



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ CAMPUS
UNIVERSITÁRIO DO MARAJÓ – BREVES
FACULDADE DE CIÊNCIAS NATURAIS – FACIN

JESIANE TEIXEIRA VANZELER

**UTILIZAÇÃO DA FERRAMENTA DE DNA *BARCODING* PARA IDENTIFICAÇÃO
GENÉTICA DE RAIAS DA FAMÍLIA POTAMOTRYGONIDAE GARMAN, 1877 DO
MUNICÍPIO DE PORTEL - PARÁ.**

PORTEL-PA
2016

JESIANE TEIXEIRA VANZELER

**UTILIZAÇÃO DA FERRAMENTA DE DNA *BARCODING* PARA IDENTIFICAÇÃO
GENÉTICA DE ARRAIAS DA FAMÍLIA POTAMOTRYGONIDAE GARMAN, 1877
DO MUNICÍPIO DE PORTEL - PARÁ.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Naturais da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Naturais.

Orientador: Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales

PORTEL-PA
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- V217u Vanzeler, Jesiane Teixeira.
Utilização da ferramenta de DNA Barcoding para identificação genética de arraias da família Potamotrygonidae garman, 1877 do município de Portel Pará / Jesiane Teixeira Vanzeler, . — 2016.
28 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales
Trabalho de Conclusão (Graduação) - Universidade Federal do Pará,
Campus Universitário de Breves, Faculdade de Ciências Naturais, Breves,
2016.
1. Potamotrygonidae. 2. DNA barcoding. 3. Identificação molecular. 4. Espécies crípticas. I. Título.

CDD 597.098115

JESIANE TEIXEIRA VANZELER

**UTILIZAÇÃO DA FERRAMENTA DE DNA *BARCODING* PARA IDENTIFICAÇÃO
GENÉTICA DE ARRAIAS DA FAMÍLIA POTAMOTRYGONIDAE GARMAN, 1877
DO MUNICÍPIO DE PORTEL, PARÁ.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Naturais da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Naturais.

Orientador: Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Nicole Brand Ederli (Titular)
UFPA-Breves, FACIN.

Profª. Msc. Yrlene do Socorro Fereira (Titular)
UFPA, Campus Universitário de Bragança.

Portel (PA), 28 de Abril de 2016.

Dedico aos meus filhos, Maria Paula Vanzeler costa e Paulo José Vanzeler costa e aos meus pais, Maria de Fátima Teixeira e João Pereira Vanzeler.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo o que fez e continua fazendo em minha vida, jamais me abandonou e pelas bênçãos que me deu entre elas meus filhos que amo tanto, Maria Paula Vanzeler Costa e Paulo José Vanzeler Costa.

Agradeço a meus pais, Maria de Fátima Teixeira e João Pereira Vanzeler e meu marido José Wilker Coelho Costa, por se fazerem presentes em todos os momentos de minha vida, ajudando, apoiando, me incentivando a nunca desistir.

Agradeço a minha grande amiga de faculdade Rosiene Rodrigues Flores Torres pelo grande apoio durante o período do curso, onde passamos por tudo juntas, sorrimos, choramos, brincamos, nos divertimos. Pessoa que merece tanto quanto eu admiro-a pela sua coragem e força de vontade.

Agradeço a Universidade Federal do Pará, bem como a todos os professores da Universidade, guardarei lembranças significativas para toda vida.

Agradeço aos professores Horácio Schneider e Iracilda Sampaio pela disponibilidade de estrutura para a realização do trabalho, bem como a Msc. Yrlene Ferreira pelo auxílio nos procedimentos de laboratório. Em especial agradeço meu professor Dr. João Bráullio de Luna Sales por ter me orientado nesta pesquisa e pela paciência. Muito Obrigada.

