

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Instituto de Biociências de Botucatu

Kelly Terumi Abe

**Análise das relações filogenéticas entre espécies da subfamília
Bryconinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae)
utilizando sequências de DNA mitocondrial e nuclear**



Botucatu – SP
2011

Universidade Estadual Paulista – UNESP
Instituto de Biociências de Botucatu

Kelly Terumi Abe

**Análise das relações filogenéticas entre espécies da subfamília
Bryconinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae)
utilizando sequências de DNA mitocondrial e nuclear**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus Botucatu, como parte
dos requisitos para obtenção do título de Doutor
em Ciências Biológicas, Área de concentração:
Zoologia

Orientador: Prof. Dr. Claudio de Oliveira

Botucatu – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Abe, Kelly Terumi.

Análise das relações filogenéticas entre espécies da subfamília Bryconinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) utilizando sequências de DNA mitocondrial e Nuclear - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Claudio de Oliveira

Capes: 20400005

1. Zoologia. 2. Peixe. 3. DNA.

Palavras-chave: Characidae; Characiformes; DNA mitocondrial;
Filogenia molecular; Sequenciamento.

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

UNESP - Botucatu - SP



Instituto de Biociências de Botucatu.



À minha família, cujo apoio, estímulo, carinho
e incentivo constantes, possibilitaram a
realização deste trabalho,
Dedico...

***“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode
começar agora e fazer um novo fim.”***

Chico Xavier

Agradecimentos

Quero expressar aqui meus sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. A todas essas pessoas fica a minha eterna gratidão, em especial:

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudo e o financiamento do projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Claudio de Oliveira, pela orientação, pelos valiosos conhecimentos transmitidos, pela paciência e pela confiança em meu trabalho. Muito obrigada professor, por esses anos de trabalho juntos.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti pela dedicação e apoio ao laboratório de Biologia e Genética de Peixes e pelo exemplo de profissionalismo.

A todos os colegas e amigos do laboratório de Biologia e Genética de Peixes, que durante esses anos convivemos mais entre nós do que com nossas próprias famílias, obrigada pelo companheirismo, pelo auxílio e pela vivência do dia a dia.

Ao Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu, pelas condições que possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia, à Luciana por todo auxílio, ao Renato Davide, à D. Tera e D. Iolanda pelo convívio carinhoso desses anos.

Ao Dr. Flávio César Thadeo de Lima, pela identificação correta das espécies de *Brycon*.

Ao programa de Pós-Graduação pelo auxílio na realização deste estudo e aos funcionários da seção de Pós-Graduação pelo apoio.

A Tatiane, ao Guilherme ("Varvito"), Zeca e Ricardo ("Tarja") pelas sugestões e por sempre me tirarem as dúvidas nos programas, principalmente no Adobe Photoshop!

As minhas grandes amigas, Vanessa, Luz, Glaura, “Manu”, Priscilla, Daniela e Michelli, pessoas maravilhosas que tive o privilégio de encontrar no grande percurso da vida. Obrigada pela amizade, carinho, e pelos ótimos momentos que passamos juntas dentro e principalmente, fora do laboratório.

À minha mãe e meus irmãos, que sempre me deram apoio em todos os momentos da minha vida.

A toda minha família pelo carinho e estímulo em todos os momentos. Amo todos vocês!

Enfim, a Deus por tudo e por mais esta oportunidade.

Muito obrigada!!!

Resumo

A família Characidae é o grupo mais especioso entre os Characiformes, abrangendo cerca de 1100 espécies válidas, divididas em 14 subfamílias e com diversos gêneros considerados *incertae sedis*. A subfamília Bryconinae inclui 43 espécies válidas sendo que 41 pertencem ao gênero *Brycon*, uma ao gênero *Henochilus* e uma ao gênero *Chilobrycon*. Os peixes do gênero *Brycon* estão entre os mais importantes na pesca amadora e profissional de água doce da América do Sul. Apesar da importância econômica e ecológica das espécies dessa subfamília, ainda há resultados controversos presentes na literatura quanto à sua composição, conhecimento da relação entre seus componentes e de seu relacionamento com outros Characiformes. Para tentar resolver essas questões, o presente trabalho tem como objetivo elaborar e testar hipóteses de relacionamento das espécies dos diferentes gêneros dessa subfamília e desta com outros grupos de Characidae e Characiformes. Sequências parciais de dois genes mitocondriais (16S RNA e Citocromo b) e três genes nucleares (Myh6, Rag1 e Rag2) foram obtidas de 231 espécies, incluindo 230 Characiformes e 1 Cypriniformes, totalizando uma matriz total de 4684pb. As análises filogenéticas foram conduzidas pelo método de Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Análise Bayesiana. Todos os métodos filogenéticos apontaram para o mesmo resultado: Bryconinae mais os representantes do gênero *Salminus* formaram o grupo irmão de Gasteropelecidae, diretamente relacionados às subfamílias de Characidae: Agoniatinae, Clupeacharacinae e Triportheinae e também aos gêneros *Engraulisoma* e *Lignobrycon*. A subfamília Bryconinae e o gênero *Brycon* não são monofiléticos, assim como os grupos cis e transandinos de *Brycon*. *Salminus* apareceu entre as amostras de *Brycon*. *Chilobrycon* pertence a um clado formado por espécies de *Brycon* trans-andinas. *B. moorei* (trans-andina) é irmão das espécies encontradas nas bacias dos rios Amazonas, São Francisco e Paraná. *Henochilus* é grupo-irmão das espécies de *Brycon* dos rios costeiros da região leste do Brasil. Aspectos relacionados à composição de Bryconinae, assim como a distribuição dos grupos são discutidos no texto.

Abstract

The family Characidae is the richest group among Characiformes, comprising about 1100 valid species, divided in 14 subfamilies and several genera considered *incertae sedis*. Among Characidae, the subfamily Bryconinae includes 43 valid species; among which 41 belong to the genus *Brycon*, one to the genus *Henochilus* and one to the genus *Chilobrycon*. In spite of the economic and ecological importance of the species of the subfamily Bryconinae, its phylogeny, classification and composition are not yet well solved. The main objective of this study was to test the hypothesis of relationship of the Bryconinae with other group of Characidae and Characiformes. Partial sequences of two mitochondrial genes (cytochrome b and 16S RNA) and three nuclear genes (Myh6, RAG1 and RAG2) were obtained from 231 species, including 230 Characiformes and one Cypriniformes, resulting in a matrix of 4684 pb. Phylogenetic analysis were conducted by the methods of Maximum Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian analysis. In all phylogenetic analysis we achieved the same result: Bryconinae and the genus *Salminus* formed the sister group of Gasteropelecidae directly related to the Characidae subfamilies Agoniatinae, Clupeacharacinae, and Triportheinae and also to the genera *Engraulisoma* and *Lignobrycon*. The subfamily Bryconinae and *Brycon* are not monophyletic, as well as the cis- and trans-Andean groups. *Salminus* appeared between samples of *Brycon*. *Chilobrycon* is related to some trans-Andean species of *Brycon*. *B. moorei* (trans-Andean) is related of the species found in the Amazonas, São Francisco and Paraná Basis. *Henochilus wheatlandii* is sister-group of species of the coastal rivers of eastern Brazil. Some aspects related to the composition of Bryconinae as well as the groups distribution are discussed in the text.

Índice

1. Introdução.....	01
1.1. Aspectos sistemáticos e taxonômicos.....	01
1.2. Considerações sobre a subfamília Bryconinae.....	11
1.3. Considerações sobre os genes utilizados.....	15
2. Objetivos.....	30
3. Materiais e Métodos.....	31
3.1. Materiais.....	31
3.2. Métodos.....	43
3.2.1. Extração de DNA genômico de tecidos sólidos.....	43
3.2.2. Reação de amplificação.....	44
3.2.3. Purificação do produto da PCR.....	48
3.2.4. Reação de amplificação para o sequenciamento.....	48
3.2.5. Limpeza do PCR de Sequenciamento.....	49
3.2.6. Sequenciamento de DNA.....	50
3.2.7. Alinhamento e análise das sequências e análise filogenética.....	51
4. Resultados.....	54
4.1. Análise das relações entre as subfamílias representantes de Characidae.....	54
4.2. Análise das relações entre os gêneros e espécies pertencentes à Bryconinae....	56
5. Discussão.....	72
5.1. Relação de Bryconinae com os demais Characidae.....	72
5.2. Relação da subfamília Bryconinae e <i>Salminus</i>	76
5.3. Relações entre gêneros e espécies de Bryconinae.....	81
5.4. Padrões Biogeográficos.....	88
6. Conclusões.....	100
7. Referências Bibliográficas.....	101
8. Anexo.....	117

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos sistemáticos e taxonômicos

Com mais de 32.000 espécies reconhecidas, os peixes formam a maior unidade entre os vertebrados. Destas espécies cerca de metade vive em água doce (Eschmeyer *et al.*, 2010). Dentre os peixes há um grande número de Actinopterygii (Pough, 2003). Segundo o autor, essa predominância indica que tanto os actinopterígeos fósseis quanto os vivos podem ter taxas de especiação, principalmente alopátrica, mais altas do que aquelas estimadas para as aves ou, até mesmo, para alguns insetos. Espécies de peixes, evoluindo no isolamento de lagos, parecem levar menos tempo para se especiar do que todos os organismos altamente derivados pesquisados (vertebrados e insetos) (Pough, 2003).

Segundo Nelson (2006) há 515 famílias de peixes reconhecidas e destas nove famílias apresentam um número considerável de espécies (mais de 400 espécies em cada uma). Estas famílias, em ordem decrescente de número de espécies são Cyprinidae, Gobiidae, Cichlidae, Characidae, Loricariidae, Balitoridae, Serranidae, Labridae e Scorpaenidae. Esse grupo de peixes é bastante representativo correspondendo a 33% (9.302) de todas as espécies do mundo e, dentre essas nove famílias, cerca de 66% (6.106) das espécies são de água doce.

A ictiofauna de água doce da região Neotropical é a mais rica de todo o mundo. De acordo com Reis *et al.* (2003), das 13.000 espécies de peixes de água doce estimadas para o planeta, aproximadamente 6.000 espécies são encontradas na região Neotropical, das quais 4.475 são consideradas válidas e cerca de 1.550 são conhecidas, porém ainda não descritas formalmente. Considerando todas as espécies encontradas 37% são

Siluriformes, 33% Characiformes, 9% Ciclídeos, 8% Cyprinotiformes, 3% Gymnotiformes e 7% pertencem a outras ordens menores. Dentro desse universo de espécies de água doce destacam-se os representantes da superordem Ostariophysi que representam 71% dessa fauna (Reis *et al.*, 2003). A prevalência dos Ostariophysi em ambientes de água doce é uma realidade mundial, uma vez que do total de espécies de peixes de água doce do mundo 75% são Ostariophysi (Fink e Fink, 1981).

Uma hipótese para o sucesso evolutivo para dessa superordem pode ser atribuído ao “aparato de Weber”, que consiste numa série de pequenos ossos articulados que se estendem da bexiga natatória até ao ouvido interno (Briggs, 2005). Utilizando a bexiga natatória como um amplificador e a corrente de ossos como condutores, o aparelho weberiano, aumenta muito a sensibilidade auditiva dos peixes, funcionando assim, como um enorme tímpano (Pough, 2003). Esse mecanismo é de grande valia porque serve de fuga contra os possíveis predadores e pode estar relacionado também a alimentação (Pough, 2003).

A superordem Ostariophysi compreende cinco grandes ordens: Gonorhynchiformes, Cypriniformes, Characiformes, Siluriformes e Gymnotiformes (Briggs, 2005). Os siluriformes apresentam uma distribuição mais ampla podendo ser encontrados nas Américas do Norte e Sul, Eurásia e África; os cypriniformes são encontrados na Eurásia, América do Norte e África; Characiformes vivem na América do sul e África; e os Gymnotiformes existem somente na América do Sul (Berra, 1981). Há duas famílias de siluriformes que se tornaram adaptadas à água salgada (Ariidae e Plotosidae), e não há ocorrência dos ostariophysi na Austrália, Ilha de Madagascar e no oeste da Índia (Berra, 1981).

A fauna de Characiformes dos dois lados do oceano Atlântico mostra uma pronunciada assimetria em termos de número de espécies e de táxons supra-específicos.

O componente africano desta ordem inclui cerca de 220 espécies. Elas estão distribuídas do sul da bacia do rio Nilo, nos desertos do norte da África, e por todo o resto do continente, com diversidade máxima encontrada nas regiões mais úmidas do continente, como a bacia do Congo, bacia de África Oriental e bacia da Guiné. Do outro lado do Atlântico mais de 1.700 espécies são conhecidas do sul dos Estados Unidos até o sul da América do sul. As principais bacias da América do Sul são lar de uma imensa e taxonomicamente diversa fauna de peixes Characiformes. Aproximadamente 500 espécies de Characiformes são conhecidas do rio Orinoco (Lasso *et al.*, 2004), um número comparável vive nos rios da drenagem do Escudo das Guianas (Vari *et al.*, 2009), e um número maior, mas desconhecido, vive nos múltiplos sistemas de rios que formam a bacia Amazônica. Centenas de outras espécies habitam sistemas de drenagens na América Central, México e no restante da América do Sul.

O confinamento dos Characiformes nesses habitats tem feito deles um importante grupo-modelo para diversos estudos biogeográficos (Orti e Meyer, 1997). A aparente relação entre certos grupos de peixes de água doce entre a África e América do Sul tem sido observada pelos ictiólogos por mais de um século (Lundberg, 1993). A distribuição geográfica e a radiação dos grupos no Novo Mundo pode ter surgido por vicariância devido à movimentação das placas tectônicas e como consequência a formação de uma fenda entre esses dois continentes, originando assim o Oceano Atlântico possivelmente entre 85-100 milhões de anos atrás (Buckup, 1998; Orti e Meyer, 1997). Contudo há ocorrência de fósseis na Europa e novos conhecimentos dentro das relações filogenéticas com certos grupos de Characiformes indicam que um simples modelo de vicariância não pode explicar a presente distribuição desse grupo. Por exemplo, vários grupos africanos e neotropicais não são monofiléticos embora fiquem restritos a essas faunas continentais (Buckup, 1998 e Lundberg, 1993). Com isso, diferentes hipóteses biogeográficas surgem por

consequência de hipóteses da filogenia dos Ostariophysi, e está claro que uma reconstrução filogenética é necessária (Saitoh *et al.*, 2003).

A Ordem Characiformes apresenta pelo menos 1674 espécies recentes válidas em 270 gêneros (Nelson, 2006), número este provavelmente subestimado (Vari, 1998). Tradicionalmente, o número das famílias de Characiformes varia entre 14 (Géry, 1977), 16 (Greenwood *et al.*, 1966) ou 18 (Buckup 1998, Nelson, 2006). Esta diferença se deve fundamentalmente a diferentes delimitações da família Characidae, um grupo reconhecidamente não-monofilético. Dessa forma, sub-grupos monofiléticos têm sido regularmente excluídos de Characidae e transferidos para famílias à parte, como Crenuchidae (Buckup, 1998), Cynodontidae (Lucena e Menezes, 1998) e Alestidae (Zanata e Vari, 2005), aumentando o número de famílias em Characiformes.

Os Characiformes apresentam uma grande variação na forma corporal, estrutura da mandíbula, dentição e anatomia interna (Vari, 1998). Podem ser encontradas espécies cujas formas adultas não ultrapassam 15 mm de comprimento total, as chamadas espécies miniaturas (Weitzman e Vari, 1988) até espécies com cerca de 100 cm de comprimento. Algumas delas são dominantes em termos da biomassa total de peixes em várias drenagens. Estes e outros Characiformes são elementos críticos no fluxo de energia de vários ecossistemas reciclando materiais nas terras baixas de muitos sistemas de rios (ex. Prochilodontidae – Flecker, 1996; Taylor *et al.*, 2006).

Os Characiformes habitam uma variedade de ecossistemas de rápidos rios e riachos nos pés dos Andes e outras montanhas na região Neotropical até águas lânticas das planícies de inundação das Américas e África (Buckup, 1998). Apresentam também, uma dieta diversificada, incluindo animais detritívoros (curimatídeos), passando por representantes herbívoros (*Colossoma* sp.) e espécies predadoras de nadadeiras e escamas e um notório grupo muito conhecido pelo seu hábito predatório – as piranhas (Orti

e Meyer, 1997). Algumas espécies conseguem retirar o oxigênio do ar, para isso elas apresentam adaptações morfo-fisiológicas sobrevivendo assim, em ambientes com baixas concentrações de oxigênio, por exemplo, em pequenas poças d'água (Orti e Meyer, 1997).

Dentro da ordem Characiformes estão espécies de grande importância ecológica e econômica para o Brasil. Assim, temos muitas espécies utilizadas na pesca comercial e esportiva e na aquicultura como os curimatás (Prochilodontidae), piaparas e piaus (Anostomidae), traíras (Erythrinidae), pacus, tambaquis, dourados e matrinhãs (Characidae), entre outros. Há ainda um enorme número de espécies, principalmente da família Characidae, exportadas na forma de peixes ornamentais, o que tem gerado importantes divisas para o país, embora tenha causado sérios impactos ambientais, além de servirem como indicador biológico porque esses animais vivem em igarapés, ou seja, lugares que devem manter um bom estado de conservação (Chao *et al.*, 2001).

Apesar da longa e rica história taxonômica da ordem Characiformes, relativamente pouco se sabe sobre as relações filogenéticas entre os seus grandes subgrupos, e no contexto cladística o número de estudos é ainda mais restrito (Moreira, 2007). A extrema diversidade morfológica, ou a morfologia externa pouco variável de alguns grupos (*eg. Astyanax*) foram motivos apontadas como dificuldades para a realização de estudos mais abrangentes das relações em Characiformes (Moreira, 2007).

O primeiro autor a propor que as espécies até então conhecidas de Characiformes formassem um grupo “natural” foi Müller (1842), subsequentemente reafirmado em Müller e Troschel (1982). Regan (1911) foi o primeiro que utilizou o termo Characiformes, como Divisão, reconhecendo seis famílias (Characidae, Gasteropelecidae, Xiphostomidae, Anostomidae, Hemiodontidae e Citharinidae) e definindo-as por uma série de caracteres osteológicos. Greenwood *et al.* (1966) também reafirmaram Characiformes como um grupo

“filético”, entretanto, esta condição só foi testada e corroborada por Fink e Fink (1981 e 1996), já dentro do paradigma cladística.

Eigenmann (1917) resumiu a história da sistemática dos caracídeos americanos. Posteriormente, Weitzman (1962) definiu Characinae (= Characidae) com base em um abrangente estudo osteológico, e propôs que alguns de seus subgrupos fossem elevados ao nível de família, o que foi realizado por Greenwood *et al.* (1966). A classificação proposta por Greenwood *et al.* (1966) ainda é a mais utilizada por ictiólogos que trabalham com ictiofauna neotropical (Britski, 1992), tendo Géry, em 1977, publicado um extenso trabalho onde compilou tudo que havia sido feito até então, tanto por ele como por outros autores, sobre sistemática de Characiformes.

Atualmente, as seguintes subfamílias são incluídas em Characidae: Agoniatinae, Clupeacharacinae, Iguanodectinae, Bryconinae, Serrasalminae, Aphyocharacinae, Characinae, Stethaproninae, Tetragonopterinae, Triportheinae, Rhoadsiinae, Cheirodontinae, Glandulocaudinae e Stevardiinae (Reis *et al.*, 2003; Weitzman, *et al.*, 2005; Buckup, 2007), e 88 gêneros são considerados *incertae sedis* (Lima *et al.*, 2003). É, sem dúvida, a família com os maiores problemas taxonômicos e filogenéticos dentre da ordem Characiformes. Esta problemática vem desde a origem de sua criação quando Weitzman (1962) propôs a subfamília Characinae (= Characidae) para abrigar táxons que não possuíam as sinapomorfias que definiam outros grupos inclusos na então vigente família Characidae (= parte de Characiformes).

Estudos baseados em morfologia indicam que o monofiletismo de Characidae ainda é controverso. A primeira hipótese filogenética abrangente de base cladística para os Characiformes foi apresentada por Buckup (1991) e posteriormente publicada (Buckup, 1998). Esse estudo, ainda que bastante importante deve ser visto com muita cautela, pois o autor utilizou apenas de 27 táxons em seu grupo-interno, sendo apenas sete gêneros de

Characidae. Nesse estudo nenhum representante de Gasteropelecidae ou Serrasalminidae foram incluídos, como pode ser observado na **Figura 1**.

Lucena (1993) apresenta uma hipótese de monofiletismo da família como por ser observado na **Figura 2**. Porém, estudos de Buckup (1998), Lucena e Menezes (1998) e Zanata e Vari (2005) mostraram que, tal como proposta por Lucena (1993), Characidae não era monofilética. Assim, novas famílias foram propostas dentro de Characiformes.

Malabarba & Weitzman (2003), em uma análise visando posicionar filogeneticamente seu novo gênero de Characidae, *Cyanocharax*, propuseram, com base na presença de ganchos principalmente nos raios das nadadeiras pélvicas e anal de machos adultos, um grupo monofilético de “characids” incluindo Gasteropelecidae, Roestinae, Serrasalminae, Cheirodontinae, Characinae, Stethaprioninae, Iguanodectinae, Aphyocharacinae, Rhoadsiinae, parte de Tetragonopterinae juntamente com gêneros *Incertae Sedis*, os gêneros *Salminus*, *Brycon*, *Bryconops*, *Lignobrycon*, *Triportheus* e o chamado “Clade A”. Este último definido pela presença sinapomórfica de uma nadadeira dorsal com fórmula ii, 8 raios e quatro dentes na série interna do pré-maxilar. O “Clade A” de Malabarba & Weitzman (2003) inclui, além de *Cyanocharax* e todos os Glandulocaudinae, os gêneros *Piabina*, *Creagrutus*, *Caiapobrycon*, *Boehlkea*, *Bryconacidnus*, *Ceratobranchia*, *Hemibrycon*, *Knodus*, *Microgenys*, *Montocheiroduon*, *Odontostoechus*, *Othonocheiroduon*, *Piabarchus*, *Rhinobrycon*, *Rhinopetitia*, *Attonitus* e *Hypobrycon*. A família Gasteropelecidae, cujos membros apresentam espinhos ósseos nos raios das nadadeiras e o osso supra-orbital, foi agrupada com Roestinae, *Salminus*, *Serrasalminae*, *Brycon*, *Bryconops*, *Lignobrycon* e *Triportheus* (**Figura 3**). Apesar de representar um avanço no entendimento das relações filogenéticas em Characiformes e particularmente em Characidae, o estudo foi baseado em relativamente poucos caracteres (todos observáveis sem dissecação) sendo que a maior parte dos táxons do “Clade A” é

parte de uma grande politomia não resolvida. Além disso, recentemente Vari e Ferraris (2004) relataram a presença de ganchos nas nadadeiras de membros da família africana de Characiformes Distichodontidae.

Posteriormente, Mirande (2009) analisou uma grande quantidade de gêneros e espécies de Characidae (**Figura 4**). O autor utilizou 160 espécies de Characidae e famílias relacionadas, comparando 360 caracteres morfológicos, e concluiu que a monofilia da família é suportada por sete sinapomorfias. Uma nova subfamília, Heterocharacinae, foi proposta e as subfamílias Aphyocharacinae, Aphyoditeinae, Characinae, Gymnocharacinae e Stevardiinae foram redefinidas. Mirande (2009) também propõe que Glandulocaudinae seja incluso em Stevardiinae junto com membros remanescentes do “Clado A” e os gêneros *Auxilidens* e *Nantis*. Mais recentemente, Mirande (2010) re-analisou os dados apresentados em Mirande (2009) e os resultados obtidos foram bastante similares aos anteriores, com modificações basicamente em nível de espécie (**Figuras 5a e 5b**).

Os estudos filogenéticos, utilizando dados de sequência de DNA, com representantes da ordem Characiformes tiveram início em 1996 com a publicação de um estudo sobre a filogenia das piranhas e pacus (Ortí *et al.*, 1996), sugerindo a existência de um padrão de relacionamento intergenérico ainda não conhecido para o grupo. Estudos abrangentes com representantes da ordem Characiformes foram publicados por Ortí e Meyer (1996 e 1997) e os resultados foram revistos e analisados, em conjunto, por Ortí (1997), como mostra as **Figuras 6a e 6b**. Essas filogenias resultantes desses dois trabalhos são bastante diferentes das demais propostas para a ordem Characiformes com base em caracteres morfológicos e muitos nós não são suportados por valores altos de *bootstrap*. Essas discrepâncias podem estar relacionadas ao pequeno número de grupos estudados e a pequena quantidade de dados moleculares avaliada.

Calcagnotto *et al.* (2005) estudaram 135 táxons da ordem Characiformes representando todas famílias da África e América do Sul, com exceção de Curimatidae e Gasteropelecidae, utilizando seis genes sendo dois do DNA mitocondrial (16S e citocromo B) e quatro nucleares (Rag2, Fkh, Sia e Trop). A análise de 3660 caracteres resultou em 18 árvores construídas com o método de máxima parcimônia. O uso de espécies de Siluriformes e Cypriniformes como grupos externos mostrou que a ordem Characiformes é monofilética. Os grupos africanos e sul-americanos não formaram unidades monofiléticas. Algumas das relações entre as famílias de Characiformes aparecem bem resolvidas como a monofilia de Distichodontidae e sua posição basal em relação aos demais Characiformes. A relação entre Alestidae e Characidae ficou evidente. Nesse estudo Cynodontidae e Serrasalminidae aparecem mais relacionados às famílias Parodontidae, Hemiodontidae, Anostomidae, Curimatidae, Chilodontidae e Prochilontidae. As relações entre representantes da família Characidae foram bem resolvidas, revelando como grupo monofilético, porém somente 24 gêneros foram amostrados (**Figura 7**).

Mais recentemente, Janovillo *et al.* (2010) estudaram as relações entre as subfamílias e os gêneros de *incertae sedis* (**Figura 8**). Para isso, os autores usaram os genes mitocondriais 12S, 16S e COI e o gene nuclear RAG 2 de 98 táxons terminais em suas análises. Um resultado interessante encontrado foi de 3 clados principais de Characidae, denominados de clados A, B e C. Todas as espécies incluídas no clado A corrobora a monofilia do clado A de Malabarba e Weitzman (2003). Como o resultado esperado, os representantes de *Astyanax*, *Bryconamericus*, *Hemigrammus* e *Hyphessobrycon* são poliféticos. Outros gêneros também apareceram poliféticos (*Hypobrycon*, *Cyanocharax*, *Diapoma*, *Knodus* e *Serrapinus*), porém hipóteses futuras deverão ser testadas para confirmar esse resultado.

No que diz respeito aos gêneros *incertae sedis* em Characidae, uma série de estudos tem sido feito com o intuito de verificar a validade dos gêneros e/ou suas relações dentro da família Characidae, entre eles, *Hyphessobrycon* (Weitzman e Palmer, 1997), *Roeboides* (Lucena, 1998), *Gymnocorymbus* (Benine, 2000), *Creagrutus* e *Piabina* (Vari e Harold, 2001), *Cyanocharax* + Clado A do Malabarba (Malabarba e Weitzman, 2003), *Moenkhausia* (Benine, 2004) e *Hasemanina* (Serra, 2003).

A incerteza sobre o número de espécies em Characidae é ainda acompanhada pelo nosso insatisfatório estado de conhecimento sobre as relações dentro da família. A classificação de Characidae proposta em Reis *et al.* (2003) reflete este problema. Doze das subfamílias reconhecidas nesta classificação foram reconhecidas como grupos monofiléticos: Agoniatinae, Aphyocharacinae, Bryconinae, Characinae, Cheirodontinae, Clupeocharacinae, Glandulocaudinae, Iguanodectinae, Rhoadsiinae, Serrasalminae, Stethaprioninae e Tetragonopterinae. Mas, 88 gêneros de Characidae, muitos monotípicos, mas outros altamente especiosos (*Astyanax*, *Bryconamericus*, *Creagrutus*, *Hemigrammus*, *Hyphessobrycon*, *Jupiaba* e *Moenkhausia*), foram colocados como “*Incertae sedis* em Characidae” por Lima *et al.* (2003). Dentro deste grupo estavam 620 das 952 espécies de Characidae. Esta classificação reflete a falta de informação sobre as relações entre estes gêneros e em muitos casos a ausência de evidências de monofilia dos gêneros não monotípicos.

Embora algumas das subfamílias de Characidae, tais como Serrasalminae (Machado-Allison, 1983), Glandulocaudinae (Weitzman e Menezes, 1998; Weitzman *et al.*, 2005) e Cheirodontinae (Malabarba, 1998, Mariguela, 2009), tenham sido foco de estudos recentes, as relações filogenéticas entre as subfamílias de Characidae e entre essas e os demais Characiformes permanecem desconhecidas. De acordo com Weitzman e Malabarba (1998), para que haja progresso na elucidação das inter-relações filogenéticas

dos táxons da família Characidae serão necessárias análises mais detalhadas de muitos aspectos da anatomia dessas espécies, assim como o emprego de outros tipos de dados, como moleculares, fisiológicos e comportamentais.

1.2 Considerações sobre a subfamília Bryconinae

A subfamília Bryconinae inclui 42 espécies válidas sendo que 40 pertencem ao gênero *Brycon*, uma ao gênero *Henochilus* e uma ao gênero *Chilobrycon* (Lima, 2003). Os peixes do gênero *Brycon* estão entre os mais importantes na pesca amadora e profissional de água doce da América do Sul e várias espécies estão sendo criadas em cativeiro. Reflexo de sua popularidade, as espécies do gênero *Brycon* recebem diversos nomes populares ao longo de sua distribuição: “matrinchá”, “jatuarana”, “piabanha”, “piraputunga”, “piracanjuba” e “vermelha” no Brasil, “sábalo” no Peru e Equador, “palambra” ou “bócon” na Venezuela, “yamu” na Colômbia, “pirapitá” ou “salmón-criollo” na Argentina, Paraguai e Uruguai (Lima, 2001).

O gênero *Brycon* é amplamente distribuído desde sul do México até a Argentina. Há espécies tanto transandinas, encontradas nos rios do Peru, Colômbia e do Equador quanto cisandinas encontradas nos rios das bacias da América do Sul bem como nas drenagens costeiras do Atlântico e Caribe (Lima, 2003).

Espécies de *Brycon* são peixes de médio a grande porte, com exemplares adultos variando entre 15 a 70 cm de comprimento padrão (Lima, 2001). Habitam rios e ambientes aquáticos associados, como lagos marginais e planícies de inundação, principalmente em regiões florestadas (Lima, 2001). Espécies de *Brycon* vivem geralmente em pequenos cardumes, tendo uma dieta onívora, que inclui frutos, sementes, flores, insetos, peixes e mesmo pequenos vertebrados (Saul, 1975; Goulding, 1980; Lilyestrom e Taphorn, 1983; Lima e Castro, 2000).

O gênero *Brycon* foi inicialmente descrito por Müller e Troschel (1844) e caracterizado com base na morfologia dentária, principalmente na presença de três séries de dentes no pré-maxilar. Em 1845, estes mesmos autores redescreveram o gênero, consideraram *B. falcatus* como espécie-tipo e descreveram *B. shomburgkii* (= *B. falcatus*) e *B. pesu*.

Brycon é usualmente caracterizado por uma combinação de caracteres morfológicos: principalmente pela presença de dois dentes na sínfise do dentário, três ou quatro fileiras de dentes no pré-maxilar, coracóide não alargado e pela ausência de supramaxilar (Zanata, 2000). Tais caracteres, entretanto, não são restritos a *Brycon* e são considerados plesiomórficos por alguns autores, que têm questionado o monofilestismo do gênero (Zanata, 2000).

Regan (1911) foi o primeiro a propor a hipótese de relação entre *Brycon* e *Chalceus*. Nesse mesmo estudo Regan (1911), baseado na dentição e morfologia geral, propôs também *Chalcinus* (= *Triportheus*) como relacionado à *Salminus*. Eigenmann (1912) estabeleceu a subfamília Bryconinae para os gêneros *Brycon* e *Chalceus*. Géry (1964) propôs a subfamília Chalceinae para substituir Bryconinae e redescreveu as espécies *B. brevicauda*, *B. falcatus*, *B. stubelii* e *B. matrinchao*, hoje todas essas espécies são sinônimos de *B. falcatus*. Porém, em 1972, Géry reutilizou o nome Bryconinae e subdividiu em três tribos: Bryconini, Triportheini e Salmini. Posteriormente, o gênero *Salminus* foi classificado como *incertae sedis* dentro de Characidae por Lima (2003).

Géry (1977) expressou a dificuldade em posicionar *Chalceus*, pois esse apresentaria características próximas a *Brycon* que poderia indicar a possibilidade de ambos participarem de uma linha filogenética comum. No presente estudo o gênero *Chalceus* foi considerado como grupo externo.

Roberts (1969) através de um estudo osteológico comparativo entre exemplares de *Brycon* e *Salminus* relacionou as possíveis semelhanças osteológicas entre estes dois gêneros ao fato deste último ser um caracídeo primitivo. As conclusões do autor baseiam-se principalmente em características da dentição, maxila inferior, arcos branquiais e ossos infraorbitais.

Uj (1990) sugeriu a elevação de Bryconinae à categoria de família, na qual incluiu *Brycon* e *Chalceus* juntamente com *Catabasis*, *Lignobrycon*, *Salminus*, *Triportheus*, *Chilobrycon*, *Bryconexodon*. Lucena (1993) estudou as relações filogenéticas mais recentes envolvendo *Brycon* confirmando a relação com o gênero *Chalceus*.

As relações entre parte das espécies do gênero *Brycon* foram estudadas por Zanata (2000) que estudou 144 caracteres morfológicos de 28 espécies de *Brycon* e 30 espécies de outros Characiformes com o objetivo de definir filogeneticamente o gênero *Brycon*. Os resultados obtidos por Zanata (2000) observados na **Figura 9** permitiram a autora concluir que o gênero *Brycon* é monofilético, quando se inclui nesse gênero o atual gênero *Chilobrycon*, sendo essa monofilia sustentada por sete caracteres derivados. *Brycon* aparece mais relacionado com alguns gêneros de Characidae, sendo *B. pesu* a espécie considerada a mais primitiva. Neste mesmo trabalho a autora refutou a hipótese de relacionamento entre *Salminus* e *Brycon*, sendo este último mais próximo de *Triportheus*. Um extenso trabalho de revisão taxonômica das espécies cisandinas de *Brycon* foi feito por Lima (2001), porém não foi feita nenhuma análise filogenética que sustentasse as propostas de relação sugeridas pelo autor. Lima (2006) em um estudo de revisão do gênero *Salminus* realizou uma análise filogenética e encontrou que esse gênero pode ser relacionado com *Brycon*, ainda que não diretamente (**Figura 10**).

