moron S.E., de Andrade C.A., Fernandes M.N. 2009. Response of mucous cells of the gills of

367 traíra (*Hoplias malabaricus*) and jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) (Teleostei:

368 Erythrinidae) to hypo- and hyper-osmotic ion stress. *Neotrop. Ichthyol.* 7:491–498.



369 Nelson J.S., Grande T.C., Wilson M.V.H. 2016. Fishes of the World. Hoboken, New Jersey:  
370 John Wiley & Sons.

371 Ochoa L.E., Datovo A., DoNascimento C., Roxo F.F., Sabaj M.H., Chang J., Melo B.F., Silva  
372 G.S.C., Foresti F., Alfaro M., Oliveira C. 2020a. Phylogenomic analysis of trichomycterid  
373 catfishes (Teleostei: Siluriformes) inferred from ultraconserved elements. *Sci. Rep.* 10:1–  
374 15.

375 Ochoa L.E., Melo B.F., García-Melo J.E., Maldonado-Ocampo J.A., Souza C.S., Albornoz-  
376 Garzón J.G., Conde-Saldaña C.C., Villa-Navarro F., Ortega-Lara A., Oliveira C. 2020b.  
377 Species delimitation reveals an underestimated diversity of Andean catfishes of the family  
378 Astroblepidae (Teleostei: Siluriformes). *Neotrop. Ichthyol.* 18:1–19.

379 Oliveira A.K. de, Garavello J.C. 2003. Fish assemblage composition in a tributary of the Mogi  
380 Guaçu river basin, southeastern Brazil. *Iheringia. Série Zool.* 93:127–138.

381 Oliveira C., Avelino G.S., Abe K.T., Mariguela T.C., Benine R.C., Ortí G., Vari R.P., Corrêa E  
382 Castro R.M. 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae  
383 (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive  
384 ingroup sampling. *BMC Evol. Biol.* 11:275.

385 Oyakawa O.T. 2003. Family Erythrinidae. In: Reis R.E., Kullander S.O., Ferraris C.J., editors.  
386 Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, Brazil:  
387 Edipucrs. p. 238–240.

388 Oyakawa O.T., Mattox G. M.T. 2018. Family Erythrinidae - Wolf-fishes and Yarrows. In: van  
389 der Sleen P., Albert J.S., editors. Field Guide to the Fishes of the Amazon, Orinoco, and  
390 Guianas. Princeton University Press. p. 156–158.

391 Oyakawa O.T., Mattox G.M.T. 2009. Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias*  
392 *lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of  
393 two new species. *Neotrop. Ichthyol.* 7:117–140.

394 Oyakawa O.T., Toledo-Piza M., Mattox G.M.T. 2013. Erythrinidae. In: Queiroz L.J., Torrente-  
395 Vilara G., Ohara W.N., Silva-Pires T.H., Zuanon J., Doria C.R.C., editors. Peixes do rio  
396 Madeira, volume 2. São Paulo, Brazil: Diaeto. p. 351.

397 Patwardhan A., Ray S., Roy A. 2014. Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *J.*  
398 *Phylogenetics Evol. Biol.* 02.

399 Pelster B. 2021. Using the swimbladder as a respiratory organ and/or a buoyancy structure—

400 Benefits and consequences. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Integr. Physiol.*:1–12.

401 Pennacchio L.A., Ahituv N., Moses A.M., Prabhakar S., Nobrega M.A., Shoukry M., Minovitsky  
402 S., Dubchak I., Holt A., Lewis K.D., Plajzer-Frick I., Akiyama J., De Val S., Afzal V.,  
403 Black B.L., Couronne O., Eisen M.B., Visel A., Rubin E.M. 2006. In vivo enhancer  
404 analysis of human conserved non-coding sequences. *Nature*. 444:499–502.

405 Pereira L., Hanner R., Foresti F., Oliveira C. 2013a. Can DNA barcoding accurately discriminate  
406 megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genet.* 14:1–14.

407 Pereira L.H.G., Pazian M.F., Hanner R., Foresti F., Oliveira C. 2011. DNA barcoding reveals  
408 hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes:  
409 Characidae) from the Upper Paran Basin of Brazil. *Mitochondrial DNA*. 22:87–96.

410 Pereira T.L., Santos U., Schaefer C.E., Souza G.O., Paiva S.R., Malabarba L.R., Schmidt E.E.,  
411 Dergam J.A. 2013b. Dispersal and vicariance of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794)  
412 (Teleostei, Erythrinidae) populations of the Brazilian continental margin. *J. Biogeogr.*  
413 40:905–914.