RESUMO

As raias de água doce pertencem à família Potamotrygonidae, pertencem a um grupo monofilético de elasmobrânquios restritos as bacias de rios em regiões neotropicais compostos por um grupo de peixes muito diversificados na América do Sul e se encontram na maioria dos rios tropicais do continente. Estão presentes em todos os países da América do Sul, menos no Chile. Atualmente, as informações acerca das raias de água doce neotropicais apresentam-se ainda de forma incompleta, bem como dados taxonômicos, distribuição atualizada das espécies que compõe o grupo bem como sua atual relação filogenética, principalmente de regiões como a Ilha do Marajó e sua porção Ocidental. O grupo das raias marinhas também apresenta uma série de complicações taxonômicas, onde padrões de coloração de disco e forma, em muitos casos não são informativos a nível de espécie. Apesar do Brasil possuir um número significativo de taxonomistas, ainda existem grupos de espécies pouco estudadas, as quais podem apresentar espécies que não foram descritas e que precisam de identificação, o qual requer tempo, recursos e pessoas capacitadas para tal atividade. Por isso, a ampliação de estudos integrados com dados moleculares que possam facilitar o processo de identificação de espécies e resolver os problemas taxonômicos vem se intensificando ao longo do tempo. O DNA *barcoding* é um método rápido, eficiente e acessível globalmente para delimitar e identificar novas espécies. O benefício da técnica de DNA *barcoding* abrange não somente estudos taxonômicos, mas também filogenéticos e de genética de populações. Através dos resultados obtidos, é possível perceber que existem a presença de pelo menos três espécies de potamotrigonídeos na região da cidade de Portel, Ilha do Marajó: *Potamotrygon motoro*, *P. orbignyi* e *Paratrygon aireba*. Entretanto, quando comparadas as sequências do presente estudo com as disponíveis no *genbank*, percebe-se que *P. motoro* não é uma espécie monofilética, onde recentemente foi redescrita e limitada apenas a bacia do Rio Paraná-Paraguai. Desta forma a espécie presente na região de Portel provavelmente é uma espécie nova e ainda não descrita. Os resultados gerados são os primeiros a indicarem uma caracterização molecular da fauna de Potamotrigonídeos da região de Portel, indicando que novos estudos tanto morfológicos quanto genéticos são necessários para aumentar o conhecimento sobre as espécies da família Potamotrygonidae da região.

Palavras-chave: Potamotrygonidae, DNA *barcoding*, Identificação molecular, Espécies crípticas.

ABSTRACT

The freshwater stingrays belong to Potamotrygonidae family, are a monophyletic group of elasmobranchs restricted the river basins in neotropical regions composed of a group of very diverse fish in South America present in most tropical river continents. The species are present in all the countries of South America except Chile. Currently, basic information about the accurate taxonomic data and current distribution of the species that compose the group as well current phylogenetic relationship still lacking, especially in regions such as Marajó Island and its Western portion. Freshwater stingray's also presents a number of taxonomic complications where morphology shape of the disc as well the color pattern in many cases are not informative to species level. Although Brazil has a significant number of taxonomists, there are still groups of poorly known species, which may have species that not have been described and which need identification, which requires time, resources and trained people for such activity. Therefore, the expansion of integrated studies with molecular data that can facilitate species identification process and solve taxonomic problems has been increasing over time. DNA barcoding is a fast, efficient method globally used to define and identify new species. The benefit of DNA barcoding technique not only includes taxonomic studies, but also phylogenetic and population genetics. The results of the present study we identify at least 3 species Potamotrygonidae family in the region of Portel city, Marajó Island: *P. motoro*, *P. orbignyi* e *P. aireba*. However, when comparing the sequences of the present study with those available in GenBank, we found that *P. motoro* is not a monophyletic species, which was recently redescribed and limited only the basin of Paraná-Paraguay River. Thus this species from Portel city is probably a new species and not yet described. The results generated are the first molecular characterization of Potamotrygonidae fauna of Portel region, indicating that new morphological and genetic revisions are needed to increase knowledge about the fauna of Potamotrygonidae family species in the region.

Keywords: Potamotrygonidae, *DNA barcoding*, Molecular Identification, Cryptic Species.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

- Figura 1 - Forma corpórea (A), fendas brânquias ventrais (B) e cláspers (C) presentes em potamotrigonídeos..... 11
- Figura 2 - Distribuição dos gêneros da família Potamotrygonidae. Os asteriscos (azul) representam o gênero *Heliotrygon*, quadrados (verdes) representam o gênero *Paratrygon*, os triângulos (preto) *Plesiotrygon* e os círculos (vermelho) *Potamotrygon*. Cada símbolo pode representar mais de um espécime por localidade..... 13
- Figura 3 - Mapa do genoma mitocondrial humano (16.569 bp) com destaque para o citocromo c oxidase subunidade I (Modificado de Taanman, 1999)..... 15
- Figura 4 - Locais de amostragem dos indivíduos utilizados no presente estudo. Em vermelho, o município de Portel, Amazônia Oriental, em verde a região do município de Mosqueiro, nordeste paraense. Os números representam a quantidade de espécimes coletados por localidade..... 18
- Figura 5 - Arvore filogenética de Agrupamento de vizinhos (NJ) construída no programa MEGA 5.0. Os valores acima dos ramos são os suportes de *bootstrap*..... 21