Estudos filogenéticos realizados com sequências de DNA têm apontado para uma íntima relação entre os gêneros *Brycon* e *Salminus* (Ortí, 1997; Calcagnotto *et al.*, 2005). Castro *et al.* (2004) mostraram que *Brycon* e *Henochilus* pertenciam a um grupo monofilético. Mais recentemente um estudo molecular envolvendo a análise de sequências parciais do gene mitocondrial 16S foi realizado com 13 espécies de *Brycon* e com a espécie *H. wheatlandii* (Hilsdorf *et al.*, 2008). Nesse estudo verificou-se que *Brycon* é monofilético quando se inclui a espécie *H. wheatlandii* (**Figuras 11a e 11b**). Outro resultado interessante é a monofilia observada para as espécies cisandinas e transandinas estudadas.

Mais recentemente, dois estudos de filogenia da família Characidae foram publicados, um com dados morfológicos e o outro com dados moleculares. Mirande (2009) através de caracteres morfológicos, afirma que o grupo basal do clado Characidae inclui *Bryconops* e as subfamílias Agoniatinae, Acestrorhynchinae, Salmininae, Cynodontinae, Bryconinae, Heterocharacinae e Iguanodectinae. Esse grupo basal foi reconhecido com base na presença do osso supraorbital por outros autores (Malabarba e Weitzman, 2003).

Janovillo *et al.* (2010) utilizaram segmentos parciais dos genes 12S, 16S, COI e RAG2. Os autores confirmam a relação entre *Brycon* e *Salminus* e também o monofilestimo do clado A proposto inicialmente por Malabarba e Weitzman (2003). *Triportheus* e a família Gasteropelecidae formaram uma politomia com o clado formado por *Salminus*, *Brycon*, *Bryconops* e *Acestrorhynchus*.

O conhecimento da taxonomia das espécies do gênero *Brycon* é ainda bastante limitado. Essa situação se deve a uma combinação de fatores. A principal razão para tal situação é a má amostragem disponível nas coleções de museus até a poucos anos. As espécies do gênero são geralmente esquivas e relativamente difíceis de capturar. Sendo peixes de tamanho médio a grande, não existiam séries substanciais disponíveis nos

museus. Outro fator que contribui para a pouca representatividade de espécies do gênero em coleções é seu progressivo escasseamento em algumas regiões da América do Sul (e.g. rios do leste do Brasil), em consequência das severas modificações antropogênicas, o que naturalmente dificulta a coleta de exemplares para as coleções científicas (Lima, 2001).

1.3 Considerações sobre os genes utilizados

O estudo das relações entre organismos tem recebido, nos últimos anos, um considerável impulso com o advento das técnicas de sequenciamento de DNA. O estudo filogenético empregando sequências parciais do DNA mitocondrial em peixes é uma realidade bastante atual, o que pode ser confirmado pelo grande número de trabalhos recentemente publicados com essa abordagem (Chiacho *et al.*, 2008, Ortí *et al.*, 2008; Heckman *et al.*, 2009; Betancur, 2009; Javonillo *et al.*, 2010; entre muitos outros)

Características peculiares, como herança uniparental, geralmente materna, a ausência de recombinação e as altas taxas evolutivas, quando comparado ao genoma nuclear, fizeram do DNA mitocondrial (mtDNA) uma ferramenta importante no estudo das relações evolutivas entre indivíduos, espécies e populações (Calcagnotto, 2004).

O tamanho do genoma mitocondrial pode variar de 6 Kb (*Plasmodium falciparum*) a 20.000 Kb (*Porphyra purpurea*) e é geralmente uma molécula circular e fechada, não há presença de íntrons e alguns genes se sobrepõem (Nahum, 2004).

A taxa de substituições sinônimas (quando um nucleotídeo é substituído por outro sem causar alteração no aminoácido resultante) no genoma mitocondrial de vertebrados foi estimada em $5,7 \times 10^{-8}$ /sítio/ano (Brown *et al.*, 1982). Ainda segundo esse autor, este valor é cerca de 10 vezes maior do que o encontrado no genoma nuclear. Em relação às substituições não sinônimas (quando há alteração no aminoácido), há uma grande variação entre os 13 genes que codificam para proteínas, dependendo das restrições

funcionais, a exemplo dos genes nucleares. A alta taxa de substituição de nucleotídeos pode ser devida a uma mutação que, por sua vez, poderia estar sendo causada pelo excesso de resíduos metabólicos, ou pela ausência de um mecanismo de reparo (Li, 1997).

Pesole *et al.* (1999), analisando a variabilidade da taxa de substituição de nucleotídeos em diferentes regiões funcionais do mtDNA de mamíferos, verificaram que existe uma grande variabilidade em termos da dinâmica evolutiva da molécula. A taxa de substituição de nucleotídeos varia dependendo da região considerada. Os sítios não sinônimos, o domínio central da região controladora e os genes que codificam para tRNAs e rRNAs apresentam taxas mais baixas do que os sítios sinônimos e do que as duas regiões periféricas da região controladora (Pesole *et al.*, 1999).

Segundo Lewin (2004) há 13 genes que codificam proteínas. Ainda de acordo com esse autor, todas as proteínas fazem parte da cadeia respiratória, envolvidas na fosforilação oxidativa e transporte de elétrons. A molécula de mtDNA apresenta também 2 genes que codificam RNAs ribossômicos (rRNAs 12S e 16S), e 22 genes que codificam RNAs transportadores (tRNAs) (Brown, 1999). A presença desses genes para rRNAs e tRNAs significa que não há necessidade de importar essas organelas para a mitocôndria vindos do citoplasma (Brown, 1999).

No presente trabalho foram utilizados fragmentos de dois genes mitocondriais (16S rRNA, Citocromo b) e três genes nucleares (Myh6, RAG1 e RAG2). O uso desses genes tem sido feito com sucesso em estudos filogenéticos de diversos grupos de vertebrados como peixes (Calcagnotto *et al.*, 2005), sapos (García-París *et al.*, 2003), aves (Ericson *et al.*, 2006), cervídeos (Gilbert *et al.*, 2006), cobras (Noonam *et al.*, 2006), bovinos (Robiquet *et al.*, 2005), entre outros.

O gene 16S rRNA faz parte da grande subunidade ribossomal do mtDNA assim como o 12S rRNA (Palumbi *et al.*, 1996). As sequências desse gene são razoavelmente conservadas e evolui mais devagar do que o genoma mitocondrial como um todo (Palumbi *et al.*, 1996). Ainda segundo esse autor, existe uma considerável variação em algumas espécies, podendo ser usado para estudos em nível de população.

O gene citocromo b codifica uma proteína relacionada à cadeia de transporte de elétrons. A química e ação dessa proteína ainda não são bem conhecidas (Palumbi *et al.*, 1996). Irwin *et al.* (1990) examinaram a evolução do citocromo b em mamíferos e Martin e Palumbi (1993) compararam esses resultados da evolução dessas proteínas em tubarões. Ambos os estudos observaram que o nível de conservação variou significativamente em diferentes partes do gene citocromo b. A região final 3' do sentido da fita é mais variável, enquanto a parte codificante do gene é altamente conservado.

O gene nuclear Myh6 (*Myosin heavy chain 6*) está localizado no cromossomo 14 humano e codifica a subunidade alfa da cadeia pesada da miosina cardíaca 6. O gene está localizado 4kb aproximadamente a jusante do gene que codifica a subunidade beta da cadeia pesada de miosina cardíaca. Mutações nesse gene causam a cardiomiopatia hipertrófica familiar e defeito do septo atrial 3 (Granados-Riveron *et al.*, 2010). É um gene com aspecto conservativo.

Na literatura ainda não existe informações sobre a distribuição e localização dos genes RAG1 e RAG2 (*Recombination Activating Gene*) em cromossomos de peixes (Hashimoto *et al.*, 2009). Em humanos ambos os genes são encontrados no cromossomo 11 e, em camundongos, no cromossomo 02 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Entretanto, assim como o Myh6 os genes RAG1 e RAG2 são conservados, as sequências de DNA desses genes têm sido amplamente aplicadas a estudos filogenéticos e também na identificação de híbridos de peixes (Hashimoto *et al.*, 2009). As proteínas RAG1 e RAG2

são mediadores chaves de um processo de rearranjo gênico conhecido como recombinação V(D)J responsável pela diversidade dos receptores de antígeno no sistema adaptativo imune de vertebrados (Oettinger *et al.*, 1990).

Ainda que o número de estudos publicados que usam genes nucleares em estudos filogenéticos seja pequeno em relação ao número daqueles que utilizam genes mitocondriais, diversos trabalhos têm sido publicados nos últimos anos, mostrando a utilidade desses genes em estudos de diversos grupos de peixes (Ortí e Meyer, 1996; Ortí, 1997; Lovejoy e Collete, 2001; Lavoué *et al.*, 2003; Hardman, 2004; Near *et al.*, 2004; Moyer *et al.*, 2004; Quenouille *et al.*, 2004; Calcagnotto *et al.*, 2005; Chiachio *et al.*, 2008; Janovillo *et al.*, 2010) e espera-se que nos próximos anos muitas filogenias baseadas em genes nucleares estejam disponíveis.

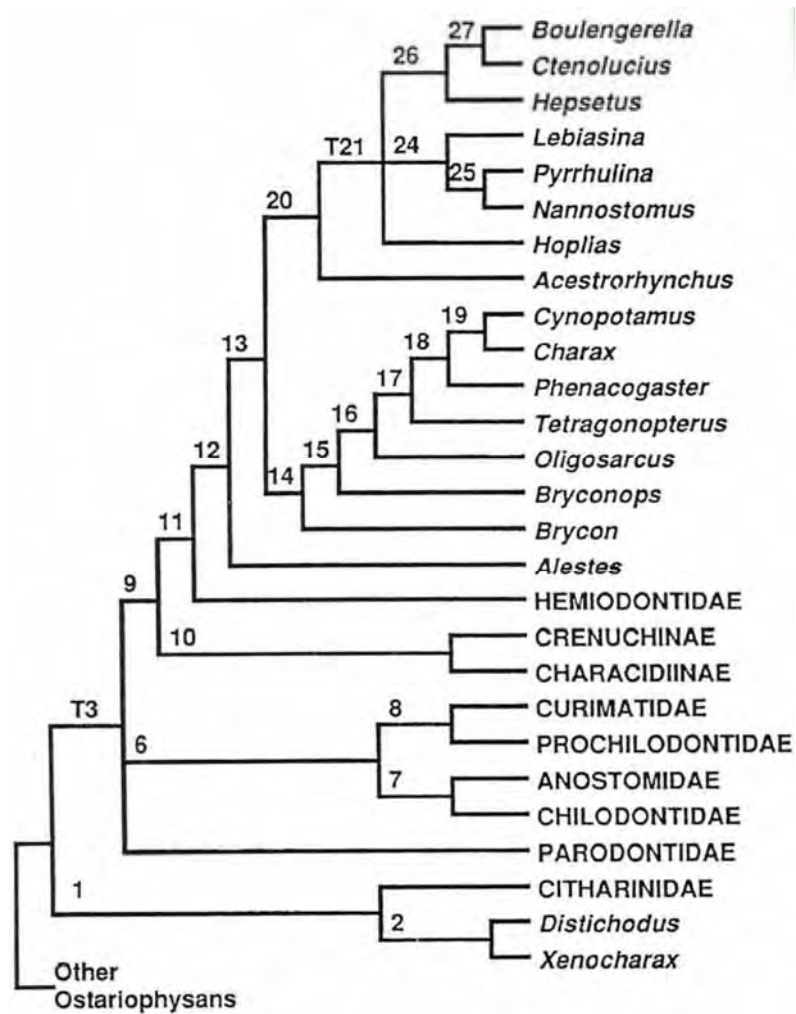


Figura 1. Hipótese de relacionamento entre as famílias de Characiformes e alguns gêneros de Characidae segundo Buckup (1998). Os números identificam os clados discutidos pelo autor da hipótese.

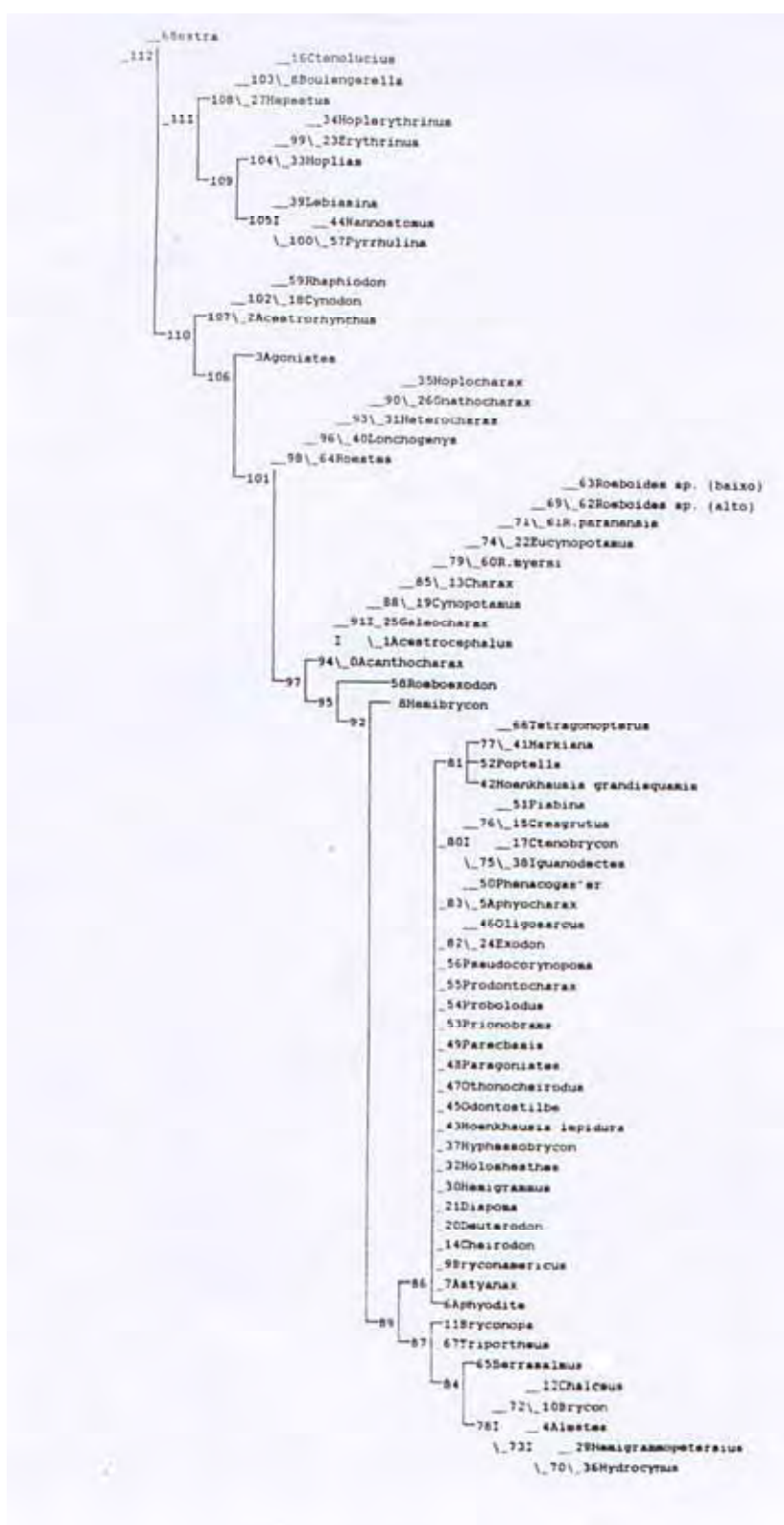


Figura 2. Hipótese sobre as relações de diversos gêneros de Characidae, segundo Lucena (1993).

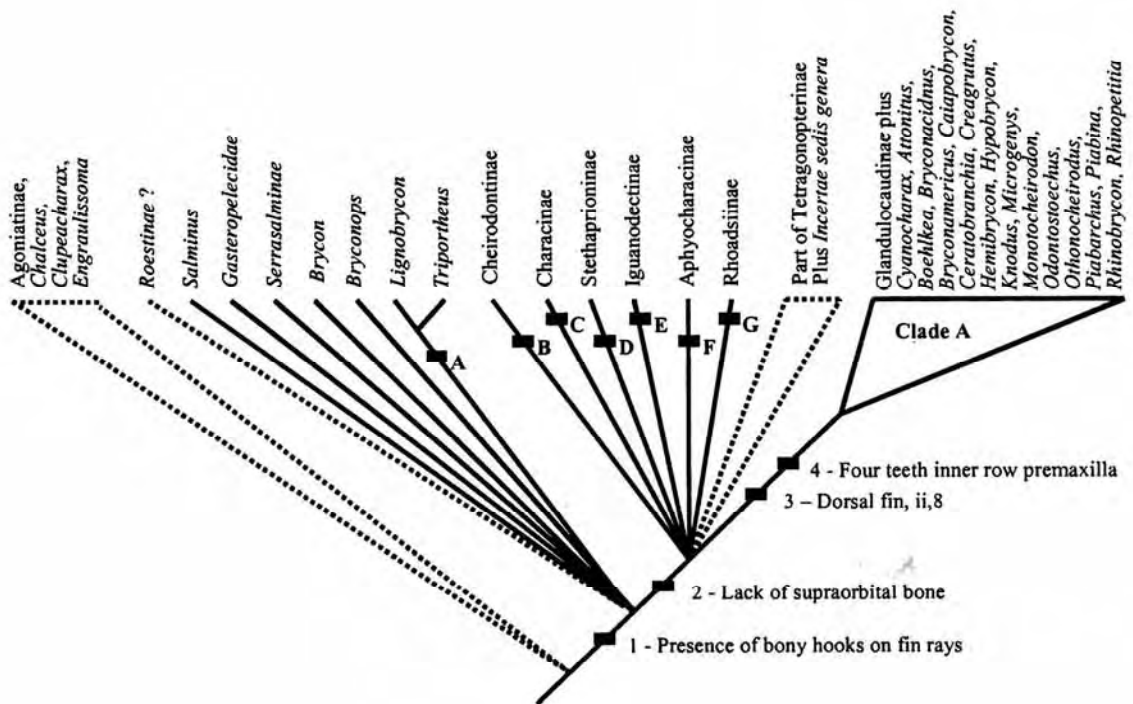


Figura 3. Cladograma resumindo o conhecimento atual sobre as relações de Characidae, Gasteropelecidae e Roestinae segundo Malabarba e Weitzman (2003).

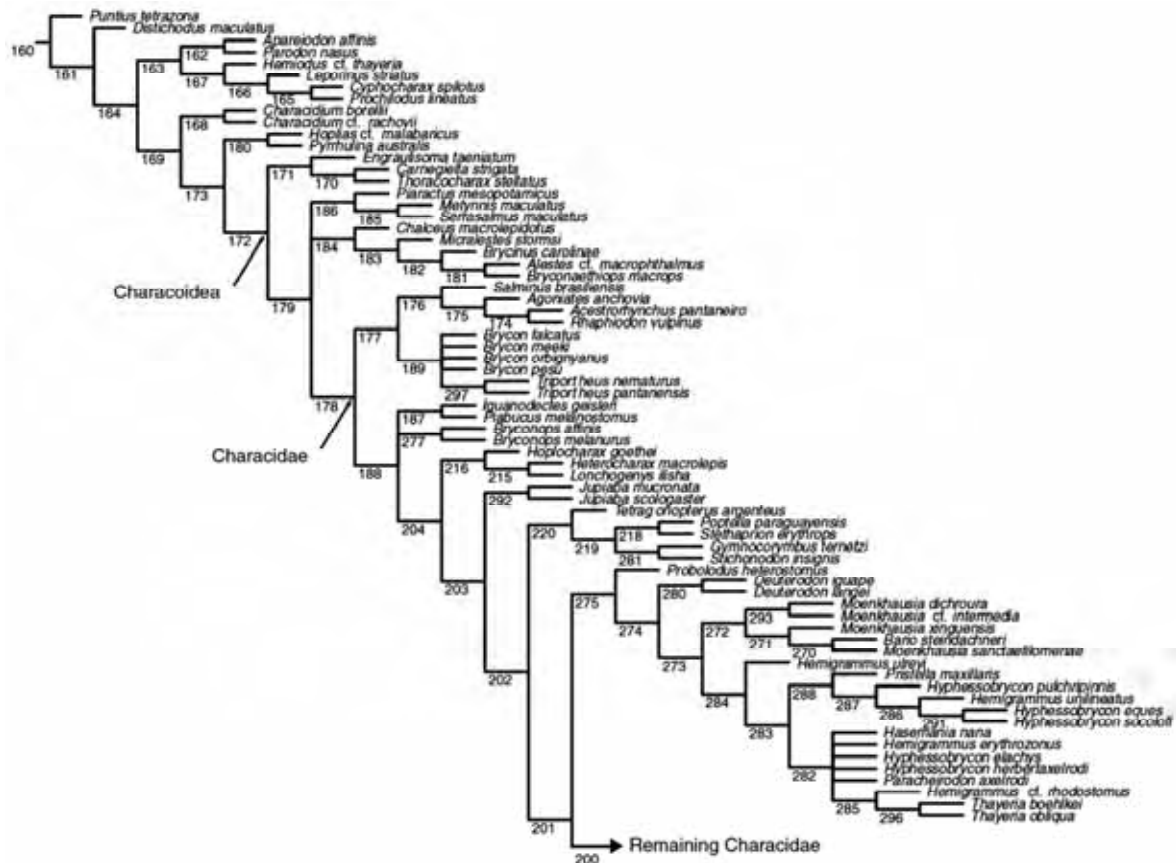


Figura 4. Hipótese final, parte 1, de Mirande (2009), mostrando o *outgroup* e os Characidae basais.

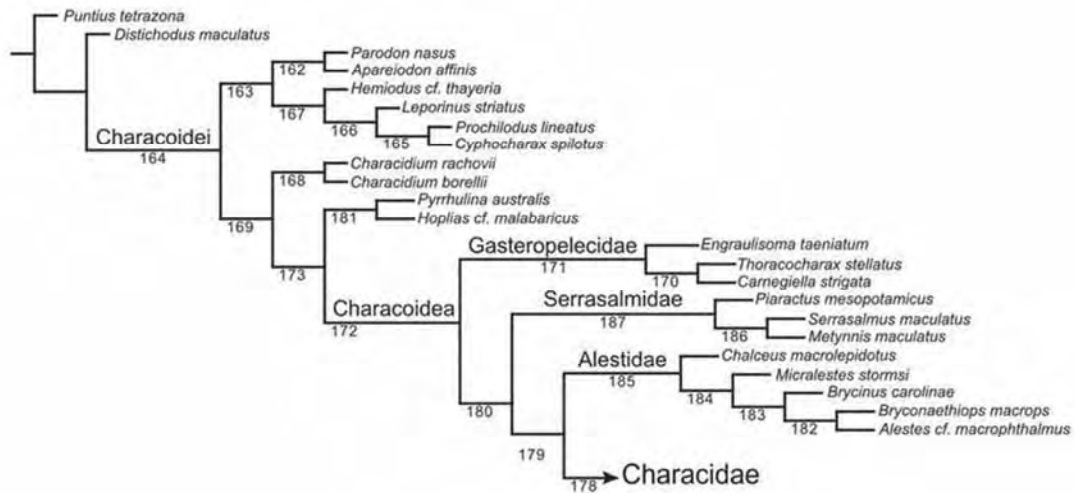


Figura 5a. Cladograma mostrando as relações de Characidae com outros Characiformes, segundo Mirande 2010.

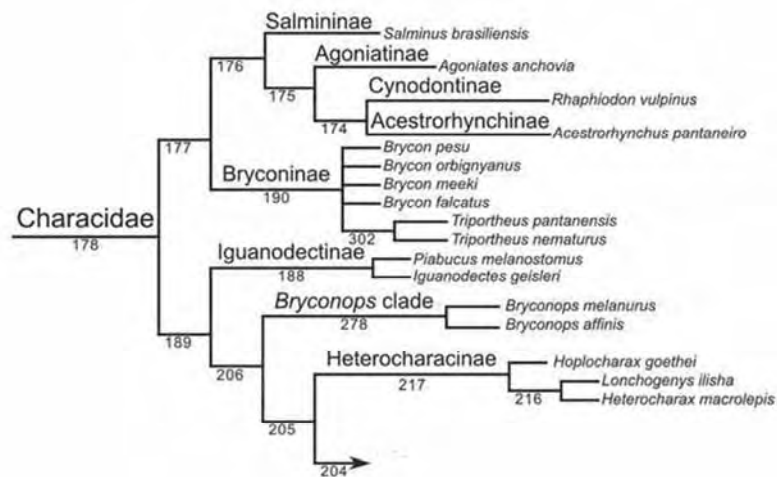


Figura 5b. Hipótese de relacionamento, segundo Mirande 2010, entre os Characidae basais.

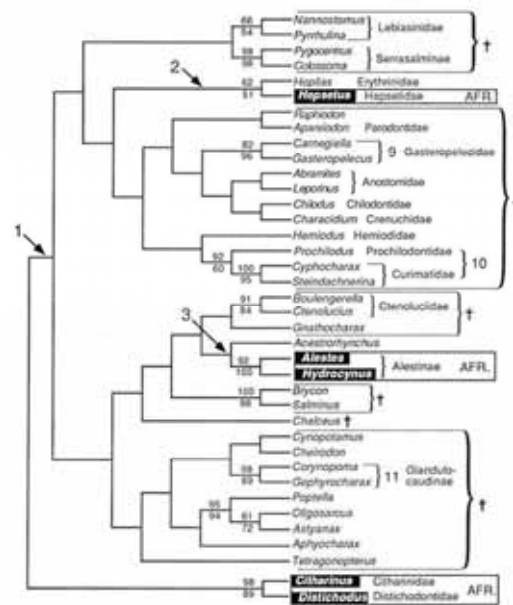


Figura 6a. Árvore de consenso obtida para 38 táxons de Characiformes utilizando sequências parciais dos genes mitocondriais 12S e 16S rRNA, segundo Ortí (1997). Os números acima e abaixo dos ramos representam os valores de *bootstrap* obtidos nas análises de máxima parcimônia e “neighbor-joining” respectivamente. Os gêneros marcados em preto representam grupos africanos.

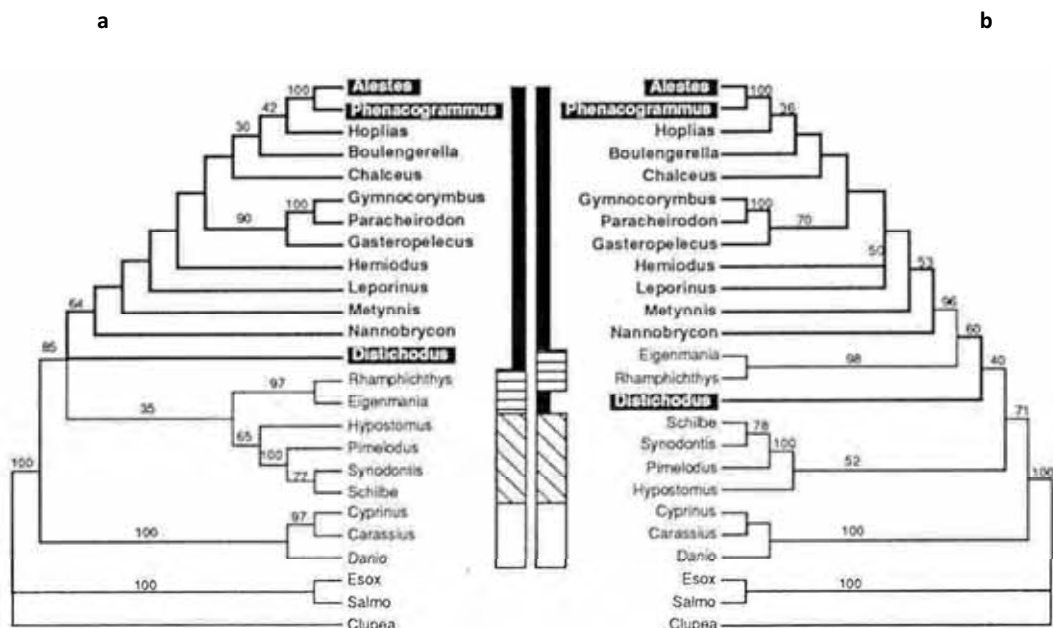


Figura 6b. Árvores de consenso obtidas para Characiformes e outros grupos externos utilizando sequências parciais do gene *ependimina*, segundo Ortí (1997). Em (a) foram utilizadas todas as posições e em (b) foram excluídas as transições nas terceiras posições dos códons. Os números acima dos ramos representam os valores de *bootstrap* obtidos nas análises de máxima parcimônia. Os gêneros marcados em preto representam grupos africanos.

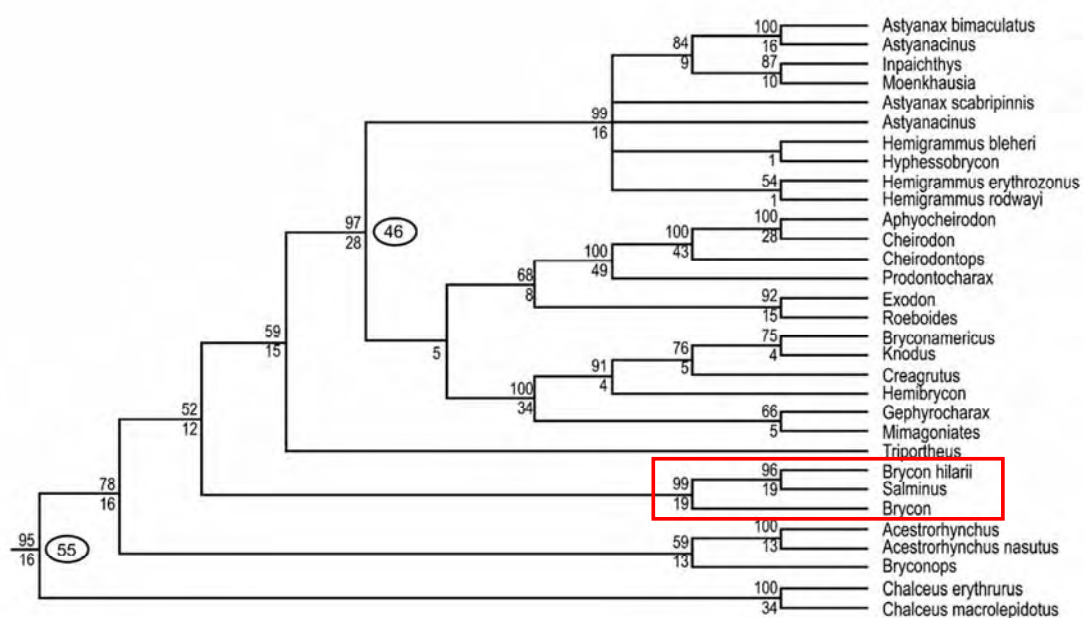


Figura 7. Árvore de consenso obtida para Characidae, segundo Calcagnotto *et al.* (2005). O quadrado indica a posição filogenética da subfamília Bryconinae.

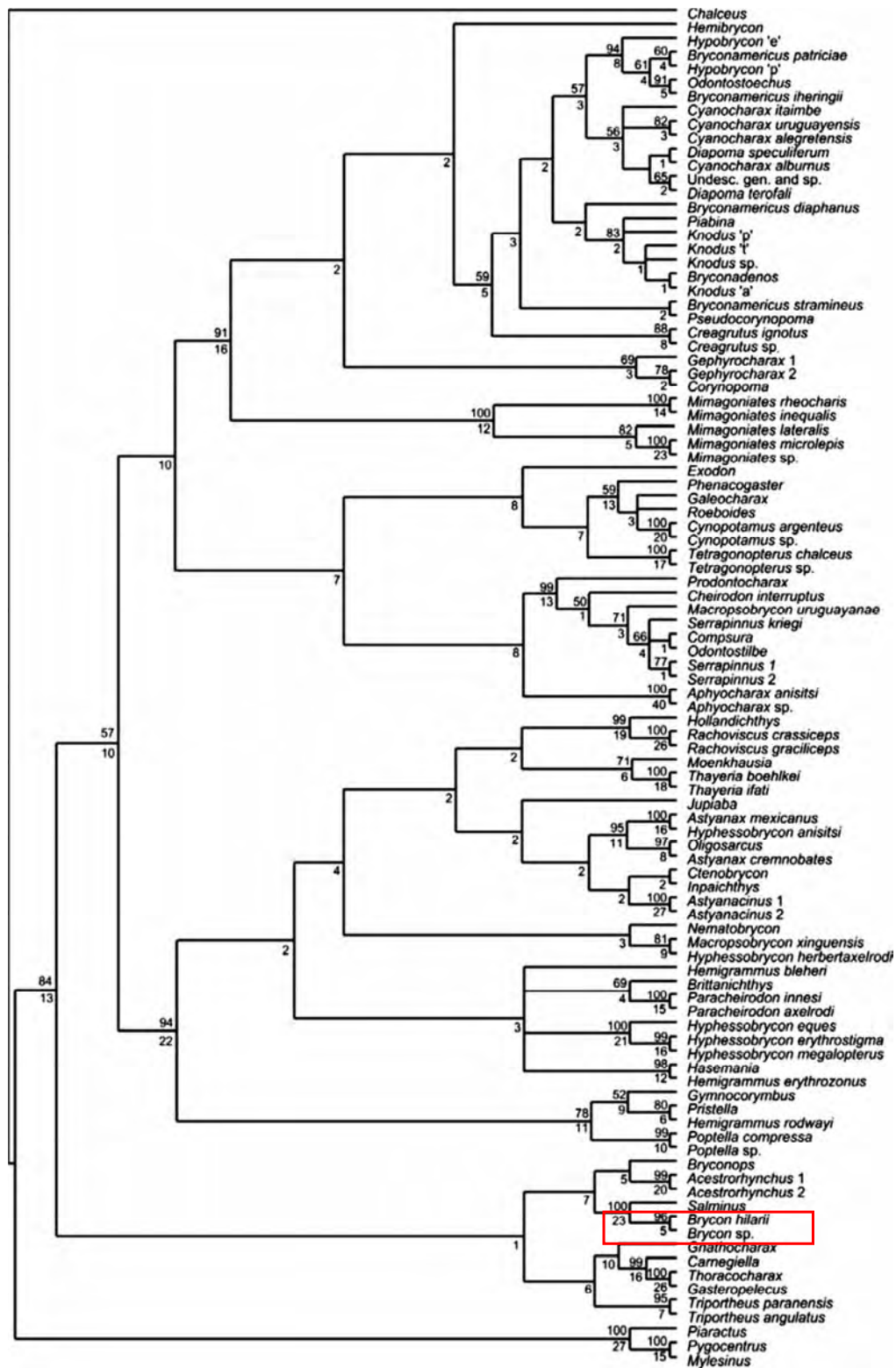


Figura 8. Árvore de consenso obtida para Characidae, segundo Javonillo *et al.* (2010). Os números acima e abaixo dos ramos representam os valores de *bootstrap* obtidos nas análises de máxima parcimônia e os índices de Bremer, respectivamente. O quadrado indica a posição de Bryconinae.