414 de Pinna M., Zuanon J., Rapp Py-Daniel L., Petry P. 2017. A new family of neotropical  
415 freshwater fishes from deep fossorial amazonian habitat, with a reappraisal of  
416 morphological characiform phylogeny (Teleostei: Ostariophysi). *Zool. J. Linn. Soc.* XX:1–  
417 13.

418 Puillandre N., Lambert A., Brouillet S., Achaz G. 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap  
419 Discovery for primary species delimitation. *Mol. Ecol.* 21:1864–1877.

420 de Queiroz L.J., Cardoso Y., Jacot-des-Combes C., Bahechar I.A., Lucena C.A., Rapp Py-Daniel  
421 L., Sarmiento Soares L.M., Nylinder S., Oliveira C., Parente T.E., Torrente-Vilara G.,  
422 Covain R., Buckup P., Montoya-Burgos J.I. 2020. Evolutionary units delimitation and  
423 continental multilocus phylogeny of the hyperdiverse catfish genus *Hypostomus*. *Mol.*  
424 *Phylogenet. Evol.* 145:106711.

425 Ramirez J.L., Santos C.A., Machado C.B., Oliveira A.K., Garavello J.C., Britski H.A., Galetti  
426 P.M. 2020. Molecular phylogeny and species delimitation of the genus *Schizodon*  
427 (Characiformes, Anostomidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 153:106959.

428 Ratnasingham S., Hebert P.D.N. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System: Barcoding.  
429 *Mol. Ecol. Notes.* 7:355–364.

430 Ratnasingham S., Hebert P.D.N. 2013. A DNA-Based Registry for All Animal Species: The

431 Barcode Index Number (BIN) System. PLoS One. 8.

432 Reis R.E., Albert J.S., Di Dario F., Mincarone M.M., Petry P., Rocha L.A. 2016. Fish  
433 biodiversity and conservation in South America. J. Fish Biol. 89:12–47.

434 Rossini B.C., Oliveira C.A.M., Gonçalves De Melo F.A., De Araújo Jo Bertaco V., Díaz De  
435 Astarloa J.M., Rosso J.J., Foresti F., Oliveira C. 2016. Highlighting *Astyanax* species  
436 diversity through DNA barcoding. PLoS One. 11:1–20.

437 Rosso J.J., González-Castro M., Bogan S., Cardoso Y.P., Mabragaña E., Delpiani M., Díaz J. de  
438 A. 2018. Integrative taxonomy reveals a new species of *Hoplias malabaricus* species  
439 complex (Teleostei: Erythrinidae). Ichthyol. Explor. Freshwaters.:1–18.

440 Rosso J.J., Mabragaña E., González-Castro M., Delpiani M., Avigliano E., Schenone, Díaz de  
441 Astarloa J.M. 2016. A new species of the *Hoplias malabaricus* species complex  
442 (Characiformes: Erythrinidae) from the La Plata River basin. Cybium. 40:199–208.

443 Roxo F.F., Ochoa L.E., Sabaj M.H., Lujan N.K., Covain R., Silva G.S.C., Melo B.F., Albert J.S.,  
444 Chang J., Foresti F., Alfaro M.E., Oliveira C. 2019. Phylogenomic reappraisal of the  
445 Neotropical catfish family Loricariidae (Teleostei: Siluriformes) using ultraconserved  
446 elements. Mol. Phylogenet. Evol. 135:148–165.

447 Sánchez-Duarte P., Lasso C.A., González-Cañon G., Nieto-Torres S. 2011. *Hoplerethrinus*  
448 *unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae). Capítulo 7. In: Lasso C.A., Agudelo E.,  
449 Jiménez-Segura L.F., Ramírez-Gil H., Morales-Betancourt M., Ajiaco-Martínez R.E., de  
450 Paula-Gutiérrez F., Usma J.S., Muñoz Torres S.E., Sanabria-Ochoa A.I., editors. I. Catálogo  
451 de los Recursos Pesqueros Continentales de Colombia. Serie Editorial Recursos  
452 Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Bogotá, Colombia: Instituto de  
453 Investigación de los Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). p. 291–293.