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DA FAMÍLIA POTAMOTRYGONIDAE GARMAN, 1887.....	10
1.2	BIOGEOGRAFIA DESCRITIVA DAS RAIAS DE ÁGUA DOCE.....	12
1.3	UTILIZAÇÃO HUMANA E AMEAÇAS A DIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO.....	13
1.4	A FERRAMENTA DE <i>DNA BARCODING</i> E COMO ELA AUXILIA NA IDENTIFICAÇÃO E DESCOBERTA DA BIODIVERSIDADE.....	14
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1	AMOSTRAGEM.....	17
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA, PCR E SEQÜENCIAMENTO DE DNA.....	18
3.3	ALINHAMENTO DE DNA E ANÁLISE DOS DADOS.....	19
4	RESULTADOS.....	19
5	DISCUSSÃO.....	22
6	CONCLUSÃO.....	24
	REFERÊNCIAS.....	25

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA FAMÍLIA POTAMOTRYGONIDAE GARMAN, 1887.

As arraias de água doce pertencem à família Potamotrygonidae, são um grupo monofilético de elasmobrânquios restritos as bacias de rios em regiões neotropicais, compostos por um grupo de peixes muito diversificados na América do Sul e se encontram na maioria dos Rios tropicais do continente exceto aqueles que drenam em direção ao Pacífico. Estão presentes em todos os Países da América do Sul, menos no Chile (Rosa, 1985; Rosa *et al.*, 2010; Lasso *et al.*, 2014). Membros deste grupo são muito complexo do ponto de vista taxonômico e se classificam atualmente em quatro gêneros: O gênero monotípico *Paratrygon* Duméril, 1865, outros dois gêneros cada um com duas espécies (*Plesiotrygon* Rosa, Castello & Thorson, 1987 e *Heliotrygon* Carvalho & Lovejoy, 2011) e outro multiespecífico, o gênero *Potamotrygon* Garman, 1877).

De modo geral, são reconhecidas atualmente, sem contar as formas não descritas, 25 espécies de raias de água doce estando distribuídas nos quatro gêneros anteriormente citados: *Heliotrygon* (2 spp.), *Paratrygon* (1 sp.), *Plesiotrygon* (2 spp.) e *Potamotrygon* (20 spp.) (Lasso *et al.*, 2014). O Brasil é o com maior riqueza (17 sp.) seguido por Colômbia (11 sp.), Peru (10 spp.), Venezuela, Equador e Argentina (5 spp.), Paraguai (4 spp.), Uruguai (3 spp.) e finalmente Bolívia e as Guianas (Guiana, Suriname e Guiana Francesa) com duas espécies cada. No entanto é importante mencionar que ainda existem muitas lacunas geográficas de amostragem bem como, uma diversidade desconhecida no grupo, com espécies ainda a serem descritas nos gêneros *Heliotrygon*, *Potamotrygon* e *Paratrygon*, nas bacias do Brasil, Colômbia, Peru e Venezuela (Rosa, 1985; Almeida, 2008; Almeida *et al.*, 2009; Lasso *et al.*, 2014).

Morfologicamente, as espécies de raias de água doce são diferenciados de outras raias marinhas ou estuarinas (Dasyatidae e Urotrygonidae) por apresentar um processo prepélvico estendido ou alargado. O corpo apresenta forma de disco, podendo ser oval ou circular, com a região bucal deprimida, em posição ventral (Rosa, 1985) (Figura 1a). Apresentam cinco pares de fendas branquiais e um par de espiráculos branquiais dorsais (Figura 1b). As espécies apresentam dimorfismo sexual (forma corpórea e tipos de dentes) e assim como todos os Chondrichthyes, os machos apresentam os órgãos copulatórios chamados de “cláspers” para fecundação interna (Figura 1c). Os machos também podem realizar migrações durante

período reprodutivo (Lasso *et al.*, 2014).

Figura 1: Forma corpórea (A), fendas brânquias ventrais (B) e cláspers (C) presentes em potamotrigonideos.



Fonte: Imagens A e C, Macivaldo Aragão, B Jesiane Vanzeler.

Geralmente as espécies estão restritas a água doce, entretanto, existem espécies que podem tolerar certos níveis de salinidade (Charvet-Almeida, 2001; Rodríguez-Guerra *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2009), apresentando glândulas retais vestigiais, as quais são responsáveis pela excreção do excesso de sal e peixes marinhos cartilagosos, o que constitui uma evidência clara de um ancestral marinho (Lasso *et al.*, 2014). Potamotrigonideos ocupam uma série de habitats de água doce, incluindo a calha de grandes rios, praias, igapós, riachos com fundo argiloso ou pedregoso e lagos (Araújo, 1998). São predadores, alimentando-se, quando adultas, principalmente de peixes, pequenos crustáceos e moluscos enquanto os juvenis são capazes de se alimentar de insetos e pequenos crustáceos (Charvet-Almeida, 2006; Rincon, 2006; Toffoli, 2006).