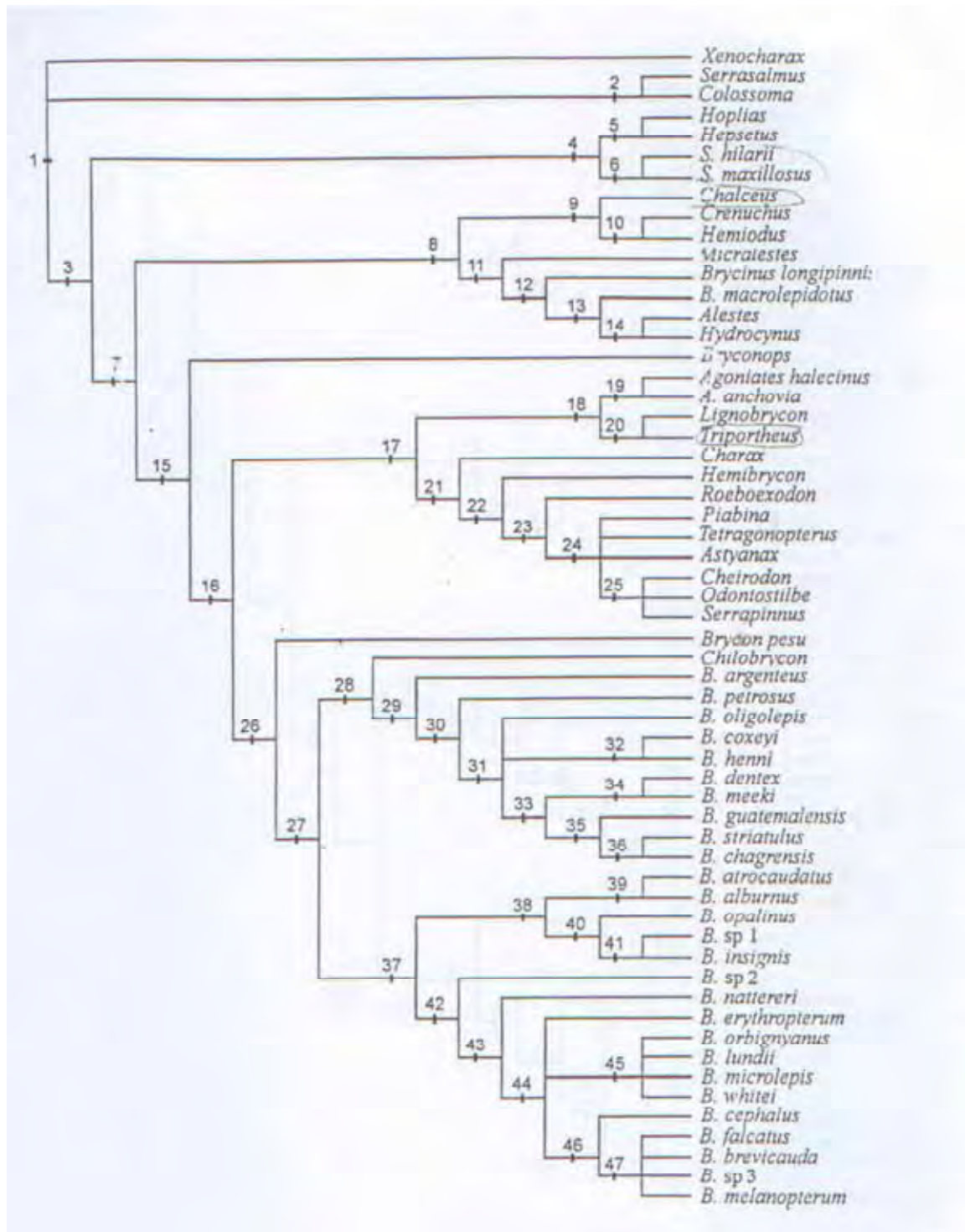


Figura 9. Árvore de consenso obtida por Zanata (2000) para Characiformes, particularmente para o gênero *Brycon*, a partir de 58 táxons e 144 caracteres (comprimento = 510 passos). Os números representam os clados identificados.

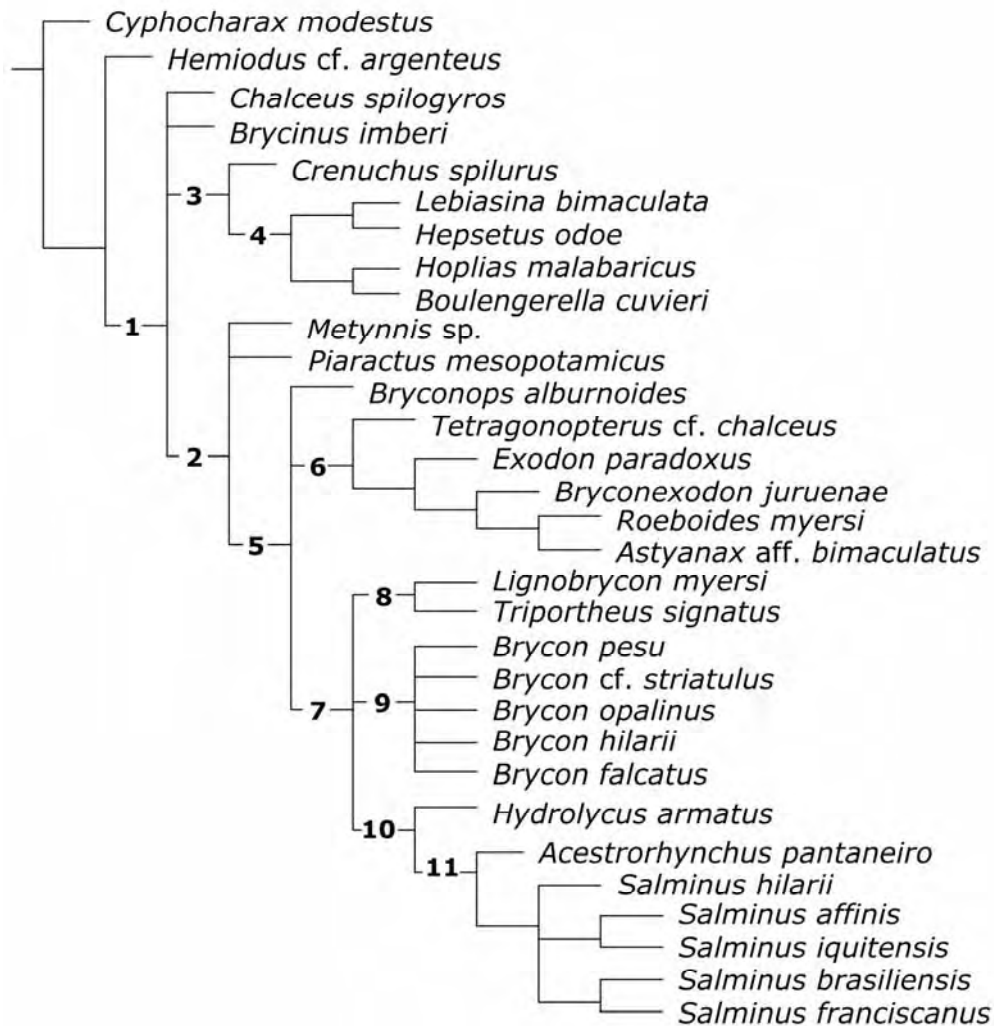


Figura 10. Árvore de consenso obtida por Lima (2006) para Characiformes, particularmente para o gênero *Salminus*, a partir de 31 táxons terminais e 69 caracteres (comprimento = 280 passos). Os números representam os clados identificados.

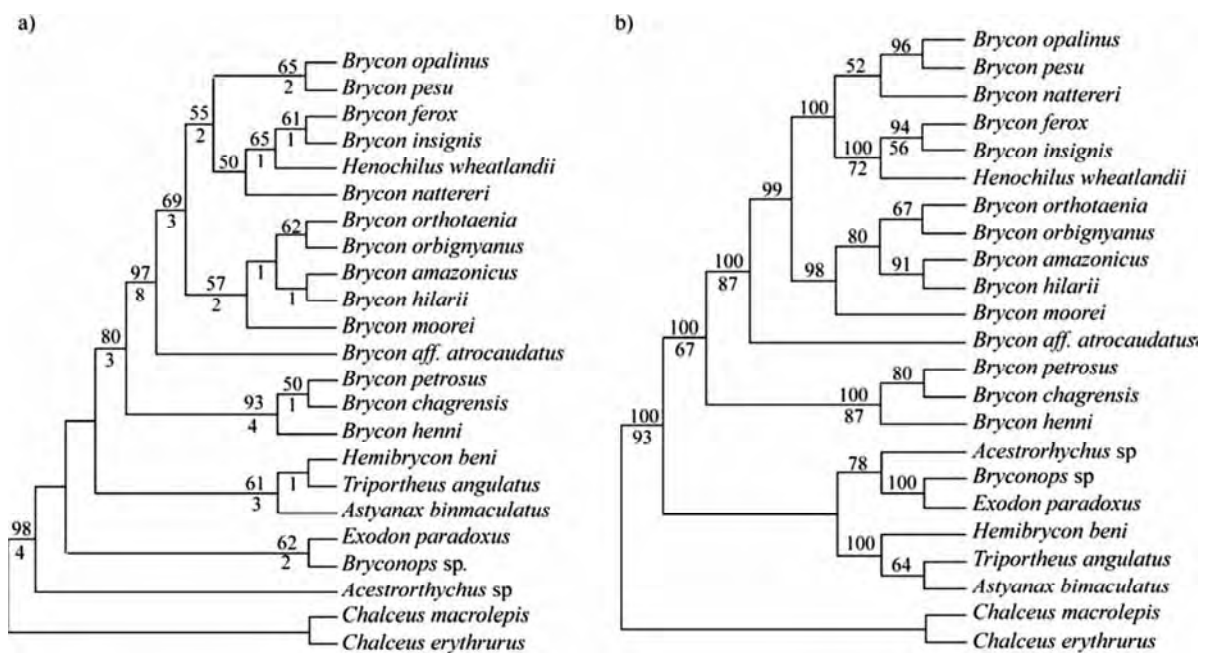


Figura 11. Árvores de consensos obtidas por Hilsdorf *et al.* (2008) mostrando as relações filogenéticas entre os gêneros *Brycon* e *Henochilus* por Máxima Parcimônia (a) e Análise Bayesiana (b).

Objetivos

2. OBJETIVOS

O presente estudo pretendeu abordar questões básicas acerca das relações entre as espécies da subfamília Bryconinae, buscando testar a hipótese de que a família Bryconinae é monofilética e composta por três gêneros, como correntemente admitido.

Objetivos operacionais:

- 1 - Sequenciar segmentos do DNA mitocondrial e nuclear de representantes de todos os gêneros de Bryconinae, incluindo o maior número possível de espécies de *Brycon*.
- 2 - Elaborar e testar hipóteses de relacionamento das espécies de Bryconinae com outros táxons de Characiformes possivelmente relacionados, principalmente *Salminus*.
- 3 - Estudar a biogeografia histórica dos táxons analisados, combinando informações sobre a distribuição de espécies modernas e fósseis com as filogenias obtidas.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

Este projeto está inserido em um amplo estudo das relações em Characidae intitulado “Relações filogenéticas em Characidae (Ostariophysi: Characiformes)”, que foi executado como um Projeto Temático (FAPESP 04/09219-6).

Como o objetivo de testar o monofiletismo das famílias de Characiformes e delimitar a família Characidae, foram também testadas hipóteses de relações de Bryconinae com todos os demais membros de Characiformes. Para tanto foram utilizados 231 espécimes, sendo o grupo externo formado por uma espécie de Cypriniformes e o grupo interno composto de 230 amostras representando todas as 18 famílias reconhecidas de characiformes (165 gêneros), todas as 14 subfamílias reconhecidas de Characidae (55 gêneros e 68 espécies) e 68 espécies representando 56 gêneros considerados *incertae sedis* em Characidae. A **Tabela 1** mostra todas as espécies e famílias analisadas nesta parte do estudo.

As coletas dos exemplares da subfamília Bryconinae foram realizadas em diversos pontos da América do Sul (Brasil, Panamá, Peru e Venezuela). Algumas amostras de DNA foram cedidas pelo prof. Dr. Alexandre Hilsdorf (Universidade de Mogi das Cruzes). Amostras de tecidos de *Brycon melanopterus* foram doadas por pesquisadores da Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (Peru), as amostras de *B. petrosus* e *B. chagrensis* foram coletadas com auxílio do *Smithsonian Tropical Research Institute*, no Panamá. Alguns exemplares de *B. vermelha*, *B. ferox*, *B. orbignyanus* e de *Salminus brasiliensis* foram doados pelo CEPTA, Pirassununga. A espécie *Salminus iquitensis* foi doada pelo Museu de Zoologia da USP (MZUSP). Os peixes foram identificados e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia de Peixes (LBP), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, SP, Brasil. A confirmação

da identificação dos animais pertencentes à subfamília Bryconinae foi feita com a ajuda do Dr. Flávio César Thadeo de Lima do Museu de Zoologia da USP (MZUSP). A **Figura 12** mostra as localidades das amostras estudadas no presente estudo.

Como apresentado anteriormente, o monofiletismo da subfamília Bryconinae ainda não foi confirmado e dúvidas a este respeito estão na literatura (Howes, 1982; Castro e Vari, 1990; Lucena, 1993). Por esta razão, para delimitação do grupo interno foram incluídos os táxons previamente considerados pertencentes à subfamília (*Brycon*, *Henochilus* e *Chilobrycon*) e relacionados a ela. A **Figura 13** mostra os três gêneros (as espécies *Chilobrycon deuterodon*, *Brycon vermelha* e *Henochilus wheatlandii*, respectivamente) da subfamília Bryconinae. Para testar a hipótese de relação entre as espécies da subfamília em estudo foram analisadas 20 espécies (37 Exemplares) do gênero *Brycon* juntamente com os gêneros *Chilobrycon* (2 exemplares) e *Henochilus* (um exemplar). Foi testada também a relação entre os gêneros *Salminus* (ver Orti e Meyer, 1997 e Malabarba, 1998) e *Chalceus* (ver Lucena 1993). A **Tabela 2** apresenta a lista dos animais analisados até o presente momento para o estudo das relações internas da subfamília Bryconinae.

Estão depositados em nossa coleção outros exemplares da subfamília Bryconinae, porém para estudos de filogenia só é necessário um representante de cada espécie, por isso que apesar termos cerca de 140 exemplares nem todos foram utilizados para o desenvolvimento desse trabalho. Nós utilizamos mais de um exemplar por espécie quando as amostras divergiam quanto à localidade de coleta.

Dos animais capturados foram retiradas amostras de tecidos, como fígado, músculo e brânquias. Os tecidos foram preservados em etanol 95%. Os exemplares foram fixados em formol 4%, conservados em álcool 70% e encontram-se depositados na coleção do

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes para identificação e realização de estudos futuros de taxonomia e sistemática.

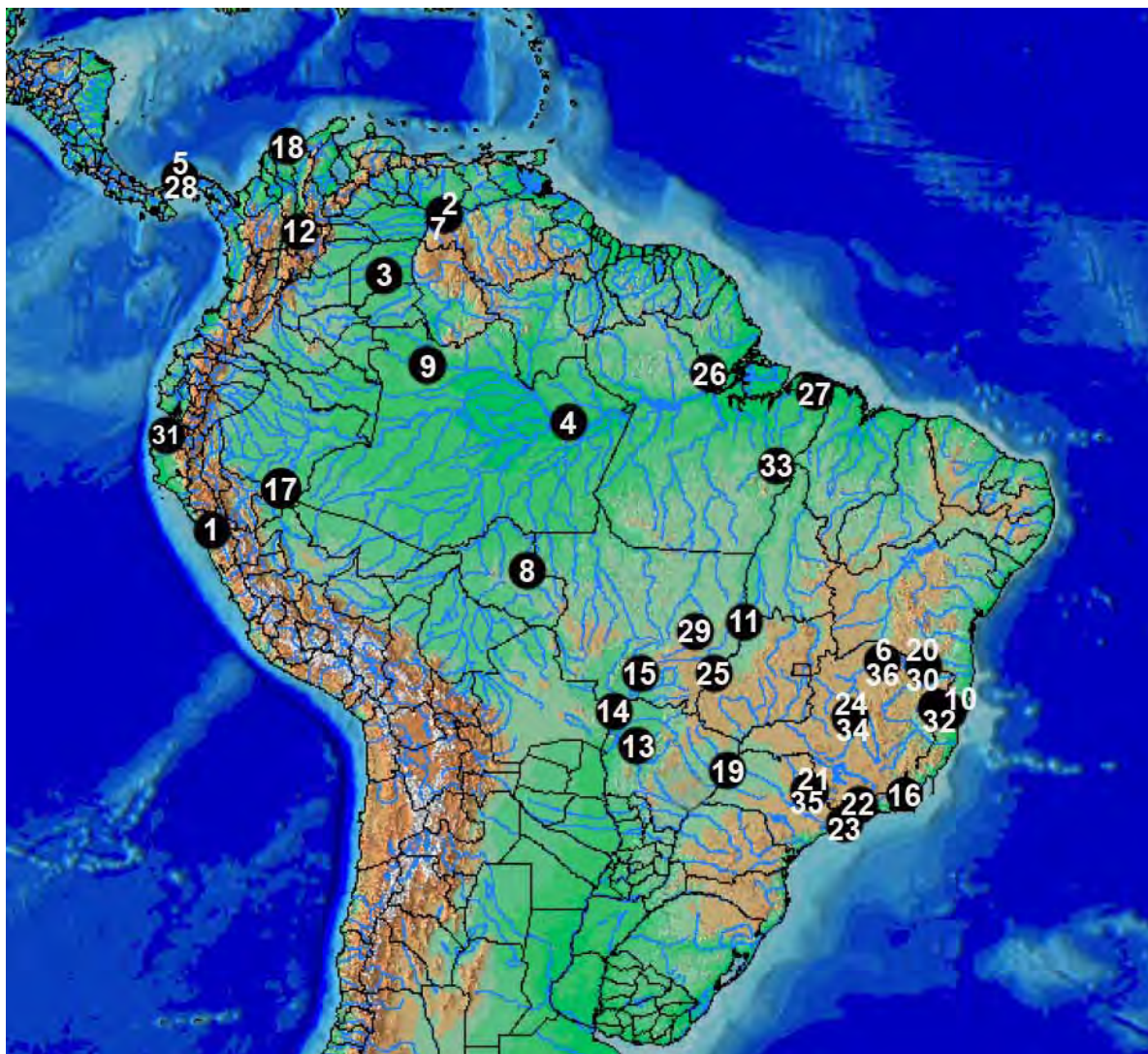


Figura 12. Região Neotropical e as localizações das espécies utilizadas no presente trabalho. As coordenadas cartesianas estão listadas na **Tabela 2**. 1. *Brycon aff atrocaudatus*; 2., 3 e 4. *Brycon amazonicus*; 5. *Brycon chagrensis*; 6. *Brycon devillei*; 7, 8 e 9. *Brycon falcatus*; 10. *Brycon ferox*; 11. *Brycon gouldingi*; 12. *Brycon henni*; 13, 14 e 15. *Brycon hilarii*; 16. *Brycon insignis*; 17. *Brycon melanopterus*; 18. *Brycon moorei*; 19 e 20. *Brycon nattereri*; 21. *Brycon orbignyanus*; 22 e 23 *Brycon opalinus*; 24. *Brycon orthotaenia*; 25, 26 e 27. *Brycon pesu*; 28. *Brycon petrosus*; 29. *Brycon* sp; 30. *Brycon vermelha*; 31. *Chilobrycon deuterodon*; 32. *Henochilus wheatlandii*; 33. *Salminus iquitensis*; 34. *Salminus franciscanus*; 35. *Salminus brasiliensis*; 36. *Salminus hilarii*.

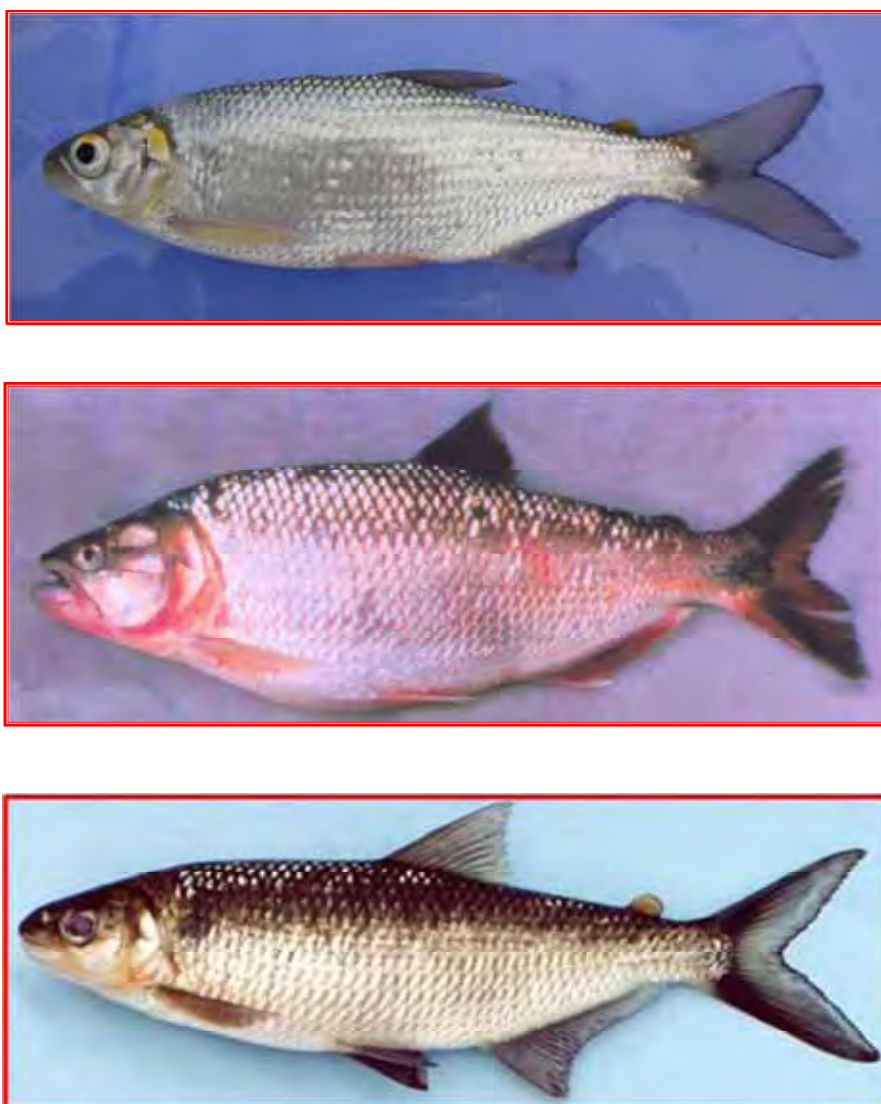


FIGURA 13. Exemplares da subfamília Bryconinae: *Chilobrycon deuterodon*, *Brycon vermelha* e *Henoichilus wheatlandii*, respectivamente. Fotos obtidas por Dr. Claudio Oliveira e as duas últimas por Dr. Ricardo Macedo Côrrea e Castro.

Tabela1. Relação dos exemplares usados para testar o monofiletismo das famílias de Characiformes, delimitar a família Characidae e testar a relação de Bryconinae com os outros táxons.

Grupo/Espécie	Voucher	Animal
Characidae/Agoniatinae		
<i>Agoniates anchovia</i>	LBP 6740	33471
<i>Agoniates halecinus</i>	LBP 5503	26594
Characidae/Aphyocharacinae		
<i>Aphyocharax alburnus</i>	LBP 1587	11774
<i>Aphyocharax anisitsi</i>	LBP 3764	22190
<i>Aphyocharax pusillus</i>	LBP 4046	22920
Characidae/Bryconinae		
<i>Brycon amazonicus</i>	LBP 2187	15565
<i>Brycon insignis</i>	LBP 2369	16075
<i>Henochilus wheatlandii</i>	LBP 1221	25846
Characidae/Characinae		
<i>Acestrocephalus sardina</i>	LBP 6876	33172
<i>Charax leticiae</i>	LBP 1480	12700
<i>Cynopotamus kincaidi</i>	LBP 3225	19449
<i>Cynopotamus venezuelae</i>	LBP 6132	29515
<i>Galeocharax knerii</i>	LBP 3496	20164
<i>Gnathocharax steindachneri</i>	LBP 4496	24494
<i>Heterocharax macrolepis</i>	LBP 4494	24485
<i>Hoplocharax goethei</i>	LBP 4495	24489
<i>Phenacogaster calverti</i>	LBP 5582	27299
<i>Roeboides guatemalensis</i>	LBP 2755	18529
Characidae/Cheirodontinae		
<i>Acinocheirodon melanogramma</i>	LBP 8104	37551
<i>Aphyocheirodon hemigrammus</i>	LBP 8306	40025
<i>Cheirodon australe</i>	LBP 3115	19803
<i>Cheirodon ibicuiensis</i>	LBP 4777	25598
<i>Compsura heterura</i>	LBP 4733	24984
<i>Heterocheirodon yatai</i>	LBP 4872	24954
<i>Kolpotocheirodon theloura</i>	LBP 5033	25982
<i>Macropsobrycon uruguayanae</i>	LBP 6039	29061
<i>Nanocheirodon insignis</i>	LBP 6104	27476
<i>Odontostilbe "britiskii"</i>	LBP 4650	22626
<i>Odontostilbe fugitiva</i>	LBP 4052	22932
<i>Prodontocharax melanotus</i>		10
<i>Pseudocheirodon arnoldi</i>		5
<i>Saccoderma melanostigma</i>	LBP 6103	27475
<i>Serrapinnus calliurus</i>	LBP 3731	22121
<i>Serrapinnus piaba</i>	LBP 8972	41813
<i>Spintherobolus ankoseion</i>	LBP 4725	24957
<i>Spintherobolus brocace</i>	LBP 3916	22558
<i>Spintherobolus leptoura</i>	LBP 7544	36098
<i>Ctenurus spilurus</i> gen. e sp. Nov.	LBP 5699	27603
Characidae/Clupeocharacinae		
<i>Clupeocharax anchoveoides</i>	LBP 5046	26012
Characidae/Glandulocaudinae		
<i>Glandulocauda melanogenys</i>	LBP 4507	24538
<i>Lophiobrycon weitzmani</i>	LBP 1225	38090
<i>Mimagoniates inequalis</i>	LBP 3383	21274
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 1225	11077
Characidae/Iguanodectinae		
<i>Iguanodectes geisleri</i>	LBP 4266	23840
<i>Piabucus melanostomus</i>	LBP 5109	26150
Characidae/Rhoadsiinae		

Grupo/Espécie	Voucher	Animal
<i>Carlana eigenmanni</i>	LBP 3300	19864
<i>Carlana eigenmanni</i>	LBP 3301	19865
Characidae/Serrasalminae		
<i>Catoprion mento</i>	LBP 7556	35624
<i>Colossoma macropomum</i>	LBP 5173	26648
<i>Metynnis mola</i>	LBP 667	8050
<i>Metynnis lippincottianus</i>	LBP 6282	29688
<i>Myloplus rubripinnis</i>	LBP 2184	15570
<i>Mylossoma duriventre</i>	LBP 1823	12921
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	LBP 4255	23803
<i>Pygocentrus cariba</i>	LBP 2229	15662
<i>Serrasalmus maculatus</i>	LBP 3698	21836
<i>Serrasalmus spilopleura</i>	LBP 3499	20169
<i>Tometes trilobatus</i>	LBP 9072	42585
Characidae/Stethaprioninae		
<i>Brachychalcinus copei</i>	LBP 192	8853
<i>Poptella paraguayensis</i>	LBP 3732	21986
<i>Stethaprion crenatum</i>	LBP 4078	22994
Characidae/Stevardiinae		
<i>Corynopoma riisei</i> ²		
<i>Gephyrocharax atracaudatus</i>	LBP 2753	18519
<i>Planaltina britskii</i>	LBP 2598	17243
<i>Pseudocorynopoma heterandria</i>	LBP 2862	18570
<i>Tyttocharax madeirae</i>	LBP 5145	33166
<i>Xenobrycon pteropus</i>	LBP 9054	42218
Characidae/Tetragonopterinae		
<i>Tetragonopterus argenteus</i>	LBP 3758	22029
<i>Tetragonopterus chalcus</i>	LBP 8268	37556
Characidae/Triportheinae		
<i>Triportheus nematurus</i>	LBP 39	3503
<i>Triportheus orinocensis</i>	LBP 2663	15580
Characidae incertae sedis		
<i>Aphyocharacidium bolivianum</i>	LBP 9055	42219
<i>Aphyodite grammica</i>	LBP 9050	42214
<i>Astyanacinus moorii</i>	LBP 5783	28195
<i>Astyanax jordani</i>	LBP 4527	24599
<i>Bario steindachneri</i>	LBP 4389	24187
<i>Bramocharax baileyi</i>	LBP 8940	42025
<i>Bramocharax caballeri</i>	LBP 8939	42022
<i>Bryconadenos tanaothoros</i> ²	MCP 40399	
<i>Bryconamericus emperador</i>	LBP 2754	18528
<i>Bryconamericus exodon</i>	LBP 7123	34200
<i>Bryconella pallidifrons</i>	LBP 4646	24696
<i>Bryconops affinis</i>	LBP 262	4168
<i>Ceratobranchia cf. delotaenia</i>	LBP 3257	20042
<i>Chalceus epakros</i>	LBP 5443	26504
<i>Chalceus erythrurus</i>	LBP 4211	22727
<i>Coptobrycon bilineatus</i>	LBP 3809	33169
<i>Creagrutus peruanus</i>	LBP 3267	20057
<i>Ctenobrycon hauxwellianus</i>	LBP 4095	23538
<i>Cyanocharax alburnus</i>	LBP 4746	25516
<i>Deuterodon iguape</i>	LBP 6827	33065
<i>Engraulisoma taeniatum</i>	LBP 4038	22896
<i>Engraulisoma taeniatum</i>	LBP 4038	22897
<i>Exodon paradoxus</i>	LBP 4006	23040
<i>Gymnocorymbus ternetzi</i>	LBP 3737	21989
<i>Hasemania nana</i> ²		

Grupo/Espécie	Voucher	Animal
<i>Hasemania</i> sp.	LBP5967	28455
<i>Hasemania crenuchoides</i> (gen nov)	LBP 7243	33196
<i>Hemibrycon taeniurus</i>	LBP 6847	33168
<i>Hemigrammus marginatus</i>	LBP 6292	29419
<i>Hemigrammus ulreyi</i>	LBP 7604	36267
<i>Hollandichthys multifasciatus</i>	LBP 698	8791
<i>Hyphessobrycon eques</i>	LBP 7615	36278
<i>Hyphessobrycon megalopterus</i>	LBP 7613	36932
<i>Hyphessobrycon reticulatus</i>	LBP 1049	8939
<i>Hypobrycon maromba</i>	LBP 6750	33174
<i>Inpaichthys kerri</i>	LBP 4526	24597
<i>Jupiaba anteroides</i>	LBP 7067	34380
<i>Jupiaba acanthogaster</i>	LBP 7935	37269
<i>Knodus meridae</i>	LBP 7569	15818
<i>Leptagoniates steindachneri</i>	LBP 4137	23661
<i>Lignobrycon myersi</i>	LBP 8094	37519
<i>Markiana nigripinnis</i>	LBP 663	8038
<i>Microchemobrycon casiquiare</i>	LBP 8161	38058
<i>Moenkhausia xinguensis</i>	LBP 6101	28443
<i>Myxiops aphos</i>	LBP 7184	33173
<i>Nematobrycon palmeri</i>	LBP 6124	33165
<i>Nematocharax venustus</i>	LBP 8106	37557
<i>Odontostoechus lethostigmus</i>	LBP 6752	33171
<i>Oligosarcus paranensis</i>	LBP 3926	22582
<i>Oligosarcus hepsetus</i>	LBP 2377	16055
<i>Paracheirodon axelrodi</i>	LBP 4472	24425
<i>Paragoniates alburnus</i>	LBP 9208	43156
<i>Parecbasis cyclolepis</i>	LBP 9053	42217
<i>Phenagoniates macrolepis</i>	LBP 6105	35623
<i>Piabarchus analis</i>	LBP 8514	38382
<i>Piabina argentea</i>	LBP 3509	21306
<i>Prionobrama paraguayensis</i>	LBP 3230	19465
<i>Prionobrama paraguayensis</i>	LBP 3230	19468
<i>Pristella maxillaris</i>	LBP 2221	15637
<i>Probolodus heterostomus</i>	LBP 6454	29141
<i>Psellogrammus kennedyi</i>	LBP 6578	31813
<i>Rachoviscus crassiceps</i>	LBP 7146	33170
<i>Roeboexodon guyanensis</i>	LBP 5315	26921
<i>Salminus brasiliensis</i>	LBP 850	9025
<i>Salminus franciscanus</i>	LBP 8090	37503
<i>Stygichthys typhlops</i>	LBP 8107	37558
<i>Thayeria obliqua</i>	LBP 5743	26891
<i>Xenagoniates bondi</i>	LBP 3074	19694
Acestrorhynchidae		
<i>Acestrorhynchus falcatus</i>	LBP 4191	23707
<i>Acestrorhynchus lacustris</i>	LBP 2158	15173
<i>Acestrorhynchus cf. nasutus</i>	LBP 7035	34110
<i>Acestrorhynchus pantaneiro</i>	LBP 3755	22014
Alestidae		
<i>Alestes</i> sp.	LBP 7530	35376
<i>Alestopetersius caudalis</i> ¹		
<i>Bathyaethiops breuseghemi</i> ¹	AMNH233422	
<i>Brycinus caroliniae</i> ¹	AMNH233628	
<i>Brycinus longipinnis</i>	LBP 7529	35375
<i>Bryconaethiops</i> sp. ¹		
<i>Hydrocynus brevis</i> ¹	AMNH22644	
<i>Ladigesia roloffi</i> ¹	AMNH233394	

Grupo/Espécie	Voucher	Animal
<i>Micralestes</i> sp.	LBP 2342	15946
<i>Phenacogrammus interruptus</i>	LBP 2637	17293
Anostomidae		
<i>Anostomus ternetzi</i>	LBP 4375	24146
<i>Leporinus fasciatus</i>	LBP 4459	24381
<i>Schizodon fasciatus</i>	LBP 3046	19130
<i>Schizodon fasciatus</i>	LBP 3994	23098
Chilodontidae		
<i>Chilodus punctatus</i>	LBP 4090	23527
<i>Caenotropus labyrinthicus</i>	LBP 1828	12912
Citharinidae		
<i>Citharinus</i> sp.	LBP 7528	35374
Crenuchidae		
<i>Characidium laterale</i>	LBP 7614	36938
<i>Characidium pterostictum</i>	LBP 2132	21388
<i>Crenuchus spilurus</i>	LBP 6907	33264
<i>Melanocharacidium</i> sp. ¹	AMNH233321	
<i>Poecilocharax weitzmani</i>	LBP 7078	40500
Ctenoluciidae		
<i>Boulengerella lateristriga</i>	LBP 7094	34623
<i>Boulengerella maculata</i>	LBP 3996	23092
<i>Boulengerella maculata</i>	LBP 4241	22733
Curimatidae		
<i>Curimatella dorsalis</i>	LBP3759	22034
<i>Cyphocharax gouldingi</i>	LBP 1537	11889
<i>Cyphocharax magdalenae</i>	LBP6109	29560
<i>Potamorhina altamazonica</i>	LBP2571	17020
<i>Steindachnerina insculpta</i>	LBP5185	26336
Cynodontidae		
<i>Cynodon gibbus</i>	LBP 1619	11672
<i>Hydrolycus scomberoides</i>	LBP 3031	19115
<i>Rhaphiodon vulpinus</i>	LBP 4064	22942
Distichodontidae		
<i>Distichodus</i> sp.	LBP 7526	35371
<i>Distichodus</i> sp.	LBP 7526	35372
<i>Hemigrammocharax multifasciatus</i> ¹	RUSI63497	
<i>Ichthyoborus</i> sp. ¹	AMNH233626	
<i>Neolebias trilineatus</i> ¹	AMNH233439	
<i>Xenocharax spilurus</i> ¹	AMNH231548	
Erythrinidae		
<i>Erythrinus erythrinus</i>	LBP 5212	26378
<i>Hoplias malabaricus</i>	LBP 5539	27219
<i>Hoplias aimara</i>	LBP 7837	36847
<i>Hoplias microlepis</i>	LBP 2763	18503
Gasteropelecidae		
<i>Carnegiella strigata</i>	LBP 4200	23798
<i>Carnegiella marthae</i>	LBP 4199	23793
<i>Thoracocharax stellatus</i>	LBP 7534	35343
Hemiodontidae		
<i>Anodus orinocensis</i>	LBP 2210	15614
<i>Argonectes robertsi</i>	LBP 1804	13167
<i>Bivibranchia velox</i>	LBP 5757	28123
<i>Hemiodus immaculatus</i>	LBP1725	12849
Hepsetidae		
<i>Hepsetus odoe</i>	LBP 7527	35373
Lebiasinidae		
<i>Copella nattereri</i>	LBP 4377	24148

Grupo/Espécie	Voucher	Animal
<i>Copella nattereri</i>	LBP 536	7140
<i>Pyrhulina australis</i>	LBP 3784	22333
<i>Pyrhulina cf. zigzag</i>	LBP 8005	37473
Parodontidae		
<i>Apareiodon affinis</i>	LBP 4591	24665
<i>Parodon nasus</i>	LBP 1135	5635
Prochilodontidae		
<i>Prochilodus reticulatus</i>	LBP 6127	29514
<i>Semaprochilodus laticeps</i>	LBP 1383	12728
Cypriniformes/Cyprinidae		
<i>Carassius auratus</i>	LBP 9215	43160

1- Calcagnotto *et al.* (2005); 2- Javonillo *et al.* (2010).