454 Sandelin A., Bailey P., Bruce S., Engström P.G., Klos J.M., Wasserman W.W., Ericson J.,  
455 Lenhard B. 2004. Arrays of ultraconserved non-coding regions span the loci of key  
456 developmental genes in vertebrate genomes. BMC Genomics. 5:1–9.

457 Santos U., Völcker C.M., Belei F.A., Cioffi M.B., Bertollo L.A.C., Paiva S.R., Dergam J.A.  
458 2009. Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus*  
459 (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. J. Fish Biol. 75:2326–2343.

460 Sassi F. de M.C., Perez M.F., Oliveira V.C.S., Deon G.A., de Souza F.H.S., Ferreira P.H.N., de  
461 Oliveira E.A., Hatanaka T., Liehr T., Bertollo L.A.C., Cioffi M. de B. 2021. High genetic

462 diversity despite conserved karyotype organization in the giant trahiras from genus *Hoplias*  
463 (Characiformes, Erythrinidae). *Genes* (Basel). 12:1–13.

464 Siepel A., Bejerano G., Pedersen J.S., Hinrichs A.S., Hou M., Rosenbloom K., Clawson H.,  
465 Spieth J., Hillier L.D.W., Richards S., Weinstock G.M., Wilson R.K., Gibbs R.A., Kent  
466 W.J., Miller W., Haussler D. 2005. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect,  
467 worm, and yeast genomes. *Genome Res.* 15:1034–1050.

468 Silva G.S.C., Melo B.F., Roxo F.F., Ochoa L.E., Shibatta O.A., Sabaj M.H., Oliveira C. 2021a.  
469 Phylogenomics of the bumblebee catfishes (Siluriformes: Pseudopimelodidae) using  
470 ultraconserved elements. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*:1–11.

471 Silva G.S.C., Roxo F.F., Melo B.F., Ochoa L.E., Bockmann F.A., Sabaj M.H., Jerep F.C.,  
472 Foresti F., Benine R.C., Oliveira C. 2021b. Evolutionary history of Heptapteridae catfishes  
473 using ultraconserved elements (Teleostei, Siluriformes). *Zool. Scr.* 50:543–554.

474 Simons C., Pheasant M., Makunin I. V., Mattick J.S. 2006. Transposon-free regions in  
475 mammalian genomes. *Genome Res.* 16:164–172.

476 Stephen S., Pheasant M., Makunin I. V., Mattick J.S. 2008. Large-scale appearance of  
477 ultraconserved elements in tetrapod genomes and slowdown of the molecular clock. *Mol.*  
478 *Biol. Evol.* 25:402–408.

479 Struck T.H., Feder J.L., Bendiksbj M., Birkeland S., Cerca J., Gusarov V.I., Kistenich S.,  
480 Larsson K.H., Liow L.H., Nowak M.D., Stedje B., Bachmann L., Dimitrov D. 2018.  
481 Finding Evolutionary Processes Hidden in Cryptic Species. *Trends Ecol. Evol.* 33:153–163.

482 Su G., Villéger S., Brosse S. 2019. Morphological diversity of freshwater fishes differs between  
483 realms, but morphologically extreme species are widespread. *Glob. Ecol. Biogeogr.*  
484 28:211–221.

485 Valdez-Moreno M., Ivanova N. V., Elías-Gutiérrez M., Contreras-Balderas S., Hebert P.D.N.  
486 2009. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA  
487 barcodes. *J. Fish Biol.* 74:377–402.

488 Ward R.D., Zemplak T.S., Innes B.H., Last P.R., Hebert P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's  
489 fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360:1847–1857.

490 Woolfe A., Goodson M., Goode D.K., Snell P., McEwen G.K., Vavouri T., Smith S.F., North P.,  
491 Callaway H., Kelly K., Walter K., Abnizova I., Gilks W., Edwards Y.J.K., Cooke J.E.,  
492 Elgar G. 2005. Highly conserved non-coding sequences are associated with vertebrate

493 development. PLoS Biol. 3.  
494 Zarza E., Connors E.M., Maley J.M., Tsai W.L.E., Heimes P., Kaplan M., McCormack J.E.  
495 2018. Combining ultraconserved elements and mtDNA data to uncover lineage diversity in  
496 a Mexican highland frog (Sarcohyala; Hylidae). PeerJ. 2018:1–25.  
497 Zhang J., Kapli P., Pavlidis P., Stamatakis A. 2013. A general species delimitation method with  
498 applications to phylogenetic placements. Bioinformatics. 29:2869–2876.  
499  
500  
501