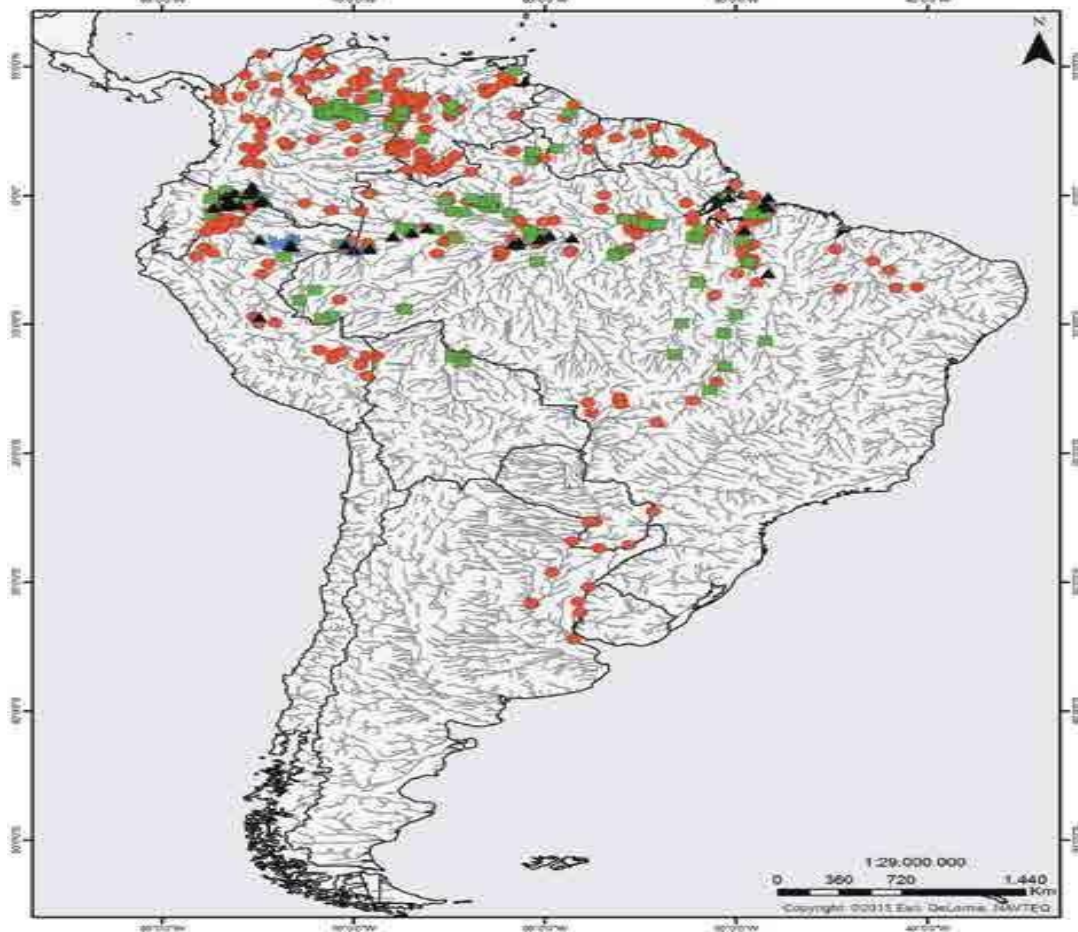
1.2 BIOGEOGRAFIA DESCRITIVA DAS RAIAS DE ÁGUA DOCE

Atualmente, as informações sobre das raias de água doce neotropicais apresentam-se ainda de forma incompleta, tais como dados taxonômicos, distribuição atualizada das espécies que compõe o grupo bem como sua atual relação filogenética (Lasso *et al.*, 2014). A família Potamotrygonidae se limita a região neotropical e se estende por vários rios que desembocam no oceano Atlântico, desde o rio Atrato, no norte da Colômbia até o Rio La Plata, entre Argentina e Uruguai (Rosa, 1985; Lasso *et al.*, 2014). Entretanto, esta distribuição na América Latina não é uniforme, onde existem lacunas entre os rios costeiros desde o rio Parnaíba, no nordeste do Brasil até algumas porções do Rio La Plata (Rosa *et al.*, 2010), bem como não há representantes da família na vertente Pacífica da cordilheira andina Ocidental, onde desta forma, o único país que até o momento não possui presença de espécies da família Potamotrygonidae é o Chile (Rosa 1985; Rosa *et al.* 2010).