Tabela 2. Relação dos exemplares da subfamília Bryconinae e *Salminus* utilizados nas análises filogenéticas e seus respectivos dados sobre localidade de coleta.

Número do lote	Animal	Espécie	Localidade	Coordenadas	País
1356	17096	<i>Brycon aff atrocaudatus</i>	Rio Santa	S 08°40'24.0" W 78°09'16.3"	Peru
2187	15565 15567	<i>Brycon amazonicus</i>	Laguna de Castilleros	N 07°30'50.9" W 66°09'19.8"	Venezuela
2859	18988	<i>Brycon amazonicus</i>	Rio Tomo	N 4°25'27.11" W69°17'12.54"	Colômbia
834	8835	<i>Brycon amazonicus</i>	Rio Negro/AM	S 3°5' 5.21",W 59° 47' 23.73"	Brasil
2749	18510	<i>Brycon chagrensis</i>	Río Llano Sucio	N 09°19'26.2" W 79°46'08.2"	Panamá
5837	28350	<i>Brycon devillei</i>	Estação de Piscicultura da CEMIG em Machado Mineiro/MG	S 15°31'19.0" W 41°30'18.0"	Brasil
2668	15563	<i>Brycon falcatus</i>	Laguna de Castilleros	N 07°30'50.9" W 66°09'19.8"	Venezuela
5146	26278	<i>Brycon falcatus</i>	Rio Machado/RO	S 10°43'36" W 61°55'12.9"	Brasil
6878	32395	<i>Brycon falcatus</i>	Rio Negro/AM	S 00°08.156' W 67°05.057'	Brasil
8100	18979 37529	<i>Brycon ferox</i>	Rio Mucur/MGi	S 17°41'42.4' W 40°46'11.3"	Brasil
3130	19203	<i>Brycon gouldingi</i>	Lagoa da Égua/MT	S 13°20'05.1" W 50°42'16.2"	Brasil
2857	18984	<i>Brycon henni</i>	Rio Santacruz	S 6°38'21.30"W 73°39' 0.21"	Colômbia
3805	21895	<i>Brycon hilarii</i>	Rio Negro/MS	S 19°34'33.7' W 56°14'49.5"	Brasil
2766	17634	<i>Brycon hilarii</i>	Rio Cuiabá/Rio São Lourenço/MT	S 17°50'45.3" W 57°24'11.7"	Brasil
4676	24810	<i>Brycon hilarii</i>	Rio Cuiabá/MT	S 15°54'50' W 56°02'07'	Brasil
2309	16075 18977	<i>Brycon insignis</i>	Lagoa Feia/RJ	S 22°00' W 41°20'	Brasil
9778	38096 38097	<i>Brycon melanopterus</i>	Rio Amazonas	S 21°53'48.1' W 53°47'25.1"	Peru
2858	18986	<i>Brycon moorei</i>	Rio Rancheria	N 11°0' 23.57 W74°14'48.80"	Colômbia
2856	18981 18982	<i>Brycon nattereri</i>	Rio Paraná/SP	S20°55'27.90"W51°37'32.62"	Brasil
8101	37541	<i>Brycon nattereri</i>	Rio Capivari/MG	S 17°41'42.4' W 40°46'11.3"	Brasil
2746	18004	<i>Brycon orbignyanus</i>	Piscicultura/SP	S21°59'45.74"W47°25'36.57"	Brasil
6303	29001	<i>Brycon opalinus</i>	Rio Itagaçaba/SP	S 22°39'26.3" W 44°45'49.8"	Brasil

Número do lote	Animal	Espécie	Localidade	Coordenadas	País
6306	29349	<i>Brycon opalinus</i>	Rio dos Prazeres/SP	S 23°35'43.8" W 45°34'08.0"	Brasil
249	4215	<i>Brycon orthotaenia</i>	Rio São Francisco/MG	S 18°11,475' W 45°14,857'	Brasil
8111	37578 37579	<i>Brycon pesu</i>	Rio das Garças/MT	S 15°54'18.1" W 52°19'24.2"	Brasil
5320	26930	<i>Brycon pesu</i>	Rio Jari/AP	S 00°34'11" W 52°33'19"	Brasil
9409	42567	<i>Brycon pesu</i>	Rio Guamá/PA	S 01°34'00.5" W 47°09'51.4"	Brasil
2750	18504	<i>Brycon petrosus</i>	Río Llano Sucio	N 09°19'26.2" W 79°46'08.2"	Panamá
8109	37580 37581	<i>Brycon</i> sp.	Rio Culue/MT	S 13°49'00" W 53°15'008"	Brasil
8099	37528	<i>Brycon vermelha</i>	Rio Mucuri/MG	S 17°41'42.4" W 40°46'11.3"	Brasil
9334	45001 45002	<i>Chilobrycon deuterodon</i>	Rio Tumbes	S 03°48'17.9" W 80°29'52.5"	Peru
1221	25846	<i>Henochilus wheatlandii</i>	Rio Santo Antônio/MG	S17°53' 60.00" W40° 13'0.00"	Brasil
8160	38065	<i>Salminus iquitensis</i>	Rio Tapirapé	S 5° 22' 22.30"W 49° 7' 0.94"	Brasil
8090	37503	<i>Salminus franciscanus</i>	Rio São Francisco/MG	S 18°11'21.0' W 45°15'10.3"	Brasil
850	9025	<i>Salminus brasiliensis</i>	Rio Mogi-Guaçu/SP	S21°55' 37.60" W47°22'4.40"	Brasil
8114	37554	<i>Salminus hilarii</i>	Rio Verde Grande/MG	S 15°19'24.2" W 43°39'52.5"	Brasil

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Extração de DNA genômico de tecidos sólidos

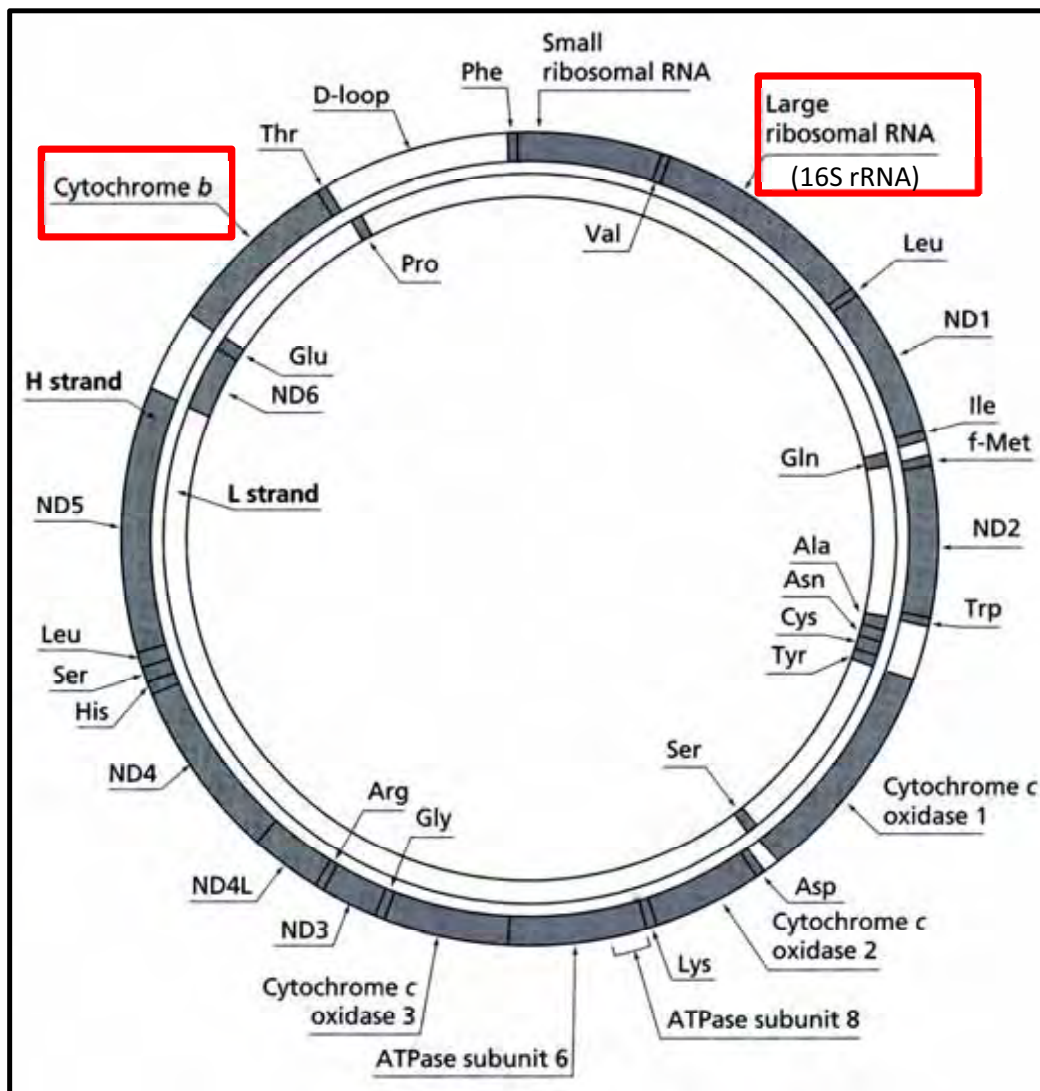
O DNA total foi extraído de tecidos preservados em etanol 95%, utilizando o Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Cat. No. 69506).

1. Cortar um pedaço do tecido de cerca de 10 a 25mg. Retirar completamente o álcool em um papel de filtro. Colocar o tecido no tubo com 180µl de *Buffer* ATL.
2. Cortar o tecido em pequenos pedaços
3. Colocar 20µl de Proteinase K (10mg/ml). Transferir os tubos para um banho-maria a 56°C até digerir todo o material (1 a 3 horas).
4. Adicionar 200µl de *Buffer* AL e 200µl de etanol 100%.
5. Retirar todo o conteúdo do *ependorf* e colocar na coluna.
6. Centrifugar por 1 minuto a 8000rpm. Descarte o tubo coletor.
7. Adicionar 500µl *Buffer* AW1 e coloque outro tubo coletor e centrifuga por 1 minuto a 8000rpm.
8. Adicionar 500µl *Buffer* AW2 e coloque outro tubo coletor e centrifuga por 3 minutos a 14.000rpm.
9. Colocar a coluna em um *ependorf* de 1,5ml e adiciona 200µl de *Buffer* AE.
10. Incubar por 1 minuto e centrifugar por 1 minuto a 8000rpm.
11. Não é necessário esperar antes de usar o DNA.

3.2.2. Reação de amplificação

Para amplificar os fragmentos de DNA de todas as espécies usadas no presente trabalho, utilizou-se a tecnologia de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A **Tabela 3** mostra todas as sequências e os *primers* usados no presente estudo.

O esquema abaixo mostra a molécula de mtDNA localizando os genes utilizados na presente análise (Citocromo b e 16S rRNA).



Para amplificar esses segmentos mitocondriais e o gene nuclear *Myh6*, o procedimento foi o seguinte:

1. Em um tubo *ependorf* preparou-se uma reação MIX, descrita na tabela abaixo. Multiplicam-se os valores de acordo com o número de reações a serem amplificadas.

Soluções	Volume
Água	18,45µl
Tampão10X	2,5µl
dNTP (2mM)	0,5µl
MgCl ₂ (25mM)	0,5µl
Taq (5U/µl)	0,05µl
L primer (5µM)	1,0µl
H primer (5µM)	1,0µl
DNA	1,0µl
Volume Final	25,0µl

2. Em um termociclador e realizou-se o seguinte programa:

Primer	Denaturação (95 °)	Ciclos	Extensão (72 °C)
16S	10 min	35X 95 °C/30s, 48 °C/45s, 72 °C/45s	7 min
Cyt b	5 min	30X 95 °C/30s, 48 °C/45s, 72 °C/90s	7 min

3. Os produtos foram aplicados em um gel de agarose 1,0%, utilizando *Blue Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia), e visualizados em um transluminador de luz ultravioleta, para verificação da qualidade e tamanho dos fragmentos amplificados. Os géis foram fotografados e digitalizados pelo programa da Kodak “*Electrophoresis Documentation and Analysis System 120*”, como pode ser observado na **Figura 14**.

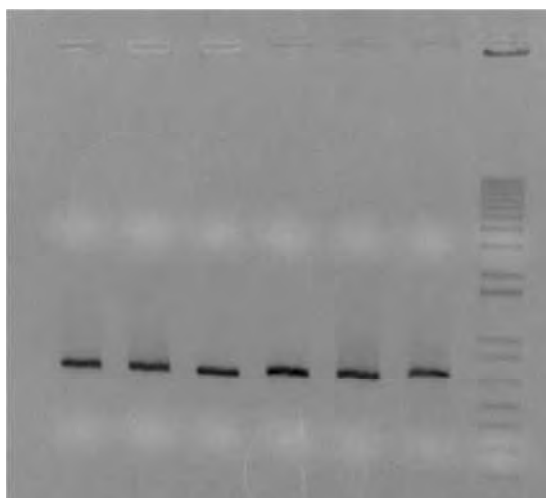


Figura 14. Gel de agarose 1% mostrando a amplificação do gene 16s rRNA do mtDNA.

Para os genes nucleares Rag1 e Rag2 foram feitas duas reações de PCR, a primeira usou-se um *primer* com aproximadamente 1200pb e a na segunda PCR um *primer* interno. Na mesma reação foram utilizadas duas temperaturas diferentes, e essas temperaturas permaneciam iguais tanto para a primeira quanto para a segunda PCR. O procedimento foi o seguinte:

1. Em um tubo *ependorf* preparou-se uma reação MIX, descrita na tabela abaixo. Multiplicam-se os valores de acordo com o número de reações a serem amplificadas.

Soluções	Volume
Água	18,3µl
Tampão10X	2,5µl
dNTP (8mM)	0,5µl
MgCl ₂ (50mM)	0,5µl
Taq (5U/µl)	0,2µl
L primer (5µM)	1,0µl
H primer (5µM)	1,0µl
DNA	1,0µl
Volume Final	25,0µl

2. Em um termociclador realizou-se o seguinte programa:

Primer	Denaturação (95 °)	Ciclos	Extensão (72 °C)
Rag1	1 min	15X 95 °C/45s, 56 °C/1min, 72 °C/60s	5 min
Myh6		15X 95 °C/30s, 54 °C/1min, 72 °C/90s	
Rag2	1 min	15X 95 °C/30s, 58 °C/45s, 72 °C/60s	5 min
		15X 95 °C/30s, 56 °C/30s, 72 °C/90s	

3. Os produtos foram aplicados em um gel de agarose 1,0%, utilizando *Blue Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia), e visualizados em um transluminador de luz ultravioleta, para verificação da qualidade e tamanho dos fragmentos amplificados. Os géis foram fotografados e digitalizados pelo programa da Kodak “*Electrophoresis Documentation and Analysis System 120*”, como pode ser observado na **Figura 15**.

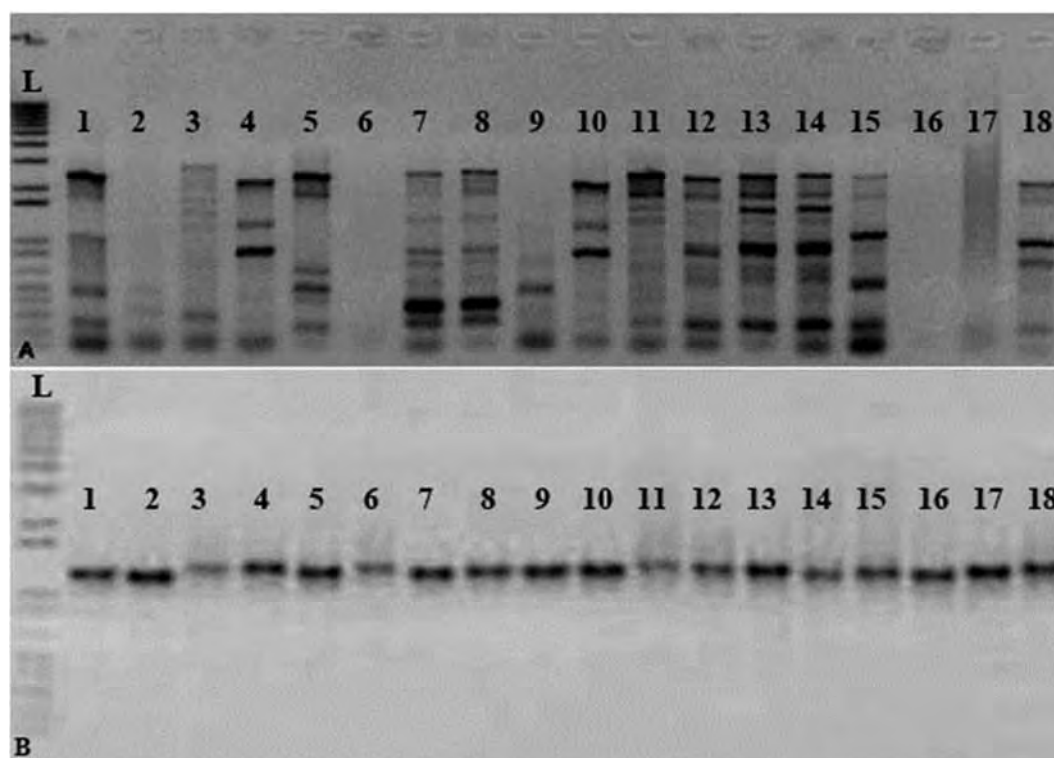


Figura 15. Gel de agarose a 1% da 1^a (A) e 2^a (B) PCR, usando o gene nuclear Rag2.

Tabela 3: Sequências dos *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos dos genes.

Gene	Sequência do <i>Primer</i> *	Referência
16S ar	ACG CCT GTT TAT CAA AAA CAT	Kocher <i>et al.</i> (1989)
16S br	CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T	Kocher <i>et al.</i> (1989)
Cyt b L 14841	CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA	Kocher <i>et al.</i> (1989)
Cyt b H15915b	AAC CTC CGA TCT TCG GAT TAC AAG AC	Kocher <i>et al.</i> (1989)
Myh6 COF2	TTGAACATCTTCTCATACAC	Novo
Myh6 COR2	TTCTCATACACTGACTTAGCCAGTGC	Novo
Rag1 2510F	TGG CCA TCC GGG TMA ACA C	Li e Orti (2007)
1°PCR 4090R	CTG AGT CCT TGT GAG CTT CAA TRA AYT T	
Rag1 2535F	AGC CAG TAC CAT AAG ATG TA	Li e Orti (2007)
2° PCR 4078R	TGA GCC TCC ATG AAC TTC TGA AGR TAY TT	
Rag2 164F	AGC TCA AGC TGC GYC CCA T	Novo
1°PCR Rag2-R6	TGR TCC ARG CAG AAG TAC TTG	Lovejoy e Collette (2001)
Rag2 176F	GYC CCA TCT CAT TCT CCA ACA	
2°PCR 1387R2	CCA TGC AYTGRG CRT GGA CC	Novo

* Sentido 5' → 3'

3.2.3. Purificação do produto da PCR

Após checagem da amplificação, o produto de PCR passou por reação de limpeza através do kit ExoSap-IT® (USB Corporation):

Em um tubo *ependorf* preparou-se uma reação contendo **5,0 µl** do DNA amplificado juntamente com **2,0 µl** da solução de ExoSap e levou-se para o termociclador para a realização do seguinte programa:

Passo	Temperatura	Tempo
1	37° C	60'
2	80 °C	15'

3.2.4. Reação de amplificação para o sequenciamento

Para a reação de PCR foi utilizado o Kit “*Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction*” (Applied Biosystems). O procedimento utilizado foi o seguinte:

1. Preparou-se uma amostra e duas réplicas para cada e para tanto, prepara-se uma solução MIX, para cada uma das amostras, contendo:

Soluções	Volume
DNA (Amplificado e limpo pela ExoSap-IT)	1,4 ou 2,8 µl
Primer (5µM)	0,7 µl
Solução BigDye (nucleotídeos marcados com fluorescência)	0,7 µl
H ₂ O Autoclavada	3,15 ou 2,8 µl
Volume Final	7,0 µl

2. Levaram-se os *eppendorfs* a um termociclador e realiza-se o seguinte programa:

Passo	Processo	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação Inicial	96° C	2'
2	Desnaturação	96 °C	30"
3	Anelamento	56 °C	15"
4	Extensão	60 °C	4'
5	Volta para o passo 2		30X
6	Armazenamento	12 °C	forever

3.2.5. Limpeza do PCR de Sequenciamento

1. Adiciona-se em cada tubo: 0.7 µl de EDTA (125mM);
2. Adiciona-se em cada tubo: 0.7 µl de Acetato de Sódio (3 M)
3. Homogeneizar e passar no *spin* brevemente;
4. Adiciona-se 17,5 µl de Etanol 100%;
5. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente;
6. Centrifuga-se por 15 min a 13000 rpm à 25 °C;
7. Descartar o Etanol em papel toalha;
8. Adiciona-se 24,5 c de Etanol 70% Gelado;
9. Centrifuga-se por 10' a 13000rpm à 25 °C;
10. Descartar o Etanol em papel toalha;

11. Repetir passo 8 a 10 (lavagem com etanol 70%);
12. Secar em termociclador por 2 minutos a 96°C sem tampa e com o termociclador aberto;
13. Guarda-se os tubos, já secos, no freezer à -20°C envolto em papel alumínio, até o momento do sequenciamento.

3.2.6. Sequenciamento de DNA

Colocar 15µl de Formamida HI-DI nas amostras para sequenciar.

1. No computador, após o reinício, executar: *Run 3130 data collection*.
2. Apertar “TRAY” para trazer para frente a bandeja de placas.
3. Trocar tampão e os dois recipientes contendo a água. Recolocar os frascos com tampão e água no sequenciador. Fechar a porta.
4. No computador abrir o ícone *Plate manager* e fazer a *sample sheet*.
5. Clicar em *Run Schedule*, selecionar a placa pendente.
6. No sequenciador, apertar o *Tray* e colocar o estojo com as amostras.
7. Fechar a porta do aparelho, esperar a luz ficar verde para mexer no computador.
8. No computador clicar no quadro amarelo que identifica o estojo.
9. Clicar no botão de “*start*”.

Sempre observar o funcionamento normal do aparelho.

3.2.7. Alinhamento e análise das sequências e análise filogenética

Para as análises das relações entre os representantes de todas as subfamílias reconhecidas para Characidae, dando um enfoque para a posição filogenética da subfamília Bryconinae e entre os gêneros e espécies de Bryconinae foram utilizados os seguintes parâmetros:

As sequências de cada gene foram independentemente alinhadas utilizando o algoritmo *Muscle* com os parâmetros padrão (Edgar, 2004) e os alinhamentos foram inspecionados e corrigidos visualmente para identificação de qualquer erro óbvio de alinhamento, usando o programa BIOEDIT (Hall, 1999). Os alinhamentos de cada gene foram analisados inicialmente pelo método de máxima verossimilhança (ML), através do programa RAxML (Stamatakis, 2006), utilizando o servidor RaxML BlackBox (Stamatakis *et al.*, 2008) para identificar possíveis erros de sequenciamento. As sequências encontradas em posição duvidosa nas árvores resultantes foram re-sequenciadas ou eliminadas das análises subsequentes.

É importante ressaltar que as correções foram as menores possíveis e realizadas apenas antes que essa matriz fosse utilizada nas análises filogenéticas. Isso para que ocorresse a menor manipulação possível garantindo assim a repetibilidade da hipótese de homologia originária do processo de alinhamento.

A variação e o padrão de substituição de nucleotídeos e a distância genética foram examinadas utilizando-se o programa MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007). Para verificar se o número de transições e de transversões atingiu o nível de saturação, isto é, se ocorreu mais do que uma substituição em determinados sítios, foi construído um gráfico onde o eixo X representa os valores das distâncias genéticas de cada par de táxons usados e o eixo Y o número de transição (TS) ou de transversão (TV) presentes em cada par. No caso de não haver saturação, a relação entre estes parâmetros é linear, isto é, com o aumento

da distância, há o aumento do número de TS ou TV. Se houver substituições múltiplas, o gráfico atinge uma situação no qual o aumento da distância genética não corresponde ao aumento no número de TS ou TV. Tal análise foi estimada pelo modelo Tamura-Nei93 com o auxílio do programa DAMBE versão 4.0.65 (Xia e Xie, 2001).

As sequências de DNA das regiões codificadoras de proteínas como citocromo b, RAG1, RAG2 e Myh6 foram alinhadas baseadas em sequências de aminoácidos, aplicando o código genético universal e mitocondrial no programa MacClade 4.0 (Maddison e Maddison 2000).

As análises de máxima parcimônia (MP) foram realizadas com o programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003). Buscas heurísticas foram realizadas com um mínimo de 100 adições ao acaso e o algoritmo *TBR*. Todos os caracteres foram considerados não ordenados, as transformações de estado foram pesadas igualmente e os ramos com comprimento máximo de zero foram colapsados. Os *gaps* foram tratados como dados perdidos, ao invés de um quinto estado, para evitar pré-suposições sobre a natureza e localização dos eventos de inserção/deleção e restrições subjetivas de mudanças de estado de caráter. O grau de robustez dos clados foi testado utilizando 1000 pseudo-réplicas pelo método de *bootstrap* (Felsenstein, 1985).

O programa RAxML (Stamatakis, 2006), utilizando o servidor Cipres (<http://www.phylo.org/>) foi utilizado para as análises de máxima verossimilhança (ML). Uma árvore aleatória foi utilizada para cada análise independente de ML e todos os demais parâmetros do programa foram utilizados na forma padrão. A robustez das topologias foi testada utilizando 1000 pseudo-réplicas pelo método de *bootstrap* (Felsenstein, 1985).

As análises filogenéticas utilizando a metodologia Bayesiana (BA) foram realizadas pelo programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) implantado no site Cipres (<http://www.phylo.org/>). Essas análises foram conduzidas, com quatro cadeias

markovianas independentes, num total de 30.000.000 de réplicas, amostrando uma árvore a cada 1.000 réplicas para cada corrida. As árvores iniciais de baixa probabilidade foram descartadas e as árvores remanescentes foram utilizadas para construir uma árvore de consenso por maioria (50%) utilizando o programa Paup*4.0b10 (Swofford, 2003).

Todas as análises seguiram as recomendações de Swofford *et al.* (1996), Nei e Kumar (2000) e Felsenstein (2004). Ao final das análises a filogenia final foi construída como método de consenso por maioria (são mostrados valores acima de 50%), conforme tem sido feito nos estudos utilizando dados moleculares. A discussão foi feita comparando todas as filogenias obtidas, tendo em vista principalmente a que foi mais bem resolvida, após a análise de todas as combinações de variáveis citadas acima.

Primeiramente todos esses parâmetros foram usados para a matriz total para sabermos que posição filogenética a subfamília Bryconinae se encontraria dentro de Characidae e qual seria o clado formado. Posteriormente, os dados contento Bryconinae + clado formado resultante dessa primeira análise geral foram re-analisados para melhor confiabilidade dos dados. Em ambas as análises foram seguidas todos os parâmetros citados acima.

Resultados

4. RESULTADOS

Aos resultados obtidos no presente trabalho foram dados dois diferentes enfoques. Primeiramente, foram analisadas as relações entre os representantes de todas as subfamílias consideradas válidas para Characidae, dando uma principal atenção à posição filogenética da subfamília Bryconinae. Após essa primeira análise, foram examinadas as relações entre os gêneros e espécies pertencentes à subfamília Bryconinae.

4.1. Análise das relações entre as subfamílias representantes de Characidae

Sequências parciais de dois genes mitocondriais (16S RNA e Citocromo b) e três genes nucleares (Myh6, Rag1 e Rag2) foram obtidas de 231 espécies, incluindo 230 Characiformes e 1 Cypriniformes (**Tabela 4**). A matriz final obtida com o conjunto dos dados apresentou 4684 pb dos quais 1721 pb são sítos conservados, 2949 pb são sítos variáveis e 2465 pb são sítos variáveis e informativos para as análises de Máxima Parcimônia. A composição média, em porcentagem, de bases foi de 24,6% de timina (T), 25,1% de citosina (C), 27,1% de adenina (A) e 23,2% de guanina (G). A distância média entre as sequências foi de $d=0,106$ segundo o modelo de Tamura - Nei (Tamura e Nei, 1993), na qual todas as posições da matriz foram analisadas. Nessa primeira análise a espécie *Carassius auratus* (Cypriniformes) foi usada para enraizar as árvores finais obtidas.

Para avaliar o grau de saturação nas substituições nucleotídicas foram produzidos gráficos com o número de transições e transversões vs. a distância genética, calculada com o modelo de Tamura-Nei93, para cada posição dos códons dos genes, no programa DAMBE versão 4.0.65 (Xia e Xie, 2001) e não foi observada saturação dos dados (**Figura 16**).

Na análise de parcimônia foram obtidos os seguintes valores: comprimento da árvore foi de 37255 passos, índice de consistência (IC) = 0.1454, índice de homoplasia (IH) = 0.8546 e índice de retenção (IR) = 0.5990. Os *gaps* foram tratados como “dados perdidos”. Foram geradas 1695 árvores igualmente parcimoniosas. Os valores de *bootstrap* foram obtidos a partir de 1000 réplicas, valores abaixo de 50% foram omitidos da filogenia.

As análises de máxima verossimilhança foram realizadas pelo programa RAxML (Stamatakis, 2006), com os dados enviados pelo site <http://www.phylo.org/>. Todos os parâmetros originais foram mantidos e o modelo de substituição usado foi o GTR, também implantado no *default* do programa. A árvore de consenso foi construída como o consenso de 1000 réplicas pelo método de *bootstrap*.

A **Figura 17** apresenta árvore consenso obtida a partir da análise de Máxima Verossimilhança com os valores *bootstrap*. Pelo grande número de táxons analisados essa figura mostra apenas a localização de Bryconinae e *Salminus* dentro de Characidae.

A análise Bayesiana foi realizada pelo programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003), com os dados enviados pelo site <http://www.phylo.org/>. As análises foram realizadas considerando todos os dados obtidos (4684pb) e considerando os *gaps* como “dados perdidos”. Ao todo foram feitas 10.000.000 de gerações e descartadas as 2.000.000 iniciais. Como na análise de verossimilhança, o modelo de substituição nucleotídica GTR foi empregado. Nessa análise, os valores de suporte para a maioria dos nós internos formam maiores que 50%.

A árvore de Máxima de Parcimônia apresentada no **Anexo 1** contém todos os táxons analisados. Os números da esquerda correspondem ao valor de *bootstrap* para 1000 réplicas na análise de MP e os números da direita representam as probabilidades obtidas a partir da análise das 10.000.000 gerações, na Análise Bayesiana.

Após todas as análises realizadas pelos três métodos filogenéticos obteve-se uma hipótese na qual diversos grupos antes considerados como membros de Characidae foram alocados em outros grupos monofiléticos e Characidae é definido como um grande grupo não monofilético. Porém, o objetivo do presente trabalho não foi analisar todas as relações encontradas, mas sim, somente localizar e discutir o posicionamento de Bryconinae dentro de Characidae.

Em todas as análises realizadas obteve-se o mesmo resultado: Bryconinae e *Salminus* é grupo-irmão do clado formado por Gasteropelecidae e pelas espécies *Triportheus nematurus*, *T. orinocensis*, *Lignobrycon myersi*, *Clupeacharax anchoveoides*, *Agoniates anchovia*, *A. halecinus* e *Engraulisoma taeniatum*.

Em MP, o gênero *Lignobrycon* está mais relacionado com *Triportheus*. Contudo, nas análises de ML e Bayesiana, *Lignobrycon* é grupo-irmão de Triportheinae, Agoniatinae, Clupeacharacinae e *Engraulisoma*. Na análise Bayesiana uma politomia entre *Agoniates* e *Clupeacharax* não esclareceu as relações entre esses gêneros. Por sua vez os resultados obtidos por ML mostraram *Clupeacharax* e *Agoniates* como grupos irmãos de *Engraulisoma*.

4.2. Análise das relações entre os gêneros e espécies pertencentes à Bryconinae

Para essa segunda análise, foram utilizadas 22 amostras de Bryconinae (20 de *Brycon*, *Henochilus* e *Chilobrycon*), quatro do gênero *Salminus*, as espécies da família Gasteropelecidae e pelos gêneros *Triportheus*, *Engraulisoma*, *Lignobrycon*, *Agoniates* e *Clupeacharax*.

Após o concatenamento de todas as sequências obtivemos uma matriz de 4673 pb, na qual 2150 sítios são conservados, 2514 variáveis e 1398 informativos para a análise de parcimônia. A proporção transição/transversão (Ti/Tv) observada foi de $R=1,2$. A

composição média, em porcentagem, de bases para este gene foi de 27,1% de adenina (A), 25,3% de citosina (C), 23,2% de guanina (G) e de 24,4% de timina (T). A **Tabela 5** mostra todas as espécies de Bryconinae e *Salminus* analisados neste estudo com os genes sequenciados.

A distância média entre as sequências foi de $d=0,1359$ segundo o modelo de distância Tamura–Nei (Nei e Kumar, 2000). Uma análise gráfica realizada através da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Tamura-Nei 93 não indicou nenhuma tendência à saturação nos genes estudados (**Figura 18**).

A análise por MP representada na **Figura 19** encontrou 4609 árvores mais parcimoniosas. A árvore final apresentou 6995 passos, $CI=0,541$, $HI=0,4959$ e $RI=0,6699$. Os *gaps* foram tratados como “dados perdidos”. Nessa análise, os valores de suporte para a maioria dos nós internos foram maiores que 50%.

O modelo de substituição nucleotídica usado na análise por MP foi calculado pelo programa Modeltest e o mais apropriado para nosso conjunto de dados foi GTR (*General Time Reversible*) +I +G, “modelo geral de tempos reversíveis” com sítios invariáveis e distribuição gama (Posada e Crandall, 1998).

As análises de máxima Verossimilhança foram realizadas pelo programa RAxML (Stamatakis, 2006), com os dados enviados pelo site <http://www.phylo.org/>. Todos os parâmetros padrão foram mantidos e o modelo de substituição usado foi o GTR implantado no *default* do programa. Os resultados das análises são apresentados na forma de uma árvore consenso das 1000 réplicas realizadas pelo método de *bootstrap* (**Figura 20**).

A análise Bayesiana foi realizada pelo programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003), com os dados enviados pelo site <http://www.phylo.org/>. As análises foram realizadas considerando todos os dados obtidos (4673 pb) e considerando os *gaps*

como “dados perdidos”. Ao todo foram feitas 30.000.000 de gerações e descartadas as 5.000.000 iniciais. Como na análise de verossimilhança, o modelo de substituição nucleotídica GTR foi empregado. Os valores de suporte para a maioria dos nós internos formam maiores que 50% e a árvore consenso obtida esta representada na **Figura 21**.

Em todas as análises realizadas os resultados obtidos foram bem semelhantes, com um bom suporte estatístico, mas em alguns nós as filogenias apresentaram diferenças.

No presente estudo foi observado um clado altamente sustentado estatisticamente, formado pelas espécies transandinas de *B. henni*, *B. chagrensis*, *B. petrosus*, *B. aff. atrocaudatus* e o gênero *Chilobrycon*. Na análise Bayesiana *B. henni* formou uma politomia com *B. pesu* e diversos outros Bryconinae.

Nas análises de MP e ML *B. henni* (Colômbia) é grupo-irmão de todos os demais transandinos analisados nesse estudo, com exceção de *B. moorei*. *B. petrosus* e *B. chagrensis* são grupo irmão das espécies peruanas. Na análise por ML o gênero *Chilobrycon* é grupo irmão de *B. henni* e *B. aff. atrocaudatus* e as espécies do Panamá são mais basais. Na análise Bayesiana, *B. aff. atrocaudatus* e *Chilobrycon deuterodon* estão mais próximos e as espécies basais são as do Panamá.

Um resultado interessante encontrado em nas nossas análises foi da espécie *B. moorei* (também transandino) próximo às espécies cisandinas: *B. orthotaenia*, *B. gouldingi*, *B. orbignyianus*, *B. hilarii* e *B. amazonicus*. Esse resultado demonstra a não monofilia dos grupos cis e transandinos e sugere uma história antiga e complexa do gênero *Brycon*. Em ML, *B. hilarii* e *B. orbignyianus* são grupo irmão de *B. amazonicus* e *B. gouldingi*. Nas análises Bayesianas e por MP, *B. hilarii* e *B. amazonicus* são grupo irmão de *B. gouldingi* e *B. orbignyianus*.

Em todas as análises *Salminus* é um grupo monofilético, porém tivemos um resultado bastante inesperado na qual esse gênero ficou dentro de Bryconinae, refutando assim, a hipótese do monofiletismo da subfamília.

Em nossas análises *B. pesu* representa o grupo-irmão das demais espécies de *Brycon* incluindo *B. moorei*. Somente na análise Bayesiana *B. pesu* e *B. henni* formaram uma politomia.

Um grupo monofilético aqui observado foi o formado pelas espécies de *Brycon* que habitam as drenagens costeiras do Brasil e por *Hemichilus*. No presente estudo, *Hemichilus* apareceu como grupo-irmão das espécies de *Brycon* dos rios costeiros da região leste do Brasil (*B. insignis*, *B. ferox*, *B. vermelha* e *B. devillei*). Esse resultado também refuta a monofilia do gênero *Brycon*. Nas análises por ML e MP, *B. ferox*, *B. vermelha* e *B. insignis* são grupo irmão de *Brycon devillei*. Por sua vez, na análise Bayesiana *B. devillei* está mais relacionada de *B. ferox* e *B. vermelha*.

B. opalinus, uma espécie endêmica dos rios da bacia do Paraíba do Sul, ficou próximo à espécie *B. nattereri*. E a espécie *B. melanopterus* é grupo-irmão das espécies de *B. falcatus* e de uma espécie não identificada, coletada na região de Paranatinga, MT

Tabela 4. Amostras sequenciadas no presente estudo com o respectivo número de Voucher.

Grupo/espécie	Voucher	Animal	16S	CytB	Myh6	Rag1	Rag2
Characidae/Agoniatinae							
<i>Agoniatas anchovia</i>	LBP 6740	33471	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Agoniatas halecinus</i>	LBP 5503	26594	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Characidae/Aphyocharacinae							
<i>Aphyocharax alburnus</i>	LBP 1587	11774	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Aphyocharax anisitsi</i>	LBP 3764	22190	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Aphyocharax pusillus</i>	LBP 4046	22920	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Characidae/Characinae							
<i>Acestrocephalus sardina</i>	LBP 6876	33172	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Charax leticiae</i>	LBP 1480	12700	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Cynopotamus kincaidi</i>	LBP 3225	19449	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Cynopotamus venezuelae</i>	LBP 6132	29515	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Galeocharax knerii</i>	LBP 3496	20164	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Gnathocharax steindachneri</i>	LBP 4496	24494	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Heterocharax macrolepis</i>	LBP 4494	24485	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Hoplocharax goethei</i>	LBP 4495	24489	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Phenacogaster calverti</i>	LBP 5582	27299	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Roeboides guatemalensis</i>	LBP 2755	18529	Ok		Ok	Ok	Ok
Characidae/Cheirodontinae							
<i>Acinocheiroidon melanogramma</i>	LBP 8104	37551	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Aphyocheiroidon hemigrammus</i>	LBP 8306	40025	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Cheirodon australe</i>	LBP 3115	19803	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Cheirodon ibicuhiensis</i>	LBP 4777	25598	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Compsura heterura</i>	LBP 4733	24984	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Heterocheiroidon yatai</i>	LBP 4872	24954	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Kolpotocheiroidon theloura</i>	LBP 5033	25982	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Macropsobrycon uruguayanae</i>	LBP 6039	29061	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Nanocheiroidon insignis</i>	LBP 6104	27476	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Odontostilbe "britiskii"</i>	LBP 4650	22626	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Odontostilbe fugitiva</i>	LBP 4052	22932	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Prodontocharax melanotus</i>	STRI	10	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Pseudocheiroidon arnoldi</i>	STRI	5	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Saccoderma melanostigma</i>	LBP 6103	27475	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Serrapinnus calliurus</i>	LBP 3731	22121	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Serrapinnus piaba</i>	LBP 8972	41813	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Spintherobolus ankoseion</i>	LBP 4725	24957	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Spintherobolus broccae</i>	LBP 3916	22558	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Spintherobolus leptoura</i>	LBP 7544	36098	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Ctenurus spilurus</i> gen. e sp. Nov.	LBP 5699	27603	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Characidae/Clupeocharacinae			Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Clupeocharax anchoveoides</i>	LBP 5046	26012	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Characidae/Glandulocaudinae			Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Glandulocauda melanogenys</i>	LBP 4507	24538	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Lophiobrycon weitzmani</i>	LBP 1225	38090	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Mimagoniates inequalis</i>	LBP 3383	21274	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Mimagoniates microlepis</i>	LBP 1225	11077	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Characidae/Iguanodectinae							
<i>Iguanodectes geisleri</i>	LBP 4266	23840	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Piabucus melanostomus</i>	LBP 5109	26150	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok

Grupo/espécie	Voucher	Animal	16S	CytB	Myh6	Rag1	Rag2
Characidae/Rhoadsiinae							
<i>Carlana eigenmanni</i>	LBP 3300	19864	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Carlana eigenmanni</i>	LBP 3301	19865	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Characidae/Serrasalminae							
<i>Catoprion mento</i>	LBP 7556	35624	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Colossoma macropomum</i>	LBP 5173	26648	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Metynnis mola</i>	LBP 667	8050	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Metynnis lippincottianus</i>	LBP 6282	29688	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Myloplus rubripinnis</i>	LBP 2184	15570	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Mylossoma duriventre</i>	LBP 1823	12921	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	LBP 4255	23803	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Pygocentrus cariba</i>	LBP 2229	15662	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Serrasalmus maculatus</i>	LBP 3698	21836	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Serrasalmus spilopleura</i>	LBP 3499	20169	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Tometes trilobatus</i>	LBP 9072	42585	Ok	Ok	Ok	-	Ok
Characidae/Stethaprioninae							
<i>Brachychalcinus copei</i>	LBP 192	8853	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Orthospinus franciscensis</i>	LBP 8105	37555	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Poptella paraguayensis</i>	LBP 3732	21986	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Stethaprion crenatum</i>	LBP 4078	22994	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Characidae/Stevardiinae							
<i>Corynopoma riisei</i> ²			Ok	-	-	-	Ok
<i>Gephyrocharax atracaudatus</i>	LBP 2753	18519	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Planaltina britskii</i>	LBP 2598	17243	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Pseudocorynopoma heterandria</i>	LBP 2862	18570	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Tytocharax madeirae</i>	LBP 5145	33166	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Xenobrycon pteropus</i>	LBP 9054	42218	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Characidae/Tetragonopterinae							
<i>Tetragonopterus argenteus</i>	LBP 3758	22029	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Tetragonopterus chalceus</i>	LBP 8268	37556	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Characidae incertae sedis							
<i>Aphyocharacidium bolivianum</i>	LBP 9055	42219	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Aphyodite grammica</i>	LBP 9050	42214	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Astyanacinus moorii</i>	LBP 5783	28195	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Astyanax aeneus</i>	LBP 8938	42019	Ok		Ok	Ok	Ok
<i>Astyanax jordani</i>	LBP 4527	24599	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Astyanax mexicanus</i>	LBP 8937	42016	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Bario steindachneri</i>	LBP 4389	24187	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Bramocharax baileyi</i>	LBP 8940	42025	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Bramocharax caballeri</i>	LBP 8939	42022	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Bryconadenos tanaothoros</i> ²	MCP 40399		Ok	-	-	-	Ok
<i>Bryconamericus emperador</i>	LBP 2754	18528	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Bryconamericus exodon</i>	LBP 7123	34200	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Bryconella pallidifrons</i>	LBP 4646	24696	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Bryconops affinis</i>	LBP 262	4168	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Ceratobranchia cf. delotaenia</i>	LBP 3257	20042	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Chalceus epakros</i>	LBP 5443	26504	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Chalceus erythrus</i>	LBP 4211	22727	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Coptobrycon bilineatus</i>	LBP 3809	33169	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Creagrutus peruanus</i>	LBP 3267	20057	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Ctenobrycon hauxwellianus</i>	LBP 4095	23538	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Cyanocharax alburnus</i>	LBP 4746	25516	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Deuterodon iguape</i>	LBP 6827	33065	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Engraulisoma taeniatum</i>	LBP 4038	22896	Ok	Ok	Ok	-	-
<i>Engraulisoma taeniatum</i>	LBP 4038	22897	Ok	Ok	Ok	-	Ok

Grupo/espécie	Voucher	Animal	16S	CytB	Myh6	Rag1	Rag2
<i>Exodon paradoxus</i>	LBP 4006	23040	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Gymnocorymbus ternetzi</i>	LBP 3737	21989	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Hasemania nana</i> ²			Ok	-	-	-	Ok
<i>Hasemania</i> sp.	LBP5967	28455	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Hasemania crenuchoides</i> (gen nov)	LBP 7243	33196	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Hemibrycon taeniurus</i>	LBP 6847	33168	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Hemigrammus marginatus</i>	LBP 6292	29419	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Hemigrammus ulreyi</i>	LBP 7604	36267	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Hollandichthys multifasciatus</i>	LBP 698	8791	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Hyphessobrycon eques</i>	LBP 7615	36278	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Hyphessobrycon megalopterus</i>	LBP 7613	36932	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Hyphessobrycon reticulatus</i>	LBP 1049	8939	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Hypobrycon maromba</i>	LBP 6750	33174	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Inpaichthys kerri</i>	LBP 4526	24597	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Jupiaba anteroides</i>	LBP 7067	34380	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Jupiaba acanthogaster</i>	LBP 7935	37269	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Knodus meridae</i>	LBP 7569	15818	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Leptagoniates steindachneri</i>	LBP 4137	23661	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Lignobrycon myersi</i>	LBP 8094	37519	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Markiana nigripinnis</i>	LBP 663	8038	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Microschemobrycon casiquiare</i>	LBP 8161	38058	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Moenkhausia xinguensis</i>	LBP 6101	28443	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Myxiops aphos</i>	LBP 7184	33173	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Nematobrycon palmeri</i>	LBP 6124	33165	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Nematocharax venustus</i>	LBP 8106	37557	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Odontostoechus lethostigmus</i>	LBP 6752	33171	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Oligosarcus paranensis</i>	LBP 3926	22582	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Oligosarcus hepsetus</i>	LBP 2377	16055	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Paracheirodon axelrodi</i>	LBP 4472	24425	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Paragoniates alburnus</i>	LBP 9208	43156	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Parecbasis cyclolepis</i>	LBP 9053	42217	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Phenagoniates macrolepis</i>	LBP 6105	35623	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Piabarchus analis</i>	LBP 8514	38382	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Piabina argentea</i>	LBP 3509	21306	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Prionobrama paraguayensis</i>	LBP 3230	19465	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Prionobrama paraguayensis</i>	LBP 3230	19468	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Pristella maxillaris</i>	LBP 2221	15637	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Probolodus heterostomus</i>	LBP 6454	29141	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Psellogrammus kennedyi</i>	LBP 6578	31813	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Rachoviscus crassiceps</i>	LBP 7146	33170	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Roeboexodon guyanensis</i>	LBP 5315	26921	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Stygichthys typhlops</i>	LBP 8107	37558	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Thayeria obliqua</i>	LBP 5743	26891	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Triportheus nematurus</i>	LBP 39	3503	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Triportheus orinocensis</i>	LBP 2663	15580	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Xenagoniates bondi</i>	LBP 3074	19694	Ok	Ok	Ok	-	Ok
Acestrotrichidae							
<i>Acestrotrichus falcatus</i>	LBP 4191	23707	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Acestrotrichus lacustris</i>	LBP 2158	15173	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Acestrotrichus cf. nasutus</i>	LBP 7035	34110	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Acestrotrichus pantaneiro</i>	LBP 3755	22014	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Alestidae							
<i>Alestes</i> sp.	LBP 7530	35376	Ok	Ok	OK	Ok	Ok
<i>Alestopetersius caudalis</i> ¹			Ok	Ok	-		OK
<i>Bathyaethiops breuseghemi</i> ⁴	AMNH233422		Ok	Ok	-		Ok

Grupo/espécie	Voucher	Animal	16S	CytB	Myh6	Rag1	Rag2
<i>Brycinus caroliniae</i> ¹	AMNH233628		Ok	Ok	-		-
<i>Brycinus longipinnis</i>	LBP 7529	35375	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Bryconaeithiops</i> sp. ¹			Ok	Ok	-		Ok
<i>Hydrocynus brevis</i> ¹	AMNH22644		Ok	Ok	-		Ok
<i>Ladigesia roloffii</i> ¹	AMNH233394		Ok	Ok	-		Ok
<i>Micralestes</i> sp.	LBP 2342	15946	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Phenacogrammus interruptus</i>	LBP 2637	17293	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Anostomidae							
<i>Anostomus ternetzi</i>	LBP 4375	24146	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Leporinus fasciatus</i>	LBP 4459	24381	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Schizodon fasciatus</i>	LBP 3046	19130	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Schizodon fasciatus</i>	LBP 3994	23098	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Chilodontidae							
<i>Chilodus punctatus</i>	LBP 4090	23527	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Caenotropus labyrinthicus</i>	LBP 1828	12912	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Caenotropus labyrinthicus</i>	LBP 9216	43161	Ok		Ok	Ok	Ok
Citharinidae							
<i>Citharinus</i> sp.	LBP 7528	35374	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Crenuchidae							
<i>Characidium laterale</i>	LBP 7614	36938	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Characidium pterostictum</i>	LBP 2132	21388	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Crenuchus spilurus</i>	LBP 6907	33264	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Melanocharacidium</i> sp. ¹	AMNH233321		Ok	Ok			Ok
<i>Poecilocharax weitzmani</i>	LBP 7078	40500	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Ctenoluciidae							
<i>Boulengerella lateristriga</i>	LBP 7094	34623	Ok	Ok	Ok	Ok	-
<i>Boulengerella maculata</i>	LBP 3996	23092	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Boulengerella maculata</i>	LBP 4241	22733	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Ctenolucius hujeta</i>	LBP 6131	29532	Ok		-	-	Ok
<i>Ctenolucius hujeta</i>	LBP 6131	29533	Ok		Ok	Ok	Ok
Curimatidae							
<i>Curimatella dorsalis</i>	LBP3759	22034	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Cyphocharax gouldingi</i>	LBP 1537	11889	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Cyphocharax magdalenae</i>	LBP6109	29560	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Potamorhina altamazonica</i>	LBP2571	17020	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Steindachnerina insculpta</i>	LBP5185	26336	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Cynodontidae							
<i>Cynodon gibbus</i>	LBP 1619	11672	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Gilbertolus maracaiboensis</i>	LBP 6107	29552	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Hydrolycus scomberoides</i>	LBP 3031	19115	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Rhaphiodon vulpinus</i>	LBP 4064	22942	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Roestes ogilviei</i>	LBP 8157	38066	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Distichodontidae							
<i>Distichodus</i> sp.	LBP 7526	35371	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Distichodus</i> sp.	LBP 7526	35372	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Hemigrammocharax multifasciatus</i> ¹	RUSI63497		Ok	Ok	-	-	Ok
<i>Ichthyborus</i> sp. ¹	AMNH233626		Ok	Ok	-	-	Ok
<i>Neolebias trilineatus</i> ¹	AMNH233439		Ok	Ok	-	-	Ok
<i>Xenocharax spilurus</i> ¹	AMNH231548		Ok	Ok	-	-	
Erythrinidae							
<i>Erythrinus erythrinus</i>	LBP 5212	26378	Ok	Ok	Ok	Ok	-
<i>Hoplerethrinus unitaeniatus</i>	LBP 8025	37723	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok

Grupo/espécie	Voucher	Animal	16S	CytB	Myh6	Rag1	Rag2
<i>Hoplias malabaricus</i>	LBP 5539	27219	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Hoplias aimara</i>	LBP 7837	36847	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Hoplias microlepis</i>	LBP 2763	18503	Ok	Ok	Ok	Ok	-
Gasteropelecidae							
<i>Carnegiella strigata</i>	LBP 4200	23798	Ok	Ok	-	Ok	Ok
<i>Carnegiella marthae</i>	LBP 4199	23793	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Gasteropelecus sternicla</i>	LBP 4070	22975	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Thoracocharax stellatus</i>	LBP 7534	35343	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Hemiodontidae							
<i>Anodus orinocensis</i>	LBP 2210	15614	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Argonectes robertsi</i>	LBP 1804	13167	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Bivibranchia velox</i>	LBP 5757	28123	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Hemiodus immaculatus</i>	LBP1725	12849	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Hepsetidae							
<i>Hepsetus odoe</i>	LBP 7527	35373	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Lebiasinidae							
<i>Copella nattereri</i>	LBP 4377	24148	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Copella nattereri</i>	LBP 536	7140	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Pyrrhulina australis</i>	LBP 3784	22333	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Pyrrhulina cf. zigzag</i>	LBP 8005	37473	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Parodontidae							
<i>Apareiodon affinis</i>	LBP 4591	24665	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Parodon nasus</i>	LBP 1135	5635	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Prochilodontidae							
<i>Prochilodus reticulatus</i>	LBP 6127	29514	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
<i>Semaprochilodus laticeps</i>	LBP 1383	12728	Ok	Ok	Ok	Ok	Ok
Cypriniformes/Cyprinidae							
<i>Carassius auratus</i>	LBP 9215	43160	Ok	Ok	Ok	-	-

1- Calcagnotto *et al.* (2005); 2- Javonillo *et al.* (2010).

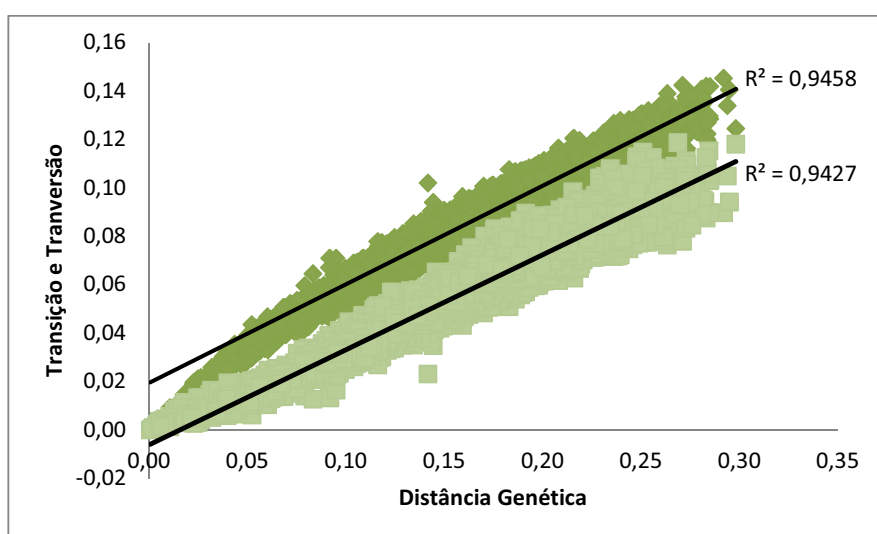


Figura 16. Gráfico da matriz de dados total, mostrando a relação entre a distância genética calculada com o modelo de Tamura-Nei93, e a frequência de transições (quadrados) e transversões (losangos).

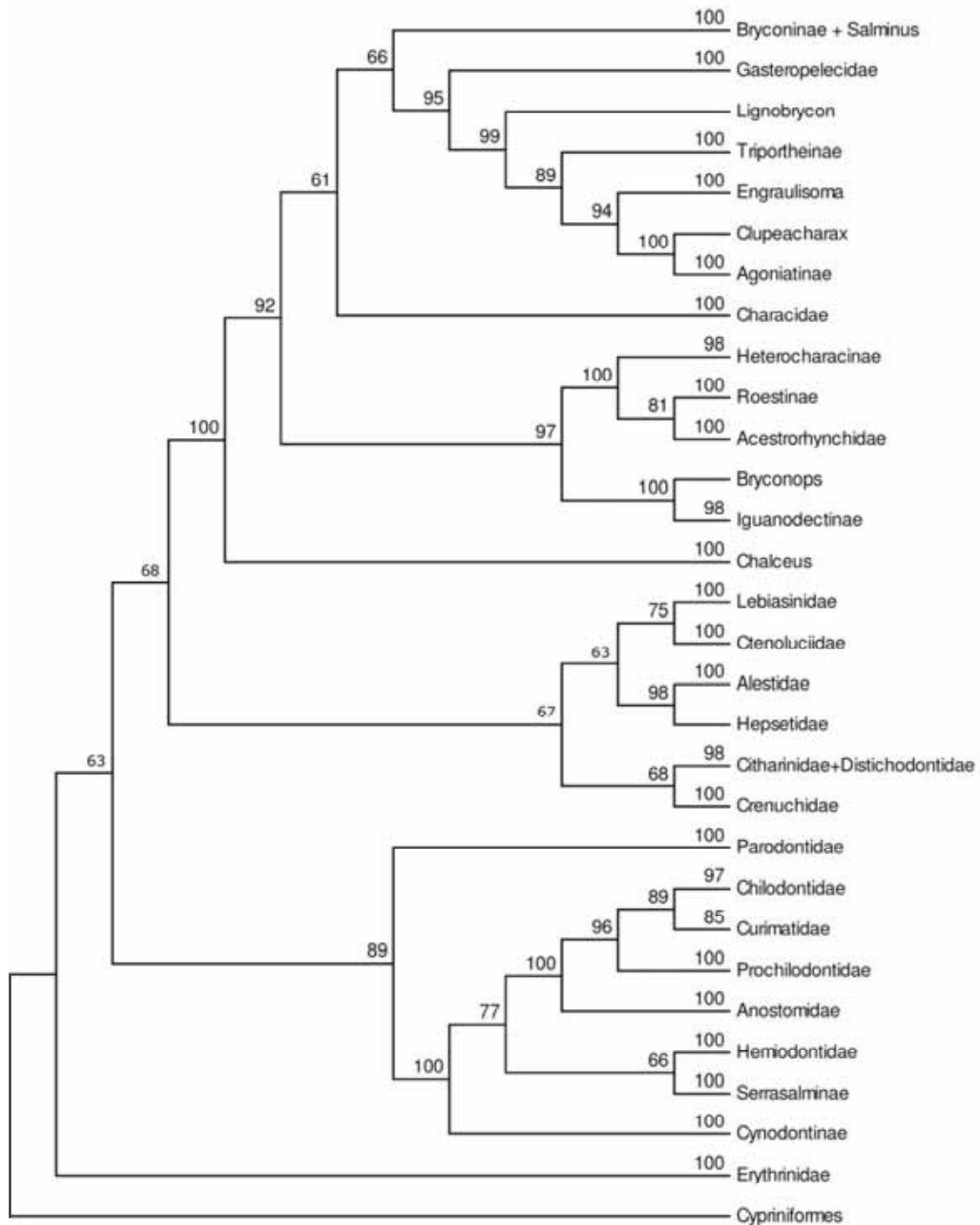


Figura 17. Árvore final construída a partir da análise de RAxML mostrando o posicionamento da subfamília Bryconinae e *Salminus* dentro de Characidae. Os números apresentados representam valores de *bootstrap* (maiores que 50%) obtidos.

Tabela 5. Amostras dos representantes da subfamília Bryconinae e de *Salminus* sequenciadas no presente estudo.

LOTE	VOUCHER	ESPÉCIE	GENES				
			GRUPO INTERNO	16S	Cyt b	Myh6	Rag1 Rag2
2187	15565	<i>Brycon amazonicus</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
	15567	<i>Brycon amazonicus</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
834	8835	<i>Brycon amazonicus</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
2859	18988	<i>Brycon amazonicus</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
1356	17096	<i>Brycon aff. atrocaudatus</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
2749	18510	<i>Brycon chagrensis</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
5837	28350	<i>Brycon devillei</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
2668	15563	<i>Brycon falcatus</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
6878	32395	<i>Brycon falcatus</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
5246	26278	<i>Brycon falcatus</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
	37529			Ok	Ok	Ok	Ok
8100	18979	<i>Brycon ferox</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
3130	19203	<i>Brycon gouldingi</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
2857	18984	<i>Brycon henni</i>		Ok		Ok	Ok
2766	17634	<i>Brycon hilarii</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
3805	21895	<i>Brycon hilarii</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
4676	24810	<i>Brycon hilarii</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
2369	16075	<i>Brycon insignis</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
	38096			Ok	Ok	Ok	Ok
2854	38097	<i>Brycon melanopterus</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
2858	18986	<i>Brycon moorei</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
	18981			Ok	Ok		Ok
2856	18982	<i>Brycon nattereri</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
	37541			Ok	Ok	Ok	Ok
8101	37541	<i>Brycon nattereri</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
6303	29001	<i>Brycon opalinus</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
6306	29349	<i>Brycon opalinus</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
2746	18004	<i>Brycon orbignyanus</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
249	4215	<i>Brycon orthotaenia</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
5320	26930	<i>Brycon pesu</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
	37578			Ok	Ok	Ok	Ok
8111	37579	<i>Brycon pesu</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
9409	42567	<i>Brycon pesu</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
2750	18504	<i>Brycon petrosus</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
	37580			Ok	Ok	Ok	Ok
8109	37581	<i>Brycon sp.</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
8099	37528	<i>Brycon vermelha</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
	45001			Ok	Ok	Ok	Ok
9334	45002	<i>Chilobrycon deuterodon</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
1221	25846	<i>Henochilus wheatlandii</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
Salminus							
850	9025	<i>Salminus brasiliensis</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
8114	37554	<i>Salminus hilarii</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
84	7615	<i>Salminus hilarii</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
8160	38065	<i>Salminus iquitensis</i>		Ok	Ok	Ok	Ok
8090	37503	<i>Salminus franciscanus</i>		Ok	Ok	Ok	Ok

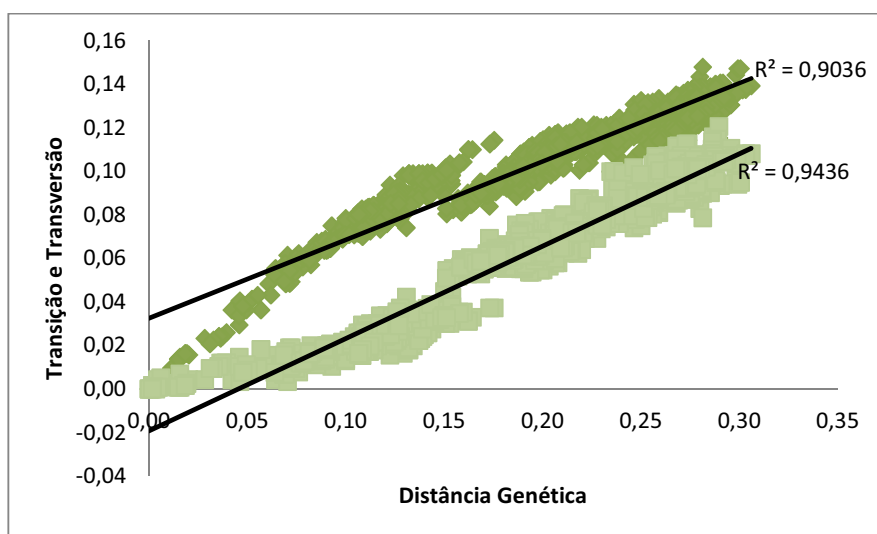


Figura 18. Gráfico da matriz de dados formado pela análise de Bryconinae + grupo-irmão, mostrando a frequência observada de transições (losangos) e transversões (quadrados) em relação à distância genética estimada pelo modelo de Tamura-Nei93.

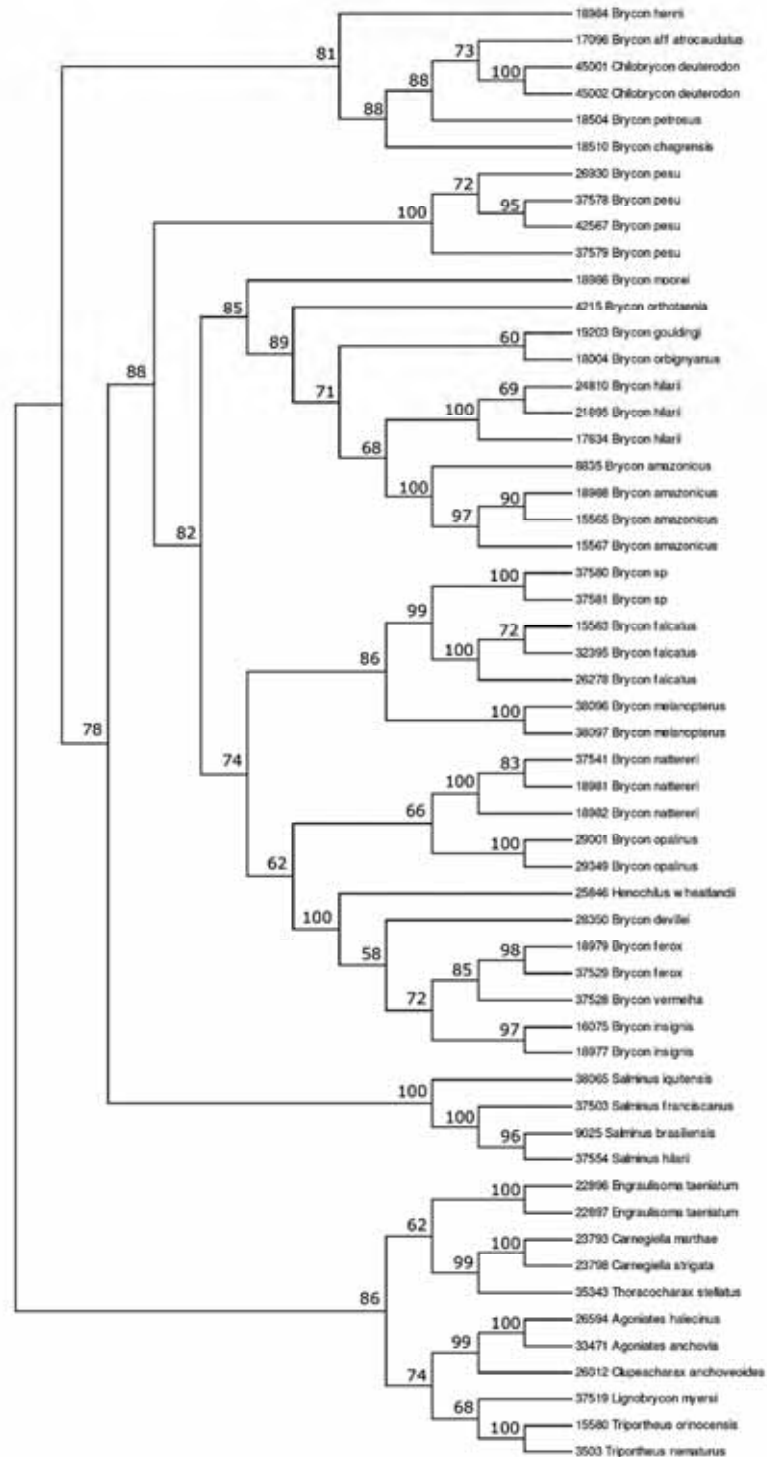


Figura 19. Árvore parcial construída a partir da análise de Máxima Parcimônia mostrando a relação entre *Salminus*, Bryconinae, Gasteropelecidae, Agoniatinae, Clupeacharacinae, Triportheinae, *Engraulisoma* e *Lignobrycon*. Os números apresentados representam valores de *bootstrap* (maiores que 50%) obtidos.

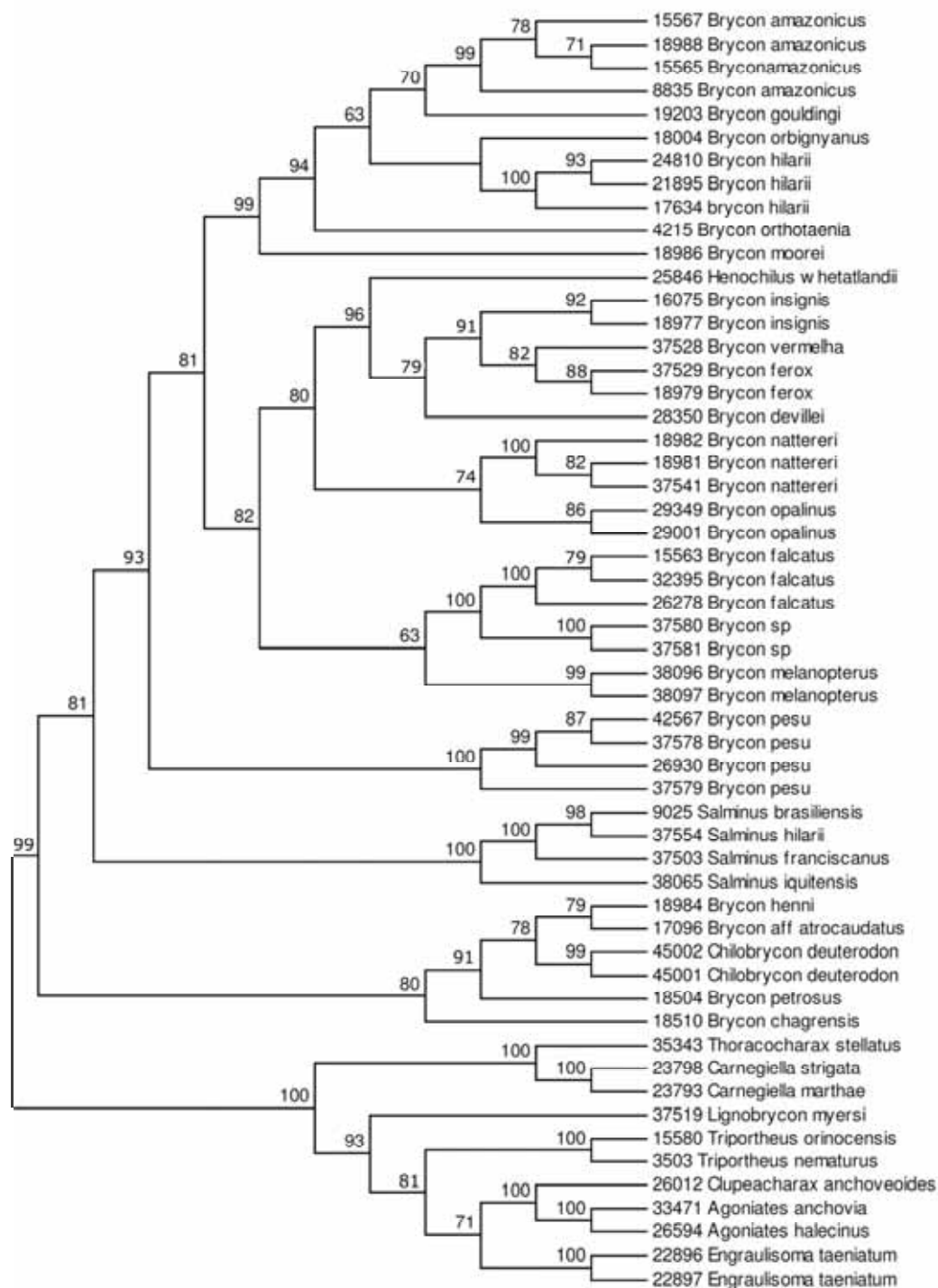


Figura 20. Árvore parcial construída a partir da análise de máxima verossimilhança mostrando a relação entre as espécies de *Salminus*, Bryconinae, Gasteropelecidae, Agoniatinae, Clupecharacinae, Triportheinae, *Engraulisoma* e *Lignobrycon*. Os números apresentados representam valores de *bootstrap* (maiores que 50%) obtidos.

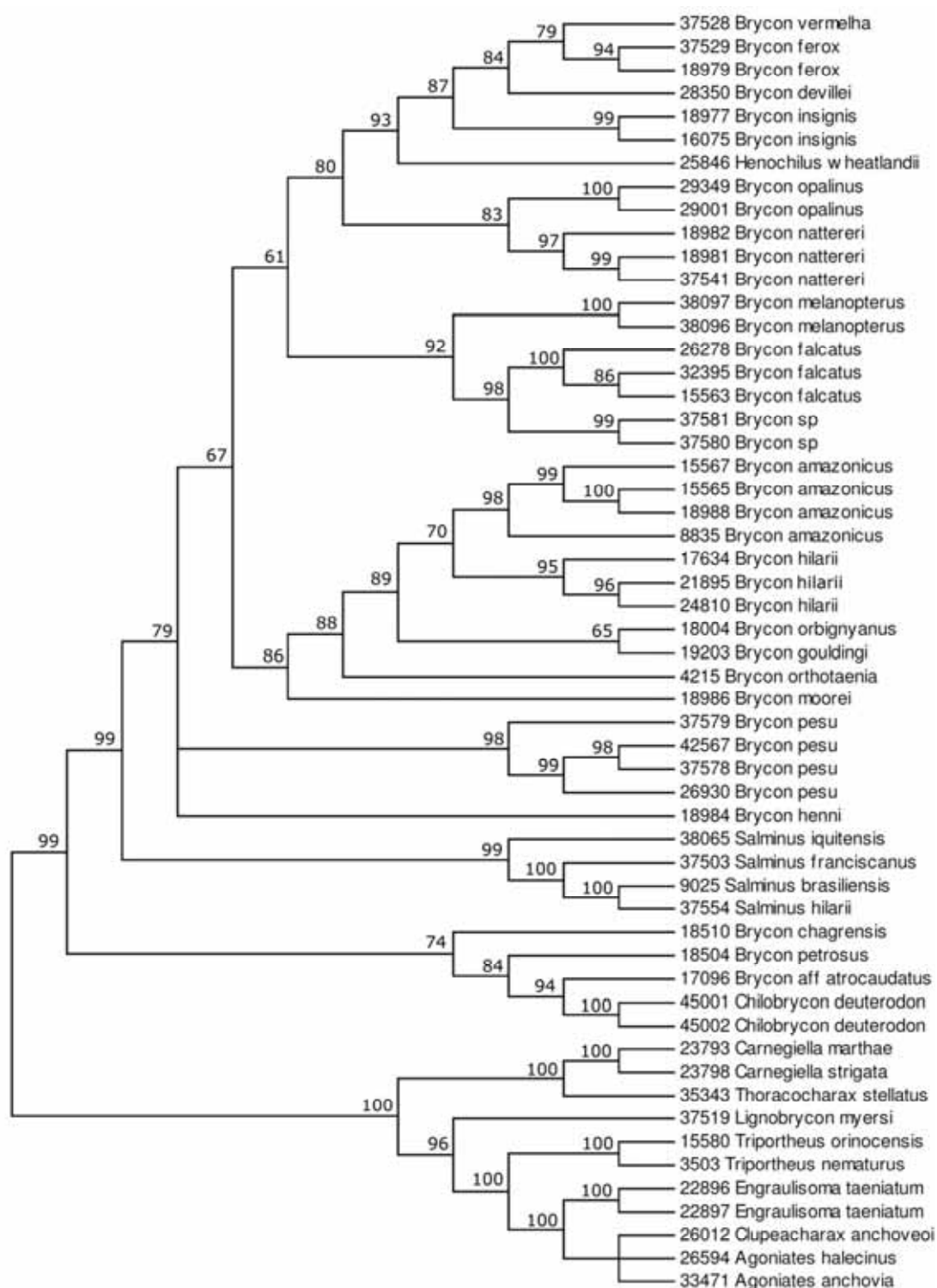


Figura 21. Árvore parcial construída a partir da análise Bayesiana mostrando a relação entre as espécies de *Salminus*, *Bryconinae*, *Gasteropelecidae*, *Agoniatinae*, *Clupecharacinae*, *Triportheinae*, *Engraulisoma* e *Lignobrycon*. Os números apresentados representam valores de *bootstrap* (maiores que 50%) obtidos.

Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1. Relação de Bryconinae com os demais Characidae

No presente estudo, foram analisados 231 táxons de Characiformes, incluindo todas as subfamílias reconhecidas de Characidae e um grande número de gêneros reconhecidos como *incertae sedis* em Characidae. Nesse estudo os três gêneros da subfamília Bryconinae (*Brycon*, *Henochilus* e *Chilobrycon*) estão presentes. Com isso, foi possível testar, pela primeira vez na literatura, as relações de Bryconinae com estes outros grupos.

Neste amplo estudo as amostras de Bryconinae mais os representantes do gênero *Salminus* formaram o grupo irmão de Gasteropelecidae, diretamente relacionados às subfamílias de Characidae Agoniatinae, Clupeacharacinae e Triportheinae e também aos gêneros *Engraulisoma* e *Lignobrycon*.

Vários autores apresentam considerações a respeito de semelhanças morfológicas de *Agoniatas* com integrantes da subfamília Cynodontidae, *Triportheus*, *Gasteropelecus*, *Piabucus*, *Paragoniates*, *Leptagoniates*, *Clupeacharax* e *Lignobrycon* (Kner, 1860; Günther, 1864; Eigenmann, 1910, 1912; Géry, 1963; Howes, 1976; Castro, 1984; Uj, 1990; Lucena, 1993; Zarske e Géry, 1997; Toledo-Piza, 2000). Estes trabalhos consideram, principalmente, a forma do coracóide e padrões de dentição e alguns têm enfoque filogenético.

Weitzman (1954) comparou a então subfamília Gasteropelecinae com *Brycon*, *Astyanax*, *Bryconamericus* e *Triportheus* e sugeriu, por características osteológicas, uma possível relação dos *gasteropelecines* com o gênero *Triportheus*. Porém o coracóide de *Triportheus* não é fusionado como em *gasteropelecines*. A cintura peitoral de *Triportheus* não é tão especializada quanto de Gasteropelecidae, mas é bem parecida. Segundo Weitzman (1954) *Triportheus* e a subfamília Gasteropelecinae poderiam ter tido um ancestral comum.

Portugal (1990) fez um estudo de revisão e comparativo de *Triportheus* (por meio da osteologia e anatomia externa dos grupos por ele estudados) e considerou esse gênero com uma unidade monofilética e provavelmente relacionado a um “grande grupo de caracídeos sul-americanos no qual estão incluídos *Brycon* e *Salminus*”.

Castro e Vari (1990) analisaram os gêneros *Lignobrycon* e *Triportheus* e sugeriram uma unidade monofilética para estes gêneros e relacionada a alguma subunidade de *Brycon*, questionando assim, o monofiletismo deste gênero.

Uj (1990) sugeriu a elevação de Bryconinae à categoria de família, na qual inclui *Brycon* e *Chalceus* juntamente com *Catabasis*, *Lignobrycon*, *Salminus*, *Triportheus*, *Chilobrycon*, *Bryconexodon* e *Holobrycon*. Esse mesmo autor apresenta em seus resultados a família Agoniatidae como grupo-irmão do clado que inclui Bryconinae.

De acordo com Lucena (1993) o clado formado pelos gêneros *Brycon* e *Triportheus* (por apresentarem as seguintes características: a área do osso frontal localizada lateralmente ao canal supra-orbital, ausência de uma fossa no occipital, o supra-orbital ausente e finalmente, o canal sensorial pré-opercular ultrapassando a borda ântero-dorsal do opérculo) é considerado grupo-irmão do clado formado por representantes da maioria das subfamílias dos caracídeos, especialmente Aphyocharacinae, Cheirodontinae, Glandulocaudine, Iguanodectinae, Stethapironinae e Tetragonopterinae. Nesse estudo o grupo-irmão *Brycon* é *Chalceus*, e este clado é grupo-irmão dos caracídeos africanos.

Um estudo de relações apresentado por Malabarba (1998) considera *Brycon pesu*, *B cephalus* e *B falcatus* um grupo monofilético e juntamente com *Salminus* representariam o grupo-irmão de *Triportheus* + *Lignobrycon*.

No trabalho de Zanata (2000) *Agoniates* é considerado grupo-irmão do clado formado por *Triportheus* e *Lignobrycon*.

Através de dados morfológicos Malabarba e Weitzman (2003) tentaram posicionar filogeneticamente seu novo gênero de Characidae *Cyanocharax*, como resultado foi observado a formação de grandes politomias, entre elas uma que engloba Gasteropelecidae, *Triportheus*, *Brycon*, *Salminus*, Serrasalminae, *Bryconops*, *Lignobrycon* e Roestinae.

No estudo de Calcagnotto *et al.* (2005) *Acestrorhynchus* (Acestrorhynchidae) aparece relacionado a *Brycon*, *Salminus* e *Triportheus*. Essa hipótese foi postulada por Weitzman e Malabarba (1998), devido à presença de um osso supra-orbital nestes grupos. Hubert *et al.* (2005a) também corroboram essa hipótese de relacionamento entre *Acestrorhynchus* e *Triportheus*.

Hubert *et al.* (2005b) estudaram através de sequências parciais dos genes 12S e 16S as relações filogenéticas entre 57 Characiformes, inclusive a família Bryconinae. Desse estudo, resultou uma topologia não muito robusta. *Brycon* + *Salminus* formou uma politomia com os representantes das famílias Parodontidae, Hemiodontidae e Curimatidae. Gasteropelecidae (representada pelos gêneros *Carnegiella* e *Gasteropelecus*) ficou agrupada com a família Ctenolucidae. E esse clado foi o mais basal entre todos os caraciformes neotropicais, ficando próximo às duas famílias africanas representadas por *Citharinus* e *Distichodus*.

Mirande (2009 e 2010) em suas análises redefiniu a família Gasteropelecidae incluindo as espécies *Engraulisoma taeniatum* e *Clupeacharax anchoveoides* dentro dessa família.

Um estudo realizado por Castro (1984) propôs uma estreita relação entre *Engraulisoma taeniatum* e *Clupeacharax anchoveoides* com base em sete caracteres sinapomórficos: possuem um forame na superfície ventral do pterótico, um supraorbital curto, a fusão do terceiro e quarto infraorbitais(*), presença de interdigitações entre os

processos isquiáticos na cintura pélvica, o antorbital apresenta na forma original e tamanho compatível de Characidae(*), o terceiro raio branquiostegal articulado na sutura entre o ceratohial anterior e posterior, ausência do segundo e terceiro pós-cleito(*). As sinapomorfias marcadas com (*) são as que definem Gasteropelecidae pela análise de Miranda (2009 e 2010). A fusão do pós-temporal e supracleito e a presença de apenas um epural são autopomorfias descritas para *Engraulisoma taeniatum* (Castro, 1984). Porém, esses caracteres são compartilhados com todos os gasteropelecídeos. Da mesma forma, a nadadeira dorsal é situada posteriormente e é encontrada em *Clupearacharax* e Gasteropelecidae (Weitzman 1954).

Por esse motivo Miranda (2009 e 2010) removeu *Clupearacharax* e *Engraulisoma* de Characidae e incluiu em Gasteropelecidae, pelo menos provisoriamente. Já a subfamília Bryconinae nos trabalhos de Miranda (2009 e 2010) também sofreu alteração, além dos representantes já definidos foram incluídos nessa nova análise *Lignobrycon* e *Triportheus*.

Mais recentemente Javonillo *et al.* (2010) propuseram um clado formado por *Bryconops*, *Acestrorhynchus*, *Brycon* e *Salminus*. Mas as relações entre *Gnathocharax*, *Triportheus* e os gasteropelecídeos não foram resolvidas pela análise Bayesiana (devido à formação de uma politomia). Já na análise de Máxima Parcimônia, a seguinte relação foi encontrada: (*Triportheus* (Gasteropelecidae, *Gnathocharax*)). Há evidências morfológicas para esse agrupamento na qual a superfície ventral desses peixes é em formato de quilha, são os chamados “caracídeos quilhados”. E essa característica é também compartilhada por *Lignobrycon* e segundo a hipótese de Malabarba (1998b) esse gênero é irmão de *Triportheus*.

Esforços no sentido de ampliar nosso conhecimento sobre Characidae vêm sendo feitos e somente em 2009 foi publicada a primeira filogenia para o grupo, feita com base em caracteres morfológicos (Miranda, 2009). Esse trabalho, ainda que muito importante,

há ainda diversas lacunas, entre as quais a falta de amostragem de muitos grupos importantes e problemas de descrição e polarização de caracteres. Parte destes problemas, relacionados à descrição e polarização de caracteres foram resolvidos em Mirande (2010), porém os problemas amostrais ainda persistem. Já no trabalho de Javonillo *et al.* (2010), visando o estudo das relações entre membros de Characidae, utilizando dados moleculares, os autores não incluíram nas análises a maioria dos táxons da família e há uma grande falta de dados moleculares para muitas das espécies amostradas, além disso, nesse trabalho não há uma definição do que os autores entendem como Characidae. O presente resultado corrobora as hipóteses de que Bryconinae tem uma estreita relação com *Salminus*, Gasteropelecidae e com os demais Characidae com quilha (Agoninatinae, Clupeocharacinae, Triportheinae, *Engraulisoma* e *Lignobrycon*).

5.2. Relação da subfamília Bryconinae e *Salminus*

Vários estudos de filogenia que envolve a ordem Characiformes realizados até o momento, confirmam uma relação bem próxima entre os gêneros *Brycon* e *Salminus*. Os resultados desse presente trabalho também confirma essa relação, porém em nenhum outro trabalho *Salminus* apareceu posicionado filogeneticamente dentro da subfamília, com exceção do trabalho de Calcagnotto *et al.* (2005).

Apesar da popularidade e importância que as espécies de *Salminus* possuem, o conhecimento da taxonomia e filogenia do gênero é ainda bastante insatisfatório. Cuvier (1816, 1819) Spix e Agassiz (1829) e Müller e Troschel (1844, 1845) escreveram os primeiros estudos e foram descritivos. Eigenmann (1916) publicou a chave de identificação e quatro espécies de *Salminus* foram consideradas como válidas: *S. affinis* (Rio Magdalena e Alto Amazonas), *S. hilarii* (Paraná, São Francisco, bacia Amazônica e Orinoco), *S. maxillosus* (bacia Platina) e *S. brevidens* (rio São Francisco). Géry (1977) realizou uma

revisão taxonômica do gênero, chegando basicamente nas mesmas conclusões de Eigenmann (1916), a única grande alteração foi a de *S. brasiliensis* como um sinônimo sênior de *S. brevidens*. Géry e Lauzanne (1990) fizeram uma revisão de *Salminus*. Os autores chegaram a algumas conclusões: *S. maxillosus* e *S. orbignyanus* eram sinônimos de *S. brasiliensis*; *S. brasiliensis*, *S. brevidens* e *S. cuvieri* são nomes baseados no mesmo exemplar. Portanto, *S. brasiliensis* tem prioridade sobre os demais nomes; *Holobrycon iquitensis* Nakashima (1941) e *Brycon erythura* Fowler (1941) são sinônimos de *S. hilarii*; *Salminus* de grande porte (rio São Francisco) foi considerada pelos autores como sendo uma espécie não descrita, apesar de ter outros trabalhos que consideram o contrário (Steindachner, 1880; Eigenmann, 1916; Géry, 1977 e Britski *et al.*, 1984).

E mais recentemente, Lima (2006) fez uma ampla revisão taxonômica e uma análise das relações filogenéticas do gênero. Foram reconhecidas cinco espécies: *S. affinis* (transandino dos rios Magdalena, Rancheria e Sinú, Colômbia), *S. hilarii* (rios das bacias do São Francisco e alto Paraná), *S. iquitensis* (sistema dos rios Araguaia e Tocantins, alto Amazonas e rio Orinoco), *S. brasiliensis* (sistema dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, sistemas do rio Jacuí e bacia do alto rio Madeira) e *Salminus* sp. “São Francisco” (endêmica do rio São Francisco) posteriormente essa espécie foi descrita como *Salminus franciscanus* (Lima e Britski, 2007).

As relações filogenéticas desse gênero com os outros Characiformes também não são bem resolvidas. Eigenmann (1917) propôs Salmininae como uma linhagem divergente de Cheirodontinae. *Salminus* sempre esteve associado aos gêneros considerados basais em Characidae: *Brycon*, *Triportheus* e *Chalceus* (Regan, 1911; Géry, 1972; Malabarba e Weitzman, 2003). Porém um amplo trabalho filogenético da família Alestidae (Zanata e Vari, 2005) considerou o gênero *Chalceus* como o único representante da região neotropical dessa família africana, e assim, um relacionamento mais próximo de *Salminus*,

Brycon e *Triportheus* com este gênero não poderia ser considerado, muito embora o entendimento das relações de Alestidae com os demais Characiformes seja muito importante para a resolução de Characidae.

Géry (1977) sugeriu formação de uma tribo Salminini que faria parte de Bryconinae. Roberts (1969) também reconheceu *Salminus* como um gênero basal de Characidae. De acordo com a hipótese de Uj (199) Agoniatiidae (=Agononiatinae) e Bryconinae (=Bryconinae e Salmininae) formam a base do clado correspondente à Characidae. Lima *et al.* (2003) classificaram *Salminus* como *incertae sedis*, dentro de Characidae. Segundo Buckup (1998) *Brycon* é grupo-irmão das espécies que formam o clado Characidae, porém o autor não analisou as posições de *Agoniatas* e *Salminus*. Zanata (2000) encontrou *Salminus* como grupo-irmão de *Hoplias* + *Hepsetus* e *Brycon* como grupo-irmão de Characidae, excetuando *Bryconops*.

O trabalho de Malabarba e Weitzman (2003) resultou em uma grande politomia formada por *Salminus*, *Brycon*, *Bryconops*, *Triportheus*, *Lignobrycon*, *Acestrorhynchus*, Roestinae e a família Gasteropelecidae, não sendo possível resolver nenhuma hipótese de relacionamento.

Lima (2006) encontrou *Salminus* como grupo-irmão de Acestrorhynchidae e *Brycon* em uma tritomia com *Lignobrycon* + *Triportheus* e (*Hydrolycus* (*Acestrorhynchus*, *Salminus*)). Mesmo obtendo em sua análise *Salminus* como grupo-irmão de *Acestrorhynchus* Lima (2006) fez uma longa discussão sobre o posicionamento de *Salminus* em Characiformes. Indicando através da presença de diversos estados de caracteres considerados pelo autor como possivelmente plesiomórficos para Characidae, que este gênero poderia ser basal em Characidae, grupo-irmão de Alestidae+Characidae, grupo-irmão de Erythrinoidea, ou ainda relacionado de alguma forma à Cynodontidae, Acestrorhynchidae e Erythrinoidea.

Ainda segundo Lima (2006) a sua análise corrobora o monofiletismo de *Salminus*, contudo, as relações internas do grupo, não são resolvidas. Todos os nós são fracamente suportados. *S. iquitensis* ficou mais próximo da espécie *S. affinis* e *Salminus brasiliensis* de *S. franciscanus*. A espécie *Salminus hilarii* seria grupo-irmão desses dois clados. Os resultados obtidos nesse presente estudo são bem diferentes e apresentam um bom suporte estatístico. Foi estabelecida a seguinte relação: (*Salminus iquitensis*, (*S. franciscanus*, (*S. brasiliensis*, *S. hilarii*))).

Mirande (2009) encontrou, em suas análises, a relação de Bryconinae com Salmininae, Agoniantinae, Cynodontinae e Acestrorhynchinae. E mais recentemente, confirmou os mesmos resultados (Mirande, 2010).

Vários estudos de relacionamentos de Characiformes baseados em dados moleculares também confirmam a hipótese de relação de *Salminus* e *Brycon*.

Uma relação próxima entre *Salminus* e *Brycon* foi verificada por Castro *et al.* (2004). Neste estudo os autores redescreveram e analisaram filogeneticamente o gênero *Henochilus*, usando os genes mitocondriais 12S e 16S. Em todas as análises conduzidas os autores confirmam a relação, com alto valor de *bootstrap*, do clado (*Salminus*, (*Brycon*, *Henochilus*)).

Calcagnotto *et al.* (2005) encontraram *Salminus maxillosus* (= *S. brasiliensis*) como grupo irmão de *B. hilarii* e este clado como grupo-irmão de uma espécie de *Brycon* não identificada.

Janovillo *et al.* (2010) encontraram em suas análises uma relação entre os gêneros *Brycon* e *Salminus* e o clado formado por *Bryconops* e *Acestrorhynchus*.

Salminus foi em geral considerado como relacionado à *Brycon* em virtude da similaridade geral morfológica apresentada entre os dois gêneros (Lima, 2006). Roberts (1969) estudou a osteologia de *Salminus* em maior detalhe, e apontou a existência de

muitas diferenças osteológicas importantes entre os dois gêneros (características da dentição, maxila inferior, arcos branquiais e ossos infraorbitais), ao ponto de questionar um real estreito relacionamento entre eles. Zanata (2000) em seu estudo de relações de *Brycon* não encontrou evidências que apontam o estreitamento desses dois gêneros em questão.

Ainda segundo Lima (2006) a real resolução das relações de *Salminus* é indicativa da complexidade da questão que deve, em grande parte, à natureza intermediária da morfologia de *Salminus*. Por exemplo, *Salminus* partilha com *Brycon* e *Triportheus* características certamente derivadas e incomuns em Characiformes, como um anel orbital completo e bem consolidado. *Salminus* ainda compartilha algumas características com Cynodontidae e Acestrorhynchidae, duas famílias de relações incertas, como um grande desenvolvimento do segundo osso infraorbital, que possui uma grande área de contato com o terceiro infraorbital. Um caráter derivado em Characiformes, o dente sinfiseano interno à série principal, está presente apenas em Alestidae, Serrasalminae, Bryconinae e *Triportheus*, o que poderia indicar algum tipo de relação entre todos esses táxons. Tal dente está ausente em *Salminus*, esse gênero apresenta uma morfologia dentária única em Characiformes, mas são de toda a forma, dentes pedunculados, não cônicos, representando a condição considerada plesiomórfica na ordem.

Os caracteres aqui citados em *Salminus* sugerem que este gênero possui uma combinação de estados plesiomórficos e derivados única em Characiformes o que o torna um táxon-chave para a resolução das relações do grupo.

Contudo, é preciso notar que, do ponto de vista morfológico, um elevado grau de homoplasia parece ser necessário para que *Salminus* e *Brycon* constituam um grupo monofilético, sendo muito mais plausível morfológicamente que esses gêneros constituam, na realidade, parte de uma série parafilética de táxons, na base de Characidae (Lima,

2006). Porém, estudos com dados moleculares parecem reforçar a teoria de que *Salminus* é um Characidae basal, ao formar um grupo monofilético com *Brycon* (Orti e Meyer, 1997; Calcagnotto *et al.*, 2005; Javonillo *et al.*, 2010).

Um trabalho com dados citogenéticos que reforça essa ligação entre esses dois gêneros foi realizado por Margarido e Galetii Jr. (1999). Esses autores analisaram os cromossomos de duas espécies de *Brycon* (*B. orthotaenia* e *B. hilarii*) e de *Salminus hilarii*. Os autores concluíram que *Brycon* e *Salminus* compartilham vários caracteres cromossômicos (por exemplo, essas espécies apresentam uma similaridade na região da NOR) podendo formar uma unidade monofilética entre os Characidae, na qual outros caracídeos não estão incluídos.

Verissimo-Silveira *et al.* (2006) estudaram a espermiogênese e os espermatozóides de *Brycon* e *Salminus*. De acordo com autores, esses dois gêneros apresentam algumas características em comum, tais como: um núcleo esférico e uma cromatina condensada em grumos. Há poucas mitocôndrias alongadas na região apical e um canal citoplasmático circundado por um ou dois anéis concêntricos membranosos. O eixo flagelar é perpendicular ao núcleo. Segundo os autores, essas características reforçam a hipótese de que esses gêneros podem ser mais relacionados que se supõe atualmente.

5.3. Relações entre gêneros e espécies de Bryconinae

A discussão desse tópico se baseia principalmente nos resultados da tese de doutoramento de Zanata (2000). Apesar desse trabalho não ter sido publicado é o único em que foi feito um estudo mais abrangente das relações da subfamília estudada.

No presente estudo as espécies de *Brycon* transandinas e *Chilobrycon* formaram um clado bem sustentado estatisticamente e grupo irmão de todas as demais espécies de Bryconinae e de *Salminus*. Nas análises Bayesianas *B. henni* aparece mais relacionada

aos demais Bryconinae cisandinos e nas demais análises como grupo irmão dos *Brycon* transandinos e *Chilobrycon*. As espécies do Panamá (*B. chagrensis* e *B. petrosus*) formam o grupo-irmão das espécies peruanas *B. aff. atrocaudatus* e *Chilobrycon deuterodon*.

Para Zanata (2000) *Brycon pesu* é hipoteticamente considerado o grupo-irmão das demais espécies de *Brycon* e do gênero *Chilobrycon*. Porém, esse clado é fracamente sustentado. Ainda segundo Zanata (2000) as espécies *B. argenteus*, *B. petrosus*, *B. oligolepis*, *B. coxeyi*, *B. henni*, *B. dentex*, *B. meeki*, *B. guatemalensis*, *B. striatulus* e *B. chagrensis* formam um clado que tem como características a lamela anterior do esfenótico com grande concavidade na margem anterior e a segunda câmara da bexiga natatória afilada ou levemente arredondada (esse segundo caráter é encontrado também nos gêneros *Cheirodon*, *Odontostilbe* e *Serrapinnus*, analisada pela autora). Sendo que a espécie *Brycon henni* é mais próxima de *B. coxeyi* (encontrado no Equador).

As espécies *B. chagrensis* e *B. striatulus* (encontrada no Panamá) é grupo-irmão *B. guatemalensis* (encontrada do México ao Panamá), e o caráter que une esses clados é a presença de faixas verticais estreitas e relativamente irregulares sobre as laterais do corpo (Zanata, 2000). Ainda segundo essa autora o caráter que une *B. chagrensis* e *B. striatulus* é ausência de forame entre o esfenótico e pterótico, porém esse caráter é encontrado também em *B. dentex* e *B. opalinus*.

Pelas análises de Zanata (2000) *B. atrocaudatus* e *B. alburnus* estão relacionados com as espécies cisandinas *B. opalinus*, *B. sp1* e *B. insignis*. Esse resultado é bem interessante porque as espécies *B. atrocaudatus* e *B. alburnus* são provenientes de rios do Peru e Equador que drenam para o Pacífico e *B. opalinus*, *B. insignis* e *Brycon sp1* são provenientes de rios que drenam para o leste do Brasil. E os caracteres que unem esse grupo são os seguintes: presença de paresfenóide reto, extremidade posterior do paresfenóide atingindo ou ultrapassando a margem posterior da cápsula lagelar e maxilar

com estrias. Porém, a presença de contato entre mesoptererigóide e hiomandibular é compartilhada com *B. alburnus*, *B. insignis* e *Brycon sp1*; e o ceratobranquial com borda ventral apresentando reentrâncias e projeções são caracteres compartilhados por *Salminus*, *B. atrocaudatus* e *B. alburnus*. Entretanto, apesar desses caracteres pertencerem tanto a *Salminus* quanto a *Brycon* o resultado da análise final não corrobora a relação próxima entre esses dois gêneros.

A presença de um forame entre o esfenótico e pterótico em *B. petrosus* sugere que esta espécie esteja relacionada com *B. oligolepis*, *B. coxeyi*, *B. henni*, *B. dentex*, *B. meeki*, *B. guatemalensis*, *B. striatulus* e *B. chagrensis*, que apresentam esta mesma característica (Zanata, 2000).

As relações entre as espécies transandinas analisadas nesse presente estudo são diferentes das obtidas por Zanata (2000). No presente estudo o gênero *Chilobrycon* (encontrado no rio Tumbes, Peru) está posicionado entre as demais espécies transandinas de *Brycon*, com exceção de *B. moorei*. Géry e Rham (1981) descreveram esse gênero afirmando que ele pertence à Bryconinae e diferencia-se de *Brycon* pela forma das maxilas, pelos dentes trilobados e espatulados e pela ausência de lábio superior.

Segundo Zanata (2000) *Chilobrycon* distingue-se da maioria dos caracídeos pelo tipo de contato entre os dentes assimétricos (por apresentar três cúspides pequenas laterais, uma mediana grande e outra lateral pequena), justapostos de maneira peculiar: a borda póstero-lateral de cada dente situa-se internamente à borda ântero-lateral do dente imediatamente posterior (uma cúspide lateral). *Henochilus* tem exatamente o mesmo padrão descrito em *Chilobrycon* (Zanata, 2000). Ainda segundo essa mesma autora, com base na morfologia externa, é possível afirmar que os dois táxons têm diferenças osteológicas com relação à distribuição dos dentes do pré-maxilar (três séries em

Chilobrycon e duas em *Henochilus*) e à forma do dentário (relativamente robusto e alto em *Chilobrycon* e “raso” em *Henochilus*).

Assim, os resultados obtidos por Zanata (2000) e os que foram obtidos nesse trabalho confirmam que *Chilobrycon* está proximalmente relacionado ao grupo de espécies de *Brycon* não justificando a manutenção do nome *Chilobrycon* como gênero distinto.

Outro clado altamente sustentado em todas as análises foi o formado por quatro amostras de *B. pesu*. O gênero *Holobrycon* foi proposto por Eigenmann (1909) para *Brycon pesu* Müller e Troschel, 1841. O autor definiu o gênero como “um *Brycon* sem fontanelas”. Howes (1982) justificou a sinonimização deste gênero com *Brycon* afirmando que as fontanelas frontal e parietal estão sempre presentes na espécie em questão. Segundo Zanata (2000) a análise de vários exemplares de *B. pesu* mostra que além da ausência total de fontanela no estágio adulto, esta espécie apresenta caracteres distintivos, não encontrados nas demais espécies de *Brycon* examinadas, tais como, o 5º ceratobranquial com reentrância entre a porção com dentículos e a porção posterior alongada e maxilar largo anteriormente, tornando-se afilado posteriormente. De acordo com a hipótese filogenética proposta por Zanata (2000), *Brycon pesu* representa o grupo-irmão das demais espécies de *Brycon*. Os nossos resultados corroboram a posição basal de *B. pesu* em relação aos demais *Brycon* cisandinos, *B. moorei* e *Henochilus*, mas sua posição particular na filogenia final obtida permite sugerir que o gênero *Holobrycon* seja ressuscitado para caracterizar esta linhagem particular.

Nas análises de Mirande (2009) mostram que *B. pesu* é grupo-irmão da politomia formada por *B. falcatus*, *B. orbignyanus* e *B. meeki*. Essa última espécie é um transandino encontrado na Colômbia. Em um trabalho posterior (Mirande, 2010), baseado na re-análise de todos os dados de seu trabalho de Characiformes, o resultado obtido continuou não

sendo satisfatório, pois uma politomia foi formada com todas essas quatro espécies de *Brycon*.

Os resultados todos mostraram que os *Brycon* cisandinos, *B. moorei* e *Henochilus* pertencem a um grande grupo formado por duas linhagens.

Em uma destas linhagens *B. moorei*, uma espécie transandina (ocorre na bacia do rio Magdalena, Colômbia), é irmã das espécies encontradas nas bacias dos rios Amazonas, São Francisco, Paraná e Tocantins. Hilsdorf *et al.* (2008) analisando as relações de algumas espécies de *Brycon* e *Henochilus* também encontraram esse mesmo resultado. A presença de *B. moorei* como membro mais basal desse clado sugere uma história complexa e antiga do gênero *Brycon* demonstrando a não-monofilia das espécies trans e cisandinas (Zanata 2000; Hilsdorf *et al.*, 2008).

Nossos resultados mostram que *B. orthotaenia* (Bacia do Rio São Francisco) é o grupo irmão das espécies *B. gouldingi*, *B. orbignyanus*, *B. hilaarii* e *B. amazonicus*. A monofilia desse clado é também suportada morfologicamente (Zanata, 2000). Essa mesma autora encontrou uma politomia formada pelas espécies *B. orbignyanus*, *B. orthotaenia*, *B. hilaarii* e *B. whitei*, com baixo valor do índice de decaimento (1), porém com o valor de *bootstrap* razoavelmente alto (78%).

De acordo com Lima (2001) *Brycon orthotaenia*, *B. orbignyanus* e *B. hilaarii* são bastante semelhantes. Essas espécies divergem em alguns caracteres morfométricos e merísticos; entretanto, existe uma combinação de caracteres em comum: quinto osso infraorbital mais alto do que largo; par de dentes da sínfise dos dentários, atrás da série principal de dentes, muito menores que os dentes imediatamente à frente; faixa negra estendendo-se do pedúnculo caudal à extremidade distal da nadadeira caudal; e nadadeiras dorsal, anal e caudal avermelhadas em vida. Distingue-se de *B. hilaarii* das duas outras espécies principalmente nas contagens de escamas (escamas da linha lateral,

escamas entre a linha lateral e a base da nadadeira dorsal). E as diferenças entre *B. orthotaenia* e *B. orbignyanus* são: diferente perfil da cabeça e por um maior número de dentes na segunda série do pré-maxilar (excluindo os dentes entre a primeira e terceira séries).

No segundo grande grupo monofilético *B. falcatus* é grupo-irmão de uma espécie não identificada, coletado na região de Paranatinga, Mato Grosso. E esse clado é grupo-irmão de *B. melanopterus*. Zanata (2000) encontrou uma politomia formada pelas espécies *B. falcatus*, *B. brevicauda* (= *B. falcatus*), *Brycon* sp. 3 (= *B. falcatus*) e *B. melanopterus*. Outro grande grupo monofilético aqui observado foi o formado pelas espécies de *Brycon* que habitam as drenagens costeiras do Brasil e por *Henochilus*. O gênero *Henochilus* é monotípico e ocorre na bacia do Rio Doce, na drenagem costeira do estado de Minas Gerais (Castro *et al.*, 2004). *Henochilus* é morfologicamente muito similar a *Brycon* e *Chilobrycon*, com redução no número de séries de dentes. Essa redução no número de séries poderia representar uma autapomorfia de *Henochilus* (Lima, 2003).

Eigenmann e Myers (1929) redescreveram brevemente *Henochilus wheatlandii*, comentando de que se trata de um “*aberrant member of the Tetragonopterinae*”, e que apresentaria uma considerável semelhança com *Psalidodon gymnodontus* na dentição e ausência de lábios. Géry (1977) considerou *Henochilus* como um Cheirodontinae, criando a tribo Henochilini para compreender *Henochilus* e *Psalidodon*. Malabarba (1998) redefiniu Cheirodontinae e excluiu tanto *Henochilus* como *Psalidodon* desta subfamília, considerando ambos *incertae sedis* dentro de Characidae. Por fim, Vieira *et al.* (2000) redescobriram a espécie na bacia do rio Doce e colocaram em dúvida a localidade típica da espécie (Santa Clara, no rio Mucuri, Bahia). Lima (2001) confirma a provável relação entre *Henochilus* e às espécies do gênero *Brycon*.

Castro *et al.* (2004) re-descreveram e analisaram filogeneticamente o gênero *Henochilus*, usando os genes mitocondriais 12S e 16S. Em todas as análises conduzidas os autores confirmam a relação, com alto valor de *bootstrap*, do clado (*Salminus*, (*Brycon*, *Henochilus*)). O trabalho de Hilsdorf *et al.* (2008) envolveu a análise de sequências parciais do gene mitocondrial 16S e foi realizado com 13 espécies de *Brycon* e com a espécie *H. wheatlandii*. Nesse estudo verificou-se que *Brycon* é monofilético quando se inclui a espécie *H. wheatlandii*.

No presente estudo, *Henochilus* apareceu como grupo-irmão das espécies de *Brycon* dos rios costeiros da região leste do Brasil (*B. insignis*, *B. ferox*, *B. vermelha* e *B. devillei*) o que sugere a necessidade de incorporação do gênero *Henochilus* à *Brycon* como observado por Hilsdorf *et al.* (2008).

B. opalinus é uma espécie endêmica dos rios da bacia do Paraíba do Sul (Hilsdorf *et al.*, 2002) e esta relacionada com a espécie *B. nattereri*. Para Zanata (2000) *B. opalinus* é grupo-irmão de *Brycon insignis* e *Brycon sp1*. E *B. nattereri* é grupo-irmão das espécies *B. orbignyanus*, *B. orthotaenia*, *B. hilarii*, *B. whitei*, *B. amazonicus*, *B. falcatus*, *Brycon sp3* (= *Brycon falcatus*) e *B. melanopterus*. E o único caráter que une esse clado é a linha que passa pela base do último raio da nadadeira dorsal não se sobrepondo ao raio anterior da nadadeira anal. Esse caráter é interessante porque embora esteja presente em outros táxons, esse é o único estado de caráter que sustenta esse clado.

Segundo Lima (2001) *Brycon nattereri* ocorre em simpatria com *B. orbignyanus* na bacia do rio Paraná, com *B. orthotaenia* na bacia do rio São Francisco, e com *B. pesu*, *B. falcatus*, *B. polylepis* e *Brycon sp.n.* “amazonicus do Tocantins” (= *Brycon gouldingi*).

Para Zanata (2000) o gênero *Brycon* é monofilético quando inclui *Chilobrycon deuterodon*. Já para Hilsdorf *et al.* (2008) *Brycon* é monofilético quando inclui *Henochilus wheatlandii*. Porém, essa hipótese é refutada por alguns autores (Howes, 1982; Castro e

Vari, 1993 e Lucena, 1993). Nossos resultados confirmam que a subfamília Bryconinae não é monofilética assim como o gênero *Brycon*.

5.4. Padrões Biogeográficos

O estudo de padrões em biogeografia histórica, envolvendo peixes de água doce, representam uma oportunidade única de testar modelos de evolução das bacias hidrográficas (Albert *et al.*, 2006). Mudanças paleográficas e paleoambientais, tais como o surgimento da Cordilheira dos Andes, as incursões marinhas dentro dos sistemas de água doce e a reorientação dos rios nas grandes bacias hidrográficas exerceram profundos efeitos na evolução da biota aquática da América do Sul (Lovey *et al.*, 2006).

O último grande evento de incursão marinha na América do Sul ocorreu antes da estabilização desta região, provavelmente entre 15 e 10 milhões de anos (MA) (Haq *et al.*, 1987; Hoorn 1996; Räsänen e Linna, 1996). Evidência de água doce foi encontrada no Alto Amazonas, cerca de 11MA (Hoorn 1994; Potter, 1994; Wesselingh *et al.*, 2002) na região do Lago Pebas (Lundberg *et al.*, 1998). Neste momento, a direção das correntes do Vale do Magdalena deslocou para o oeste devido ao soerguimento da parte norte-ocidental dos Andes, essa mudança foi o suficiente para isolar a bacia do rio Magdalena e o Pacífico da Colômbia da bacia cisandina do sistema Proto-Orinoco (bacia Amazônica Ocidental e Orinoco) (Hoorn *et al.*, 1995) (**Figura 22**).

As regressões marinhas e o soerguimento andino estão associados com a estabilidade da bacia Amazônica (10 a 8MA). A divisão do sistema Paraná-Paraguai do Amazonas ocorreu há cerca de 10MA, mas a evidência de eventos de captura de cabeceiras no sistema do Paraná através do Amazonas ocorreu dentro dos últimos 10MA (Räsänen *et al.*, 1995; Lundberg *et al.*, 1998). A separação do Orinoco ocorreu sobre o arco Vaupés, entre 8 e 5 MA (Hoorn, 1993; Hoorn *et al.*, 1995). A direção definitiva do rio

Amazonas para o seu percurso atual ocorreu depois do soerguimento final da cordilheira Andina Central (Gregory-Wodzicky, 2000), através da elevação do arco Purus (Lundberg, *et al.*, 1998). Concomitantemente, o soerguimento final dos Andes noroeste levou a criação do Lago Maracaibo (Hoorn, 1993; Hoorn *et al.*, 1995). O Alto Amazonas foi isolado dos remanescentes rios Orinoco e do Paraná pelos escudos do Brasil e da Guiana (Iron *et al.*, 1995; Nores, 1999). Durante os últimos quatro milhões de anos, após as regressões marinhas e o soerguimento dos Andes ocorreu a fragmentação do Alto Amazonas, formando assim, os principais afluentes que constituem esse grande sistema (Räsänen *et al.*, 1987, 1990, 1992; Hoorn *et al.*, 1995). A **Figura 23** mostra o esquema simplificado de todo esse processo geológico e como se encontra atualmente.

Alguns autores sugerem que as incursões marinhas foram relativamente duradouras e generalizadas (Räsänen *et al.*, 1995, 1998; Webb, 1995; Gringas *et al.*, 2002). Outros aceitam a teoria que durante o Mioceno, a Amazônia era formada por água doce, porém, existiam momentos de “surtos” de influência marinha (Hoorn, 1996; Vonhof *et al.*, 1998, 2003; Wesselingh *et al.*, 2002). Segundo Lundberg *et al.* (2006) existia alguma forma de conexão entre Alto Amazonas e o Caribe (provavelmente via Los Llanos, bacia da Venezuela) registrado pelos fósseis de peixes marinhos (Monsch, 1998) e pelos manguezais (Hoorn, 1993, 1994a,b). Além disso, fósseis de moluscos datados com isótopos radioativos confirmaram a presença de águas salinas no Alto Amazonas, particularmente durante o final do Mioceno Médio (12 a 11 MA) (Hoorn, 1993; Vonhof *et al.*, 1998, 2003; Monsch, 1998; Wesselingh *et al.*, 2002) e o início do Mioceno Superior (22 a 16.5MA) (Hoorn, 1993; Wesselingh *et al.*, 2002). O istmo do Panamá emergiu no Plioceno há cerca de 3 MA (Coney, 1982; Ituralde-Vincent e MacPhee, 1999).

Filogenias usando sequências de genes podem ser usadas para estimar o tempo de divergência entre as linhagens. Segundo Hubert *et al.* (2008) sequências de DNA

mitocondrial têm evidenciado que o gênero *Serrasalmus* constitui um grupo monofilético (formado há cerca de 9 MA) e está dividido em três clados distintos e todas as espécies estão distribuídas nos rios das bacias Amazônica, Paraná e Orinoco. A biogeografia da ictiofauna na Amazônia tem sido fortemente influenciada pela incursão marinha no período do Mioceno cerca de 5 MA (Nores, 1999; Hubert e Rennó, 2006). As análises de sequências de DNA mitocondrial evidenciaram que a colonização no Alto Amazonas pelos gêneros *Serrasalmus* e *Pygocentrus* ocorreu após o recuo marinho, durante os últimos quatro milhões de anos, a partir da água doce do Mioceno, refúgios dos escudos do Brasil e Guiana (Hubert e Renno, 2006; Hubert *et al.*, 2007).

Acredita-se que a separação dos estoques trans e cisandinos de *Rhamdia* deva ter acontecido entre 8,8 e 7,7 MA. Os dados moleculares de Perdices *et al.* (2002) indicam que esta divergência combina com a idade geológica do soerguimento final dos Andes e da formação do Amazonas moderno (~8,5-8 MA) e Orinoco (~8-7 MA) (Lundberg *et al.*, 1998). Segundo os autores, estes dados demonstram que a conclusão do soerguimento dos Andes foi decisiva na separação dos clados cis e transandinos de *Rhamdia*. A separação entre as espécies *R. guatemalensis*, *R. laticauda* e *R. cisnerascens* (que ocorrem na América Central) ocorreu há aproximadamente dois milhões de anos, por eventos posteriores de alopatria, e a rápida dispersão das espécies poderia ser facilitada pelos rios anastomosados. As evidências filogeográficas indicam que ambos os clados de *Rhamdia* aparentemente alcançaram o limite de sua área de distribuição, ou perto disso, indicando que a continuação da dispersão provavelmente foi interrompida por uma barreira climática (como temperatura), e não por falta de tempo hábil (Perdices *et al.*, 2002).

Reeves e Bermingham (2006) apresentaram uma análise filogeográfica com base em sequências parciais dos genes mitocondriais ATPase 6 e 8 de quatro gêneros de peixes de água doce (*Brycon*, *Bryconamericus*, *Eretmobrycon* e *Cyphocharax*). Através

das análises em distâncias genéticas com essas espécies em comparação com a divergência entre os peixes marinhos permite uma forte inferência que após a formação Istmo do Panamá surgiu a primeira oportunidade de colonização Mesoamericana feita a partir dos caracíformes.

A presença de *Brycon moorei* (rios da bacia Magdalena, Colômbia) mais relacionado às espécies cisandinas corrobora o não monofiletismo do grupo cis e transandino. Os resultados obtidos por Zanata (2000) levantaram essa hipótese, pois a autora encontrou um clado formado por *B. oligolepis* (Colômbia e Equador), *B. henni* (Colômbia), *B. coxeyi* (cisandino equatoriano), *B. dentex* (Equador), *B. meeki* (Colômbia), *B. guatemalensis* (Américas Central e Norte), *B. striatulus* e *B. chagrensis* (ambas do Panamá), sendo que *B. coxeyi* ficou mais relacionado com *B. henni*. Esses resultados sugerem que o gênero tem uma história biogeográfica complexa e antiga.

A bacia do Magdalena inclui os rios Magdalena e Cauca e seus tributários e está localizado na região central e norte da Colômbia atingindo até o Mar do Caribe (Lundberg *et al.*, 1998). Esse sistema formou-se há cerca de 10MA com a elevação da Cordilheira Oriental separando por completo das bacias do Orinoco e Amazonas. O rio Magdalena percorre o vale formado pelas Cordilheiras Oriental e Central (Lundberg *et al.*, 1998). Provavelmente o ancestral comum entre *Brycon moorei* e do grupo cisandino possivelmente habitou essa região antes do soerguimento da cordilheira e a separação total das bacias.

As espécies transandinas *Brycon henni* (Colômbia); *Brycon atrocaudatus* (Peru Equador), *Chilobrycon deuterodon* (Peru), *Brycon chagrensis* e *B. petrosus* (ambas do Panamá) formam o grupo irmão de todos os demais Bryconinae e devem ter se separado das espécies cisandinas antes do soerguimento da Cordilheira Oriental que forma o sistema Magdalena.

Hubbert e Renno (2006) investigaram o padrão biogeográfico de Characiformes da América do Sul. Esses autores encontraram 11 áreas de endemismo e essas áreas parecem ser profundamente influenciadas pelas alterações que a América do Sul passou durante o Mioceno e sugerem a existência de oito áreas de refúgios de água doce naquele momento. As primeiras áreas estariam localizadas a noroeste dos Andes nas regiões do Atrato-Maracaibo e San Juan, as outras seriam Paraná-Paraguai, São Francisco, Alto Amazonas, Parnaíba, Guiana, Tocantins-Xingu e Orinoco-Alto Negro. Ainda de acordo com os autores as áreas do Paraná-Paraguai, Atrato-Maracaibo e San Juan abrigam um alto número de espécies endêmicas e um baixo número de espécies compartilhadas com outras áreas, o que sugere uma região antiga, de acordo com outros estudos biogeográficos (Vari, 1988; Montonya-Burgos, 2003; Porzecanski e Cracraft, 2005). Esses resultados confirmam a hipótese apresentada nesse presente estudo.

A relação entre o padrão de distribuição de *Brycon* e a formação dos Andes foi confirmado por Lima (2001). Segundo esse autor a mesma espécie de *B. polylepis* ocorre em rios tanto da América do Sul transandina, como cisandina, porém essa hipótese precisa ser analisada em maior detalhe. Mas como mencionado acima, a bacia do Lago de Maracaibo foi isolada a relativamente pouco tempo da bacia do Amazonas/Orinoco (~8MA) (Lundberg, *et al.*, 1998). As observações feita por Lima (2001) portanto, sugere que o ancestral dessa espécie habitava essa região, antes do soerguimento da Cordilheira resultando no fechamento do portal caribenho do paleo-Amazonas-Orinoco oriental.

Na América do Sul cisandina, Vari (1988) reconheceu oito áreas de endemismo para os representantes da família Curimatidae: Orinoco, Guianas, bacia amazônica (inclusive o rio Tocantins), nordeste (drenagens do Maranhão), rio São Francisco, rios costeiros (ao sul do rio São Francisco até o rio Paraíba do Sul), Alto Paraná e Paraguai (incluindo o rio Paraguai, baixo rio Paraná, rio Uruguai e drenagens costeiras do Uruguai ao sul do estado

de São Paulo). Várias espécies de *Brycon* parecem seguir esse padrão de distribuição descrito para Curimatidae. Segundo Lima (2001) apesar de não haver registros de *Brycon* na bacia do nordeste, não significa que não tenha, pois os rios dessa região são mal conhecidos ictologicamente, e a ausência dessa espécie pode ser apenas resultado de falta de amostragens adequadas. Esse gênero também não é encontrado nos sistemas costeiros entre Uruguai e o estado de São Paulo.

As duas espécies de *Brycon* existentes nos rios guianenses, *B. falcatus* e *B. amazonicus* (restrito ao rio Essequibo, Guiana), apresentam uma ampla distribuição no norte da América do Sul ocorrendo também na bacia do rio Orinoco e bacia Amazônica. Na bacia Amazônica, *B. falcatus* aparentemente está ausente nos rios Solimões/Amazonas, sendo confinado a seus tributários, a única exceção a esse padrão sendo um registro para o rio Amazonas em Iquitos, Peru. Por sua vez, *Brycon amazonicus* parece estar ausente no Alto Amazonas, no Peru, onde ocorre *B. hilarii*. *B. amazonicus* parece ser restrita ao baixo curso da maioria dos tributários do rio Amazonas, com exceção do rio Madeira, aonde alcança o rio Guaporé.

Outra espécie que apresenta uma ampla distribuição é *Brycon pesu*. Ela ocorre nos rios da bacia Amazônica, da Guiana, Suriname e Guiana Francesa e também na bacia do Orinoco. Confirmando mais uma vez a história desse grupo de peixe é bastante antiga, antes da separação das bacias do Orinoco e Amazônia Ocidental.

Brycon melanopterus ocorre na bacia Amazônica, do Alto Amazonas no Peru e Equador ao rio Trombetas, no Pará; bacia dos rios Madeira, Negro, Branco, Uatumã e baixo rio Tapajós.

A bacia do rio Paraguai e baixo rio Paraná apresentam unicamente *Brycon hilarii*, esta espécie também ocorre na bacia do rio Guaporé e no alto rio Amazonas, no Peru. *Brycon orbignyanus* é encontrado no baixo rio Paraná, Alto Paraná e rio Uruguai. Uma

espécie endêmica do rio São Francisco é a *B. orthotaenia*. Essas três espécies, segundo Lima (2001), são muito semelhantes, dificultando a identificação e de acordo com os nossos resultados também estão relacionadas. Uma espécie endêmica da bacia Tocantins-Araguaia é *Brycon gouldingi*.

Nos sistemas do Alto Paraná e do rio São Francisco é encontrado *Brycon nattereri*. Essa espécie está relacionada com *B. opalinus* (drenagem costeira) de acordo com a filogenia obtida neste estudo.

Uma hipótese para esse resultado é encontrada no trabalho de Ribeiro (2006) na qual interessantes padrões biogeográficos são encontrados quando há associação entre ictiofauna do escudo brasileiro e as drenagens costeiras do Atlântico. São padrões encontrados em análises filogenéticas de grupos de espécies relacionadas que ocorrem em bacias costeiras e com as espécies de rios adjacentes pertencente ao escudo cristalino. Esses padrões sugerem que eventos de cladogênese envolvendo essas bacias ainda estão em curso. Em geral, esses padrões ocorrem no nível de espécies (sugere eventos recentes) do que em nível taxonômico maior (requer eventos mais antigos).

Segundo Ribeiro (2006) com a completa ruptura da Gondwana, a história dos rios da América do Sul da região do Atlântico começou. Estes rios formaram uma série de bacias hidrográficas isoladas conhecidas como “Drenagens Costeiras do Leste do Brasil”, esse grande sistema é formado pelos rios Paraguaçu, Contas, Jequitinhonha, Doce, Paraíba do Sul, Ribeira de Iguape, Itajaí e Jacuí e são separados por montanhas da margem oriental do escudo brasileiro cristalino. Os resultados deste presente estudo corrobora essa teoria, na qual todas as espécies de *Brycon* das drenagens costeiras e o gênero *Henochilus* formam um grupo monofilético. Somente a espécie *Brycon opalinus* da drenagem costeira ficou mais relacionada com *B. nattereri*.

Brycon opalinus ocorre em tributários dos rios Doce e Paraíba do Sul; *Brycon insignis* ocorre na bacia do Paraíba do Sul e alguns pequenos sistemas costeiros do estado do Rio de Janeiro. *Brycon ferox* e *B. vermelha* são endêmicas do rio Mucuri. *Brycon devillei* na divisa dos estados de Minas Gerais e Bahia. O gênero *Henochilus* ocorre nos rios Mucuri e Doce.

Lima (2001) fez algumas inferências em relação à simpatria de algumas espécies. Nos rios do leste, existe uma substituição ao longo da bacia, com uma das espécies ocorrendo nos rios menores, mais próximos às cabeceiras dos rios, enquanto que a outra prefere os grandes rios. Na bacia do Alto Paraná, *Brycon nattereri* é encontrado principalmente em rios de porte relativamente pequeno, principalmente na bacia dos rios Grande e Paranaíba, enquanto que *B. orbignyanus* é a espécie encontrada nos grandes rios como o Paraná. Na bacia do rio São Francisco a situação se repete, *B. nattereri* ocorre nos pequenos afluentes do rio das Velhas e *Brycon orthotaenia* nos grandes rios. *Brycon vermelha* é um peixe típico das porções superiores do rio Mucuri, enquanto *B. ferox* prefere o baixo curso desse mesmo rio. Na bacia do Paraíba do Sul, *Brycon opalinus* ocorre nos pequenos rios, enquanto *B. insignis* ocorre no rio Paraíba do Sul propriamente.

De acordo com Lima (2006), o gênero *Salminus* apresenta uma ampla distribuição através dos grandes sistemas hidrográficos da América do Sul cisandina (bacia Amazônica, Orinoco, Platina, e rio São Francisco) e também no maior rio transandino, o rio Magdalena (Colômbia). A espécie *Salminus iquitensis* é que apresenta a distribuição mais ampla, ocorrendo ao longo do sistema do Alto Amazonas, Orinoco, Araguaia/Tocantins e no rio Branco, em Roraima. É de se supor que a distribuição dessa espécie ou de outras que compartilham um padrão denominado “Alto Amazonas” ou “Amazônia Ocidental” estejam ligados aos eventos geomorfológicos que atuaram nessa porção da bacia. A presença dessa espécie na região do Orinoco é possivelmente um testemunho da conexão

prévia entre os sistemas do paleo-Amazonas e do paleo-Orinoco, separados pelo soerguimento do arco de Uaupés e de Serrania de la Macarena, evento esse que iniciou há cerca de 11MA (Lundberg *et al.*, 1998).

Salminus hilarii espécie encontrada nos rios das bacias São Francisco e Paraná. Segundo Lima (2006) na bacia do Paraná, essa espécie é virtualmente restrita à província biogeográfica conhecida como “Alto Paraná”, uma bem definida área de endemismo de peixes, que abrange a porção da bacia acima do Salto de Sete Quedas, hoje inexistente devido ao reservatório de Itaipu. O salto de Sete Quedas formou-se em um processo aparentemente abrupto geologicamente, ocorrido no Quaternário (cerca de 1MA) e desde então recuou de sua posição original através de um processo de erosão remontante (Bartorelli, 2004). A presença dessa espécie no rio São Francisco talvez se deva a um intercâmbio faunístico relativamente recente provocado por captura de drenagens na região de divisor de águas das duas bacias (Lima, 2006). Porém, há registros dessa espécie no rio São Francisco antes de 1960, ano que começaram a transpor o rio Piumhi (bacia do Paraná) para o São Francisco (Moreira Filho e Buckup, 2005).

Esse resultado pode ser comparado com os de Montoya-Burgos (2003) na qual algumas espécies de *Hypostomus* eram compartilhadas entre os rios Paraguai e São Francisco, e em suas análises filogenéticas esses grupos ficaram relacionados. Esse resultado sugere a influência de uma nova rota de dispersão e corrobora o intercâmbio faunístico entre Alto Paraguai e São Francisco por um evento de captura de cabeceiras que ocorreu há cerca de 6MA. Hubbert e Renno (2006) afirmam que a região do São Francisco é influenciada pelos sistemas do Maranhão e do Paraná-Paraguai.

Salminus brasiliensis distribui-se por toda a bacia Platina, não sendo a espécie ocorrente na região do Alto Paraná distinguível daquela ocorrente no resto da bacia. Na região do país é encontrada no rio Jacuí, uma drenagem que desemboca na Laguna dos

Patos. Esta bacia possui uma forte afinidade faunística com a bacia Platina, em particular o rio Uruguai e baixo rio Paraná (Lima 2006). No sistema do Alto Madeira, na Bolívia e Peru, é possível que essa espécie seja um remanescente da captura de uma porção da bacia do Paraguai pela bacia do paleo-Amazonas subsequente ao estabelecimento do arco de Michicola como divisor de águas entre estas bacias, no Mioceno tardio (Lundber *et al.*, 1998).

Salminus franciscanus é endêmico da bacia do rio São Francisco. Segundo Hubert e Renno (2006) a região do rio São Francisco é uma das onze áreas de endemismo da América do Sul. Além disso, estudos filogenéticos sugerem que a área de endemismo do São Francisco está isolada do Xingu-Tocantins e Parnaíba há 5MA (Costa, 2003; Montoya-Burgos, 2003).

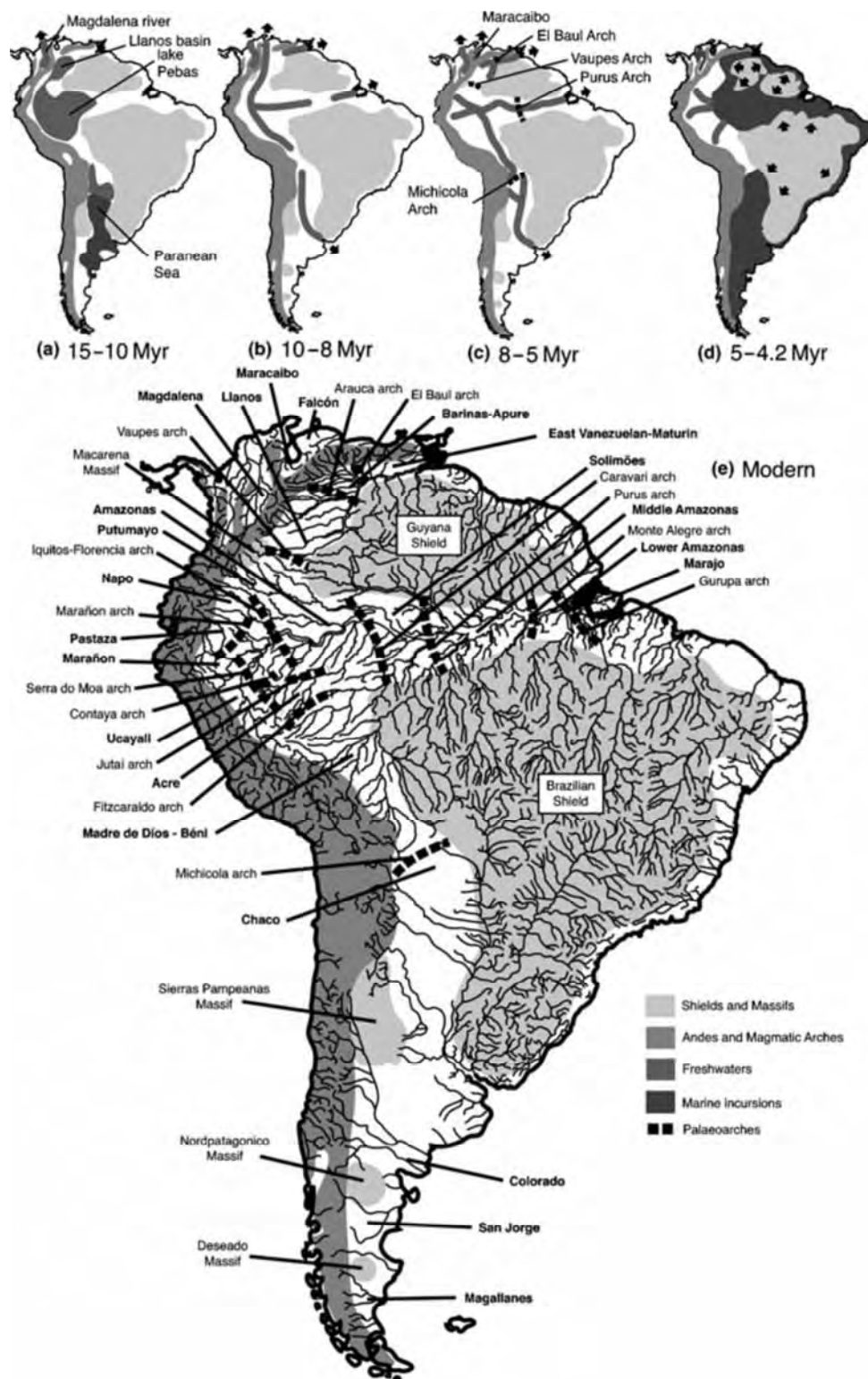


Figura 22 . Esquema de evolução dos sistemas de rios das América do Sul durante os últimos 15MA, de acordo com Gregory-Wodzicky (2000); Haq *et al.* (1987), Hoorn (1993, 1996), Hoorn *et al.* (1995); Lundberg *et al.* (1998), Nores (1999), Potter (1994), Räsänen *et al.* (1987, 1990, 1992, 1995), Räsänen e Linna (1996), and Wesselingh *et al.* (2002).

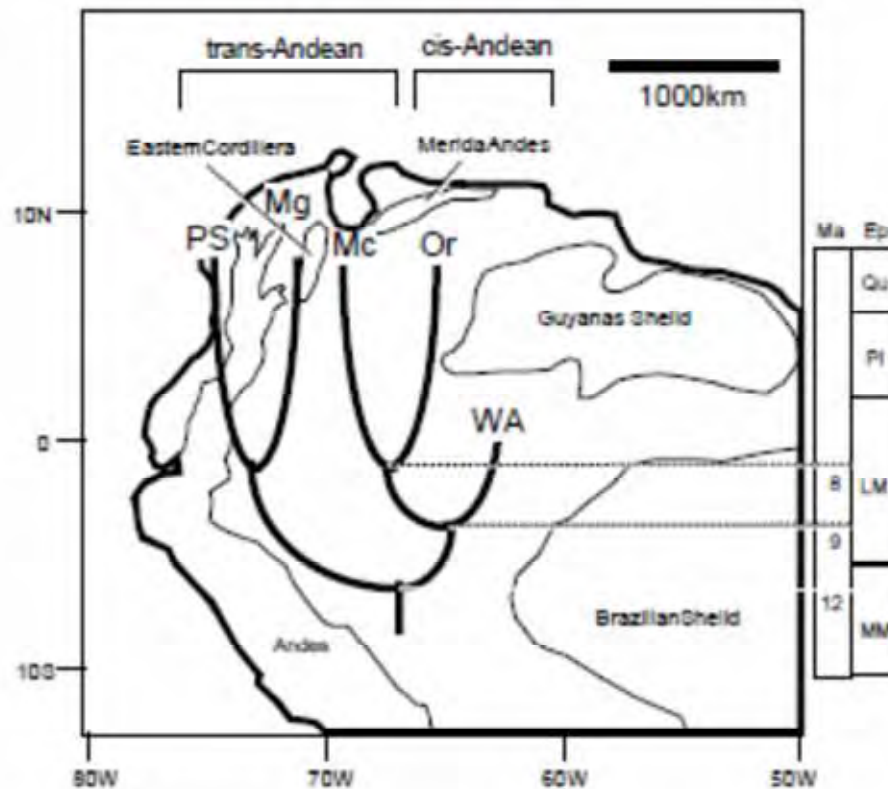


Figura 23. Modelo de esquema para o isolamento das drenagens das bacias da América do Sul resultante do tectonismo do Mioceno. A elevação da Cordilheira Oriental (12 MA) juntamente com a elevação dos Andes de Mérida (8 MA) foram os responsáveis por definir os limites das modernas drenagens da região Noroeste-Sul Americano, incluindo as bacias Amazônica, Orinoco-Maracaibo e Magdalena. Legenda: Orinoco (Or); Maracaibo (Mc); Magdalena (Mg); Região do Pacífico (PS); Amazônia Ocidental (WA); Ma milhões de anos, MM Médio Mioceno, LM Mioceno Tardio, PL Plioceno e QU Quaternário.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que:

1. Bryconinae e o gênero *Salminus* formam o grupo-irmão do clado formado pela família Gasteropelecidae e pelos gêneros *Triportheus*, *Engraulisoma*, *Lignobrycon*, *Agoniates* e *Clupeacharax*.
2. A subfamília Bryconinae não é monofilética, pois as espécies analisadas do gênero *Salminus* ficaram dentro da subfamília.
3. O gênero *Brycon* não é monofilético, pois *Henochilus wheatlandii* é grupo-irmão das espécies costeiras de *Brycon* e *Chilobrycon deuterodon* é grupo-irmão das espécies de *Brycon* transandinas analisadas nesse estudo.
4. Os grupos de *Brycon* cis e transandino não são monofiléticos, pois em nossas análises *B. moorei* ficou mais relacionado do grupo formado por espécies cisandinas.
5. As amostras de *Brycon pesu* formaram um grupo monofilético dentro de Bryconinae.
6. A análise futura de mais espécies de *Brycon*, principalmente as transandinas, será importante para um entendimento mais amplo das relações dentro do grupo.

Referências Bibliográficas

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, J.S., Lovejoy, N.R., Crampton, W.G.R. (2006). Miocene tectonism and the separation of cis- and trans-Andean river basins: Evidence from Neotropical fishes, *Journal of South American Earth Sciences* 21:14–27.
- Bartorelli, A. (2004). Origem das grandes cachoeiras do planalto basáltico da bacia do Paraná: evolução quaternária e geomorfologia. Pp. 95-111 in: Mantesso-Neto, V., A.
- Benine, R. C. (2004). Análise filogenética do gênero *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) com uma revisão dos táxons do alto Rio Paraná. Tese de Doutorado. 317pp. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil.
- Benine, R.C. (2000). Taxonomia e relações filogenéticas de *Gymnocorymbus ternetzi* Eigenmann, 1908 (Characiformes: Characidae). Dissertação de Mestrado. 80pp. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil.
- Berra, T.M. (1981). Na Atlas of distribution of the freshwater fish families of the world. University of Nebraska Press. 197 pp.
- Betancur-R R. (2009). Molecular phylogenetics and evolutionary history of ariid catfishes revisited: a comprehensive sampling. *BMC Evolutionary Biology*, 9: 175.
- Briggs, J.C. (2005) The biogeography of otophysan fishes (Ostariophysi: Otophysi): a new appraisal. *J. Biogeogr.*, 32: 287-294.
- Britski, H.A., Sato, Y., Rosa, A.B.S. (1984). Manual de identificação de peixes da região de Três Marias. Brasília, Câmara dos Deputados/CODEVASF, 115pp.
- Brown, T. A. (1999). Genética – um enfoque molecular. 3ªed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 336 pp.
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A., Wilson, A.C. (1982). Mitochondrial DNA sequences of primates. Temp and mode of evolution. *J. Mol. Evol.*, 18: 225-239.
- Buckup, P. A. (2007): Triportheinae. In *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Edited by Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 43-44.
- Buckup, P.A. (1991). The Characidiinae: a phylogenetic study of the South American darters and their relationships with other characiform fishes. Tese de doutorado. University of Michigan, Ann Arbor. 391p.
- Buckup, P.A. (1998). Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophisy). Pp. 123-144. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P.,

- Lucena, Z.M., Lucena, C.A. (Eds.). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Edipucrs, Porto Alegre. 603 pp.
- Calcagnotto, D. (2004). Taxas de evolução e o relógio molecular. Pp 51-63. In: Mاتيoli, S.R. (Ed.). Biologia Molecular e Evolução. Holos Editora, Ribeirão Preto. 202 pp.
- Calcagnotto, D., Schaefer, S.A., DeSalle, R. (2005). Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. Mol. Phylogenet. Evol., 36: 135-153.
- Castro, R.M.C. (1984). Osteologia e relações filogenéticas de *Engraulisoma taeniatum* Castro, 1981 (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). São Paulo, Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, 156p.
- Castro, R.M.C., Vari, R.P., Vieira F. Oliveira C. (2004). A phylogenetic analysis and redescription of the genus *Henochilus* (Characiformes, Characidae). Copeia 2004:496-506.
- Castro, R.M.C., Vari, R.P. (1990). *Moojenichthys* Miranda-Ribeiro (Pisces: Ostariophysi: Characidae), a phylogenetic reappraisal and redescription. Proc. Biol.Soc. Wash. 103 (3):525-542.
- Castro, R.M.C., Vari, R.P. (1990). *Moojenichthys* Miranda-Ribeiro (Pisces: Ostariophysi: Characidae), a phylogenetic reappraisal and redescription. Proceedings of the Biological Society of Washington, 103(3):525-542.
- Chao, L.N, Petry, P., Prang, G., Sonneschien, L., Tlustý, M. (2001). Conservation and management of ornamental fish resources of the rio Negro basin, Amazonia, Brazil. Manaus, Editora da Universidade do Amazonas. 310 pp.
- Chiachio, M.C., Oliveira, C., Montoya-Burgos, J.I. (2008) Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 49: 606–617.
- Coney, P.J. (1982). Plate tectonic constraints on the biogeography of Middle America and the Caribbean region. Annals Missouri Botanical Garden ,69:432–443.
- Costa, W.J.E.M. (2003). Family Rivulidae, pp. 526–548. In: Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris Jr., C.J. (Eds.), Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, 735 p.
- Cuvier, G. (1819). Sur les poisons du sous-genre *Hydrocyon*, sur deux nouvelles espèces de *Chalceus*, sur trois nouvelles espèces du *Serrasalmes*, et sur l' *Argentina*

- glossodonta* de Forskahl, qui est l'*Albula gonorhynchus* de Block. Mem. Mus. Natl. Hist. Nat., 5:351-379, Prs.26-28.
- Edgar R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput Nucleic Acids Research, 32: 1792-1797.
- Eigenmann, C.H. (1909). Some new genera and species of fishes from British Guiana (Repts. of the Expend. To B. Guiana of the Ind. Univer. and Carn. Museum 1908). Ann. Carn. Mus., 6:4-54.
- Eigenmann, C.H. (1910). Catalogue of the fresh-water fishes of tropical and south temperate America. Reports of the Princeton University Expeditions to Patagonia, 1896-1899, volume III, 2(4):375-511.
- Eigenmann, C.H.(1912). The freshwater fishes of Bristish Guiana, including a study of the ecological grouping of species and the relation of the fauna of the plateau to that of the lowlands. Memoirs of the Carnegie Museum, 5 (1): i-xxxii + 1-578, Prs.1-103.
- Eigenmann, C.H. 1916. On the species of *Salminus*. Annals of the Carnegie Museum, 10 (1-2): 91-92.
- Eigenmann, C.H. (1917). The American Characidae (Part I). Mem. Mus. Com. Zool. V.43 (pt1), p.1-102.
- Eigenmann, C.H., Myers, G.S. (1929). The American Characidae (Part 5). Memoirs of the Museum of Comparative Zoology, 43(5):429-558.
- Ericson, G.P., Zuccon, D., Ohlson, J.I, Johansson S., Alvarenga, H., Prum, R.O. (2006). Higher-level phylogeny and morphological evolution of tyrant flycatchers, cotingas, manakins, and their allies (Aves: Tyrannida). Mol. Phylogenet. Evol., 40: 471-483.
- Eschmeyer, W.N., Fricke, R., Fong, J.D., Polack, D.A. (2010). Marine fish diversity: history of knowledge and discovery (Pisces). Zootaxa, 2525: 19-50.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 39: 783-791.
- Felsenstein, J. (2004). Inferring phylogenies. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. 664pp.
- Fink, S.V., Fink, W.L. (1981). Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). Zool. J. Linn. Soc., London, 72: 297-353.
- Fink, S.V., Fink, W.L. (1996). Interrelationships of Ostariophysan Fishes (Teleostei). Pp.209-249. In Interrelationships of Ostariophysan Fishes. Stiassny, M.L.J., Parenti, L.R., Johnson, G.D. (Eds.) Academic Press, San Diego.

- Fowler, H.W. (1941). A collection of fresh-water fishes obtained in eastern Brazil by Dr. Rodolpho von Ihering. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 93: 123-199.
- García-París, M. Buchholz, D. R., Parra-Olea, G. (2003). Phylogenetic relationships of Pelobatoidea re-examined using mtDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 28: 12-23.
- Géry, J. (1964). Poissons characoides nouveaux ou non signalés de l'Ilha do Bananal. *Brésil. Vie et Milieu*. 17:448-475.
- Géry, J. (1972). Poissons characoides des Guyanes II. Famille des Serrasalminidae. *Zoologische Verhandlungen Leiden*, 122: 134-248.
- Géry, J. (1977). *Characoids of the world*. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey. 672 pp.
- Géry, J., Rham, P. de. (1981). Um nouveau Poisson Characidé endémique du bassin du Rio Tumbès au nord du Pérou, *Chilobrycon deuterodon* n.g.sp. (Characoidei). *Rev.fr.Aquariol.*, 8:7-12.
- Géry, J., L. Lauzanne. (1990). Les types des espèces du genre *Salminus* Agassiz, 1829 (Ostariophysi, Characidae) du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. *Cybium*, 14(2): 113-124.
- Gilbert, C., Ropiquet, A., Hassanin, A. (2006). Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): Systematics, morphology, and biogeography. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 40: 101-117.
- Gingras, M.K., Räsänen, M.E., Pemberton, G., Romero, L.P. (2002). Ichnology and sedimentology reveal depositional characteristics of bay-margin parasequences in the Miocene Amazonian foreland basin. *J. Sedimen. Res.*, 72:871–883.
- Goulding, M. (1980). *The fishes and the forest. Explorations in Amazonian natural history*. University of California Press, Berkeley, 280p.
- Granados-Riveron, J.T., Ghosh, T.K., Popel, M., Bu'Lock, F., Thornborough, C., Eason, J., Kirk, E., Fatkinm D., Feneley, M.P., Harvey, R. P., Armour, J.A.L., Brook, J. D.(2010). α -Cardiac myosin heavy chain (*MYH6*) mutations affecting myofibril formation are associated with congenital heart defects. *Hum. Mol. Genet.* first published online July 23, 2010 doi:10.1093/hmg/ddq315.
- Greenwood, P.H., Rosen, D.E., Weitzman, S.H., Myers, G.S. (1966). Phyletic studies of teleostean fishes with a provisional classification of living forms. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 131:339-456.

- Gregory-Wodzicki, K.M. (2000). Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. *Geological Society of America Bulletin*, 112:1091–1105.
- Günther, A. (1864). Catalogue of the fishes in the British Museum. Catalogue of the Physostomi, containing the families Siluridae, Characinidae, Haplochitonidae, Sternoptuchidae, Scopelidae, Stomiatidae in the collection of the British Museum. *Cat. Fishes* v.5:i-xxii + 1-455.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symp. Ser.*, Philadelphia, v.41, p.95-98.
- Haq, B.U., Hardenbol, J., Vail, P.R. (1987). Chronology of fluctuating sea levels since the Triassic. *Science*, 235, 1156– 1167.
- Hardman, M. (2004). The phylogenetic relationships among *Noturus* catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) as inferred from mitochondrial gene cytochrome *b* and nuclear recombination activating gene 2. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 30: 395-408.
- Hashimoto, D.T.; Ferguson-Smith, M.A.; Rens, W.; Bortolozzi, J.; Foresti, F.; Prado, F.D.; Porto-Foresti. (2009). Mapeamento cromossômico do gene RAG 2 (Recombination Activating gene) em *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes, Pimelodidae) 54º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil.
- Heckman, KL, Near, TJ, Alonzo, SH. (2009). Phylogenetic relationships among *Boleosoma* darter species (Percidae: Etheostoma). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53: 249-257.
- Hilsdorf, A.W.S., Azeredo-Espin, A.M.L., Krieger, M.H., Krieger, J.E. (2002). Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) from the Paraíba do Sul Basin, Brazil. *Aquaculture*, 214:81–91.
- Hilsdorf, A.W.S., Oliveira, C., Lima, F.C.T., Matsumoto, C.K. (2008). A phylogenetic analysis of *Brycon* and *Henochilus* (Characiformes: Characidae: Bryconinae) based on the mitochondrial gene 16S rRNA. *Genet. Mol. Biol.*, 31, 1 (suppl), 366-371.
- Hoorn, C. (1993). Marine incursions and the influence of Andean tectonics on the Miocene depositional history of northwestern Amazonia: results of a palynostratigraphic study. *Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology*, 105: 267–309.
- Hoorn, C., (1994a). Fluvial palaeoenvironments in the intracratonic Amazonas Basin (Early Miocene–Early Middle Miocene, Colombia). *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 109:1–54.

- Hoorn, C. (1994b). An environmental reconstruction of the palaeo-Amazon river system (Middle to Late Miocene, NW Amazonia). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 112:187–238.
- Hoorn, C., Guerrero, J., Sarmiento, G.A., Lorente, M.A. (1995). Andean Tectonics as a Cause for Changing Drainage Patterns in Miocene Northern South-America. *Geology*, 23:237–240.
- Hoorn, C. (1996) Miocene deposits in the Amazonian foreland basin. *Science*, 273, 122–123.
- Howes, G.J. (1982). Review of the genus *Brycon* (Teleostei: Characoidei). *Bulletin of the British Museum (Natural History), Zoology*, 43(1):1-47.
- Hubert, N., Bonillo, C., Paugy, D. (2005a). Early divergence among the Alestidae (Teleostei, Ostariophyses, Characiformes): Mitochondrial evidences and congruence with morphological data. *C. R. Biologies*, 328: 477-491.
- Hubert, N., Bonillo, C., Paugy, D. (2005b). Does elision account for molecular saturation: Case study based on mitochondrial ribosomal DNA among Characiform fishes (Teleostei: Ostariophysii). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 35: 300-308.
- Hubert, N., Renno, J.F. (2006). Historical biogeography of south American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, 33:1414–1436.
- Hubert, N., Duponchelle, F., Nuñez, J., Garcia-Davila, C., Paugy, D., Renno, J.F. (2007). Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical Ichthyofauna. *Molecular Ecology*. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03267.x.
- Hubert, N., Torrico, J.P., Bonhomme, F., Renno, J.F. (2008). Species polyphyly and mtDNA introgression among three *Serrasalmus* sister-species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 375–381.
- Irion, G., Müller, J., Nunes de Mello, J., Junk, W.J. (1995). Quaternary geology of the Amazonian lowland. *Geo-Marine Letters*, 15, 172–178.
- Irwin, D.M., Kocher, T.D. Wilson, A.C. (1990). Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.*, 32: 128-144.
- Iturralde-Vincent, M.A., MacPhee, R.D.E., 1999. Paleogeography of the Caribbean region: Implications for Cenozoic biogeography. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 1–95.

- 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: 498–511.
- Kner, R. (1860). Zur Familie der Characinen.III. Folge. Der Ichthyologischen Beiträge. Denkschr. Akad. Wiss, 18:9-62, Prs. 1-8.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 6196-6200.
- Lasso, C., Mojica, J.I., Usma, J.S., Maldonado-Ocampo, J.A., Nascimento, C., Taphorn, D.C., Provenzano, F., Lasso-Alcalá, Ó., Galvis, G., Vásquez, L., Lugo, M., Machado-Allison, A., Royero, R., Suárez, C., Ortega-Lara, A. (2004). Peces de la cuenca del río Orinoco. Parte I: Lista de especies y distribución por subcuencas. *Biota Colombiana* 5(2):95-158.
- Lavoué, S., Sullivan, J.P., Hopkins, C.D. (2003). Phylogenetic utility of the first two introns of the S7 ribosomal protein gene in African electric fishes (Mormyroidea: Teleostei) and congruence with other molecular markers. *Biol. J. Linn. Soc.*, 78: 273-292.
- Lewin, B. (2004). *Genes VIII*. Pearson Education. Inc., upper Saddle River, New Jersey. 1027pp.
- Li, W.H. (1997). *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts, 487pp.
- Li, C., Orti, G. (2007). Molecular phylogeny of Clupeiformes (Actinopterygii) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 44: 386-396.
- Lilystrom, C., Taphorn, D. (1983). Aspectos sobre la biología y conservación de la palambrina (*Brycon whitei*) Myers y Weitzman, 1960. *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología*, 1 (1):53-59.
- Lima, F.C.T., Castro, R.M.C. (2000). *Brycon vermelha*, a new species of characid fish from the Rio Mucuri, a coastal river of eastern Brazil (Ostariophysi: Characiformes). *Ichthyological Exploration of Freshwater*, 11(2):55-62.
- Lima, F.C.T. (2001). Revisão taxonômica do gênero *Brycon* Müller e Troschel, 1844, dos rios da América do Sul cis-andina (Pisces: Ostariophysi: Characiformes: Characidae). Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 312pp.
- Lima, F.C.T., Malabarba, L.R., Buckup, P.A., Silva, J.F.P., Vari, R.P., Harold, A., Benine, R., Oyakawa, O.T., Pavanelli, C.S., Menezes, N.A., Lucena, C.A., Malabarba, M.C.S.I., Lucena, Z.M.S., Reis, R.E., Langeani, F., Casatti, L., Bertaco, V.A., Moreira, C., Lucinda,

- P.H.F. (2003). Generea *Incertae sedis* in Characidae. In: Check list of the freshwater fishes of South an Central America/ Organized by R.E. Reis, S.O. Kullander e C. J. Ferraris Jr. Porto Alegre. EDIPUCRS. 742pp.
- Lima, F.C.T. (2003). Subfamily Bryconinae. In: Reis RE, Kullander SO and Ferraris CJ (eds) Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp 174-181.
- Lima, F.C.T. (2004). *Brycon gouldingi*, a new species from the rio Tocantins drainage, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae), with a key to the species in the basin. Ichthyol. Explor. Freshwaters, 15(3): 279-287.
- Lima, F.C.T. (2006). Revisão taxonômica e relações filogenéticas do gênero *Salminus* (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes: Characidae). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. 253 pp.
- Lima, F.C.T., Britski, H.A. (2007). *Salminus franciscanus*, a new species from the rio São Francisco basin, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). Neotropical. Ichthyology, 5(3):237-244.
- Lovejoy, N.R., Collete, B.B. (2001). Phylogenetic relationships of new world needlefishes (Teleostei: Belonidae) and the biogeography of transitions between marine and freshwater habitats. Copeia, 2001: 324-338.
- Lovejoy, N.R., Albert, J.S., Crampton, W.G.R. (2006). Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical Fishes. Journal of South American Earth Sciences, in press.
- Lucena, C.A.S. (1993). Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). Tese de Doutorado, Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da USP, 158 pp.
- Lucena, C.A.S. (1998). Relações filogenéticas e definição do gênero *Roeboides* Günther (Ostariophyso: Characiformes: Characidae). Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS. Série Zoologia, 11: 19-59.
- Lucena, C.A.S., Menezes, N.A. (1998). A phylogenetic analysis of the *Roestes* Günther and *Gilbertolus* Eigenmann, with a hypothesis on the relationships of the Cynodontidae and Acestrorhynchidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). Pp: 261-278. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A.S. (Eds.). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. EDIPUCRS, Porto Alegre.

- Lundberg, J.G. (1993). African-South American freshwater fish clades and continental drift: problems with paradigm. Pp 156-199. In: Goldblatt, P. (Ed.). Biological Relationships between Africa and South America. Yale University Press. New Haven. 630 pp.
- Lundberg, J.G., Marshall, L.C., Guerrero, J., Horton, B., Malabarba, M.C.S.L., Wesselingh, F. (1998). The stage for neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers, pp. 13–48. In: Malabarba, L., Reis, R.E., Vari, R.P., de Lucena, C.A.S., de Lucena, Z.M.S. (Eds.), Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Museu de Ciências e Tecnologia, Porto Alegre.
- Machado-Allison, A. (1983). Estudios sobre la sistemática de la subfamilia Serrasalminae (Pises, Characidae), parte II, Discusión sobre la condición monofilética de la subfamilia. Acta Biol. Venez., 11: 145-195.
- Maddison, D., Maddison, W. (2000). MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution. CD-ROM.
- Malabarba L.R. (1998). Monophyly of the Cheirodontinae, Characters and Major Clades (Ostariophysi: Characidae). In: Phylogeny and Classification of the Neotropical Fishes, 193-234. Porto Alegre, Edipucrs, 603p.
- Malabarba, L. R., Weitzman, S. H. (2003). Description of a new genus with six new species from Southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae). Comun. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS, Sér. Zool., 16 (1): 67-151.
- Margarido, V.P., P.M. Galetti Jr. (1999). Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). Genetics and Molecular Biology, 22(3): 357-361.
- Mariguela, T.C. (2009). Análise das relações filogenéticas entre os gêneros de Cheirodontinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) utilizando sequências de DNA mitocondrial e nuclear. Tese de doutorado. Instituto de Biociências de Botucatu, 159pp.
- Martin, A.P., Palumbi, S.R. (1993). Protein evolution in different cellular environments: Cytochrome b in sharks and mammals. Mol. Biol. Evol., 10: 873-891.
- Mirande J.M. (2009). Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). Cladistics, 25: 1–40.
- Mirande, J.M. (2010). Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. Neotropical Ichthyology, 8: 385-568.

- Monsch, K. A. (1998). Miocene fish faunas from the northwestern Amazonia basin (Colombia, Peru, Brazil) with evidence of marine incursions. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 143:31–50.
- Montoya-Burgos, J.I. (2003). Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, 12:1855–1867.
- Moreira, C.R. (2007). Relações filogenéticas na Ordem Characiformes (Teleostei: Ostariophysi). Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 485pp.
- Moreira-Filho, O., Buckup, A.P. (2005). A poorly case of watershed transposition between the São Francisco and upper Paraná river basins. *Neotropical Ichthyology*, 3 (3): 449-452.
- Moreira-Filho, O., Buckup, P.A. (2005). A poorly known case of watershed transposition
- Moyer, G.R., Burr, B.M., Krajewski, C. (2004). Phylogenetic relationships of thorny catfishes (Siluriformes: Doradidae) inferred from molecular and morphological data. *Zool. J. Linnean Soc.*, 140: 551–575.
- Müller, J. (1842). Beobachtungen über die Schwimmblase der Fische, mit Bezug auf einige neue Fischgattungen. *Arch. Ana. Physiol.*, for 1842: 307-329.
- Müller, J., Troschel, F.H. (1844). Synopsis generum et specierum familiae Characinorum. (Prodromus descriptionis novorum generum et specierum). *Arch. Naturgeschichte*, 10(1):81-89.
- Müller, J., Troschel, F.H. (1844). Synopsis generum et specierum familiae Characinorum (prodromus descriptions novorum generum et specierum). *Arch. Naturgesch.* 10:81-98.
- Müller, J., Troschel, F.H. (1845). *Horae Ichthyologicae. Beschreibung und Abbildung neuer Fische. Die Familie der Characinen. Erstes und Zweites Heft.* Berlin. *Horae Ichthyol.* Nos.1 e 2:1-40, Prs.1-11.
- Nahum, L.A. (2004). Evolução dos genomas. Pp. 82-96. In: Mاتيoli, S.R. (Ed.). *Biologia Molecular e Evolução.* Holos Editora, Ribeirão Preto. 202 pp.
- Near, T.J., Bolnick, D.I., Wainwright, P.C. (2004). Investigating phylogenetic relationships of sunfishes and black basses (Actinopterygii: Centrarchidae) using DNA sequences from mitochondrial and nuclear genes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32: 344-357.
- Nei, M., Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics.* Oxford University Press, New York, USA.
- Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the world.* 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 600 pp.

- Noonan, B.P., Chippindale, P.T. (2006). Dispersal and vicariance: The complex evolutionary history of boid snakes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 40: 347-358.
- Nores, M., (1999). An alternative hypothesis to the origin of Amazonian bird diversity. *Journal of Biogeography*, 26:475–485.
- Oettinger, M.A. Schwatz, D.G, Gorka, C, Baltimore, D. 1990. RAG1 and RAG2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248: 1517-1523.
- Orti, G., Petry, P., Porto, J.I.R., Jegu, M., Meyer, A. (1996). Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. *J. Mol. Evol.*, 42:169-182.
- Orti, G. Meyer, A. (1996). Molecular evolution of ependymin and the phylogenetic resolution of early divergences among euteleost fishes. *Mol. Biol. Evol.*, 13: 556-573.
- Orti, G., Meyer, A. (1997). The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Syst. Biol.*, 46: 75-100.
- Orti, G. (1997). Radiation of Characiform fishes: evidence from mitochondrial and nuclear DNA sequences. Pp: 219-243. In: Kocher, T.D., Stepien, C.A. (Eds.). *Molecular Systematics of Fishes*, London, Academic Press, 603 pp.
- Ortí G, Sivasundar A, Dietz K, Jégu M. (2008). Phylogeny of the Serrasalminae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1Suppl): 343-351.
- Palumbi, S.R. (1996). Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. Pp. 205-247. In: Hills, D.M., Moritz, C., Mable, B (Eds.). *Molecular Systematics* 2nd. ed., Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, 655pp.
- Perdices, A., Bermingham, E., Montilla, A., Doadrio, I. (2002). Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 25: 172–189.
- Pesole, G., Gissi, C., De Chirico, A., Saccone, C. (1999). Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol.*, 48: 427-434.
- Portugal, L.P.S. (1990). Revisão sistemática do gênero *Triportheus*, Cope (Teleostei: Characiformes: Characidae). Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Dissertação de Mestrado, 192p.
- Porzecanski, A.L. & Cracraft, J. (2005) Cladistic analysis of distributions and endemism (CADE): using raw distributions of birds to unravel the biogeography of the South American aridlands. *Journal of Biogeography*, 32, 261–275.

- Posada D., Crandall K.A. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14:817-818.
- Potter, P.E. (1994). Modern sands of South America: composition, provenance and global significance. *Geologische Rundschau*, 83: 212–232.
- Pough, F.H., Janis, C.M., Heiser, J.B. (2003). *A vida dos vertebrados*. 3° ed., Atheneu Editora. São Paulo. 699 pp.
- Quenouille, B., Bermingham, E., Planes, S. (2004). Molecular systematics of the damselfishes (Teleostei: Pomacentridae): Bayesian phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 31: 66–88.
- Räsänen, M.E., Salo, J.S. & Kalliola, R. (1987) Fluvial perturbation in the western Amazon basin: regulation by long-term sub-Andean tectonics. *Science*, 238:1398–1401.
- Räsänen, M.E., Salo, J.S., Jungner, H. & Pittman, L.R. (1990) Evolution of the western Amazon lowland relief: impact of Andean foreland dynamics. *Terra Nova*, 2, 320–332.
- Räsänen, M., Neller, R., Salo, J.S. & Jungner, H. (1992) Recent and ancient fluvial deposition systems in the Amazonian foreland basin, Peru. *Geological Magazine*, 129:293–306.
- Räsänen, M.E., Linna, A.M., Santos, J.C.R. & Negri, F.R. (1995). Late Miocene tidal deposits in the Amazonian foreland basin. *Science*, 269, 386–390.
- Räsänen, M.E., Linna, A.M. (1996). Miocene deposits in the Amazonian foreland basin. *Science*, 269, 386–390.
- Räsänen, M.E., Linna, A., Irion, G., Hernani, L.R., Huaman, R.V., Wesselingh, F. (1998). Geologia y geoformas de la zona de Iquitos. *Annales Universitatis Turkuensis Ser. A II* 114, 59–137.
- Reeves, R.G., Bermingham, E. (2006). Colonization, population expansion, and lineage turnover: phylogeography of Mesoamerican characiform fish. *Biological Journal of the Linnean Society*, 88, 235–255.
- Regan, C.T. (1911). The classification of the teleostean fishes of the order Ostariophysi – Cyprinoidea. *Ann. Mag. Nat. Hist.*, 8 (8): 13-32.
- Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C. (2003). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA)*, EDIPUCRS, Porto Alegre, 729 pp.
- Ribeiro, A.C. (2006). Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotrop. Ichthyol.*, 4(2):225-246.

- Roberts, T. (1969). Osteology and relationships of Characoid fishes, particularly the genera *Hepsetus*, *Salminus*, *Hoplias*, *Ctenolucius* and *Acestrorhynchus*. Proc. Cal. Acad. Sci., 36(15):391-500.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, 19:1572-1574.
- Ropiquet, A., Hassanin, A. (2005). Molecular evidence for the polyphyly of the genus *Hemitragus* (Mammalia, Bovidae). Mol. Phylogenet. Evol., 36:154–168.
- Saitoh, K., Miya, M., Inoue, J.G., Ishiguro, N.B., Nishida, M. (2003). Mitochondrial genomics of ostariophysan fishes: perspectives on phylogeny and biogeography. J. Mol. Evol. 56: 464–472.
- Saul, W.E. (1975). An ecological study of fishes at a site in upper Amazonian Ecuador. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 127: 93-134.
- Serra, J.P. (2003). Análise filogenética e revisão taxonômica de *Hasemania* Ellis, 1911 (Characiformes: Characidae). Dissertação de Mestrado. 148pp. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, Brasil.
- Spix, J.B. von, Agassiz, L. (1829-31). Selecta genera et species piscium quos in itinere per Brasiliam annos MDCCCXXVII-MDCCCXX jussu et auspiciis Maximiliani Josephi I... college et pingendo curavit Dr J. B. de Spix.. Monachii. Selecta Piscium Brasiliam: Parte1; i-xvi + i-ii + 1-82, Prs. 1-48:.,Parte2: 83-138, Prs.49-101.
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics, 22:2688-2690.
- Stamatakis, A., Hoover, P., Rougemont, J. (2008). A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. Syst. Biol., 57: 758-771.
- Steindachner, F. (1880). Zur Fisch-Fauna des Cauca und der Flüsse bei Guayaquil. Denkschr.Akad. Wiss. Wien, 42: 55-104, 9 prs.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J., Hillis, D.M. (1996). Phylogenetic inference. Pp. 407-514. In: Hillis, D.M, Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.). Molecular Systematics. Massachusetts, Sinauer Associates Inc, 655 pp.
- Swofford, D.L. (2003). PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 10.1093/molbev/msm092.

- Taylor, B.W., Flecker, A.S., Hall Jr., R.O. (2006). Loss of a harvested fish species disrupts carbon flow in a diverse tropical river. *Science*, 313: 833-836.
- Toledo-Piza, M. 2000. The Neotropical Wsh subfamily Cynodontinae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic study and a revision of *Cynodon* and *Rhaphiodon*. *Am. Mus. Novitates*, 3286.
- Uj, A. (1990). Etude comparative de l'osteologie cranienne des poissons de La famille Characidae et son importance phylogenetique. Tese de Doutorado. Faculté des Sciences de l'Université de Genève.
- Vari, R.P. (1988) The Curimatidae, a lowland Neotropical fish family (Pisces: Characiformes); distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. *Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns* (ed. by W.R. Heyer and P.E. Vanzolini), pp. 343–377. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- Vari, R.P. (1998). Higher level phylogenetic concepts within characiforms (Ostariophysi), a historical review. Pp. 111-122. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., 80 Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A. (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Edipucrs, 603 pp.
- Vari, R.P., Harold, A.S. (2001). Neotropical fishes of the genus *Creagrutus* (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic study and a revision of the species east of the Andes *Smithsonian Contributions to Zoology*, 612: 1-239.
- Vari, R.P., Ferraris Jr., C.J., Radosavljevic, A., Funk, V.A. (2009). Checklist of the freshwater fishes of the Guiana Shield. *Bulletin of the Biological Society of Washington*, 17:1-95.
- Veríssimo-Silveira, R., Gusmão-Pompiani, P., Vicentini, C.A., Quagio-Grassiotto, I. (2006). Spermiogenesis and spermatazoa ultrastructure in *Salminus* and *Brycon*, two primitive genera in Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). *Acta Zoologica*, 87:305-313.
- Viera, F., Alves, C.B.M., Santos, G.B. (2000). Rediscovery and first record of *Henochilus wheatlandii* (Teleostei: Characiformes) a rare neotropical fish, in rio Doce basin of southeastern Brazil. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 11(3):201-206.
- Vonhof, H.B., Wesselingh, F.P., Ganssen, G.M. (1998). Reconstruction of the Miocene western Amazonian aquatic system using molluscan isotopic signatures. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*, 141:85–93.
- Vonhof, H.B., Wesselingh, F.P., Kaandorp, R.J.G., Davies, G.R., van Hinte, J.E., Guerrero, J., Rasanen, M., Romero-Pittman, L., Ranzi, A. (2003). *Paleogeography of Miocene*

- Western Amazonia: Isotopic composition of molluscan shells constrains the influence of marine incursions. *Geological Society of America Bulletin*, 115:983–993.
- Webb, S.D. (1995). Biological implications of the Middle Miocene Amazon seaway. *Science*, 269:361–362.
- Weitzman, S.H. (1954). The osteology and relationships of the South American characoid fishes of the subfamily Gasteropelecinae. *Stanford Ichthyol. Bull.*, 4(1): 213-263.
- Weitzman, S.H. (1962). The osteology of *Brycon meeki*, a generalized characid fish, with an osteological definition of the family. *Stanford Ichthyol. Bull.*, 8(1): 1- 77.
- Weitzman, S.H., Vari, R.P. (1988). Miniaturization in South American freshwater fishes; an overview and discussion. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 101 (2): 444-465.
- Weitzman, S.H., Palmer, L. (1997). A new species of *Hyphessobrycon* (Teleostei: Characidae) from the Neblina region of Venezuela and Brazil, with comments on the putative “rosy tetra clad”. *Ichthyological Exploration Freshwater*. 7(3): 209-242.
- Weitzman, S.H., Menezes, N.A. (1998). Relationships of the Tribes and Genera of Glandulocaudinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) with a description of a new genus, *Crysobrycon*. Pp. 171-192. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A. (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Edipucrs, 603 pp.
- Weitzman, S.H., Menezes, N.A., Evers, H.G., Burns, J.R. 2005. Putative relationships among inseminating and externally fertilizing characids, with a description of a new genus and species of Brazilian inseminating fish bearing an anal-fin gland in males (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*. 3(3): 329-360.
- Wesselingh, F.P., Räsänen, M.E., Irion, G., Vonhof, H.B., Kaandorp, R., Renema, W., Romero Pittman, L. & Gingras, M. (2002) Lake Pebas: a palaeoecological reconstruction of a Miocene, long-lived lake complex in western Amazonia. *Cainozoic Research*, 1:35–81.
- Xia, X.; Xie, Z. (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity* 92: 371-373.
- Zanata, A.M. (2000). Estudo das relações filogenéticas do gênero *Brycon* Muller & Troschel, 1844 (Characidae; Characiformes). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 358 pp.
- Zanata, A.M., Vari, R.P. (2005). The family Alestidae (Ostariophysi, Characiformes): a phylogenetic analysis of a trans-Atlantic clade. *Zool. J. Linn. Soc.*, 145, 1–144.

Zarske, A., Géry, J. (1997). Rediscovery of *Agoniatès halecinus* Müller e Troschel, 1845, with a supplementary description of *Agoniatès anchovia* Eigenmann, 1914, and a definition of the genus (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes: Characidae). Zool. Abh, Mus. Tierkd., 49(10):174-184.

Anexo

Árvore final construída a partir da análise de Máxima Parcimônia. Os números nos nós representam valores de *bootstrap* obtidos na análise de máxima parcimônia (MP) e as probabilidades obtidas na análise Bayesiana (B), respectivamente. Os traços representam valores inferiores a 50%. Asteriscos representam os nós com diferentes topologias na análise Bayesiana.