Considerando a divisão zoogeográfica da América do Sul com base na fauna de peixes de água doce proposta por Eigenmann (1910) e modificada posteriormente por Géry (1969) e Lowe-McConnel (1975), os Potamotrygonideos estão representados nas regiões Orinoquia, Magdalênica, Transandina, Paraense, Guyano-Amazonica, estando ausentes nas regiões Patagônicas, Leste Brasileira e Transandina ao Sul da Colômbia (Rosa, 1985; Lasso *et al.*, 2014). A distribuição dos gêneros da família é distinta onde *Heliotrygon* e *Pleisiotrygon* são exclusivamente amazônicos tendo apenas *Potamotrygon* uma distribuição mais ampla, com presença na Amazonia, porções costeiras entre os rios Atrato na Colômbia e rio Parnaíba no Brasil, passando pelo rio Paraguai-Paraná, desembocando no Rio de La Plata (Lasso *et al.*, 2014) (Figura 2).

Na porção mais alta do Rio Paraná, incluindo os seus afluentes (Parapanema e Tietê no Brasil), sofreu uma invasão recente por espécies do gênero *Potamotrygon* após perturbações humanas, como construções de barragens, especialmente de Itaipú, fato que eliminou a barreira natural do Salto de Sete Quedas no rio Paraná (Haddad Jr. 2005; Toffoli, 2006, Garrone Neto *et al.*, 2007). O gênero *Paratrygon* esta presente tanto no porção amazônica quando no Orinoco enquanto observações recentes confirmaram a presença do gênero *Heliotrygon* nos afluentes do rio Orinoco na Venezuela (Carvalho & Lovejoy, 2011). Entretanto, a maior diversidade filogenética e riqueza de espécies se encontram na região amazônica (Lasso *et al.*, 2014).

Figura 2: Distribuição dos gêneros da família Potamotrygonidae. Os asteriscos (azul) representam o gênero *Heliotrygon*, quadrados (verdes) representam o gênero *Paratrygon*, os triângulos (preto) *Plesiotrygon* e os círculos (vermelho) *Potamotrygon*. Cada símbolo pode representar mais de um espécime por localidade.



Fonte: modificada de Lasso *et al.*, (2014).

1.3 UTILIZAÇÃO HUMANA E AMEAÇAS A DIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

Em alguns países como Venezuela, Brasil e Colômbia, estas espécies são alvo de pescas comerciais com objetivo de subsistência por parte das comunidades indígenas e rurais ao longo de sua área de distribuição (Lasso, 1985). Adicionalmente, possuem uma grande importância como recurso pesqueiro ornamental, especialmente na Colômbia, Peru e Brasil representando um aporte econômico muito importante para as comunidades locais. As espécies de raias de água doce são vivíparos placentários, “K” estrategistas, caracterizados por uma baixa fecundidade, crescimento lento, cuidado parental com parcial maturação, com eventos reprodutivos anuais (Lasso 1985; Charvet-Almeida *et al.*, 2005). Estas características os fazem muito vulneráveis frente aos impactos antrópicos como a pesca incidental, bem como o comércio para fins de consumo e sobre tudo, a pesca ornamental (Lasso *et al.*, 2014).

Pelo fato de habitarem preferencialmente ambientes de água doce os quais são mais restritos espacialmente que o ambiente marinho, fato este que limita suas oportunidades de evadir dos impactos antrópicos, como poluição das águas, destruição de habitats ou pesca (Campagno & Cook, 1995; Toffoli, 2006). Estes ambientes também apresentam parâmetros ambientais muito variáveis como flutuações de pH, temperatura e quantidade de oxigênio dissolvido. Os principais impactos que atingem populações de potamotrigonídeos são: a-pesca de subsistência, captura para aquarismo (ornamental); captura como fauna acompanhante (*bycatch*) e destruição de habitats (Araujo, 1998; Toffoli, 2006). Adicionalmente, pelo fato de possuírem ferrão com veneno os quais utilizam quando são pisadas, causando feridas muito doloridas, geralmente são mortas pelos mesmos ou têm a ponta de suas caudas cortadas (Toffoli, 2006). Estes fatores levaram por exemplo a prefeitura de Manaus, a mando da indústria do turismo, matar aproximadamente 21.000 raias para manter as praias livres de acidentes entre os anos de 2001 a 2004 (Charvet-Almeida *et al.*, 2002; Toffoli, 2006).

1.4 A FERRAMENTA DE DNA BARCODING E COMO ELA AUXILIA NA IDENTIFICAÇÃO E DESCOBERTA DA BIODIVERSIDADE.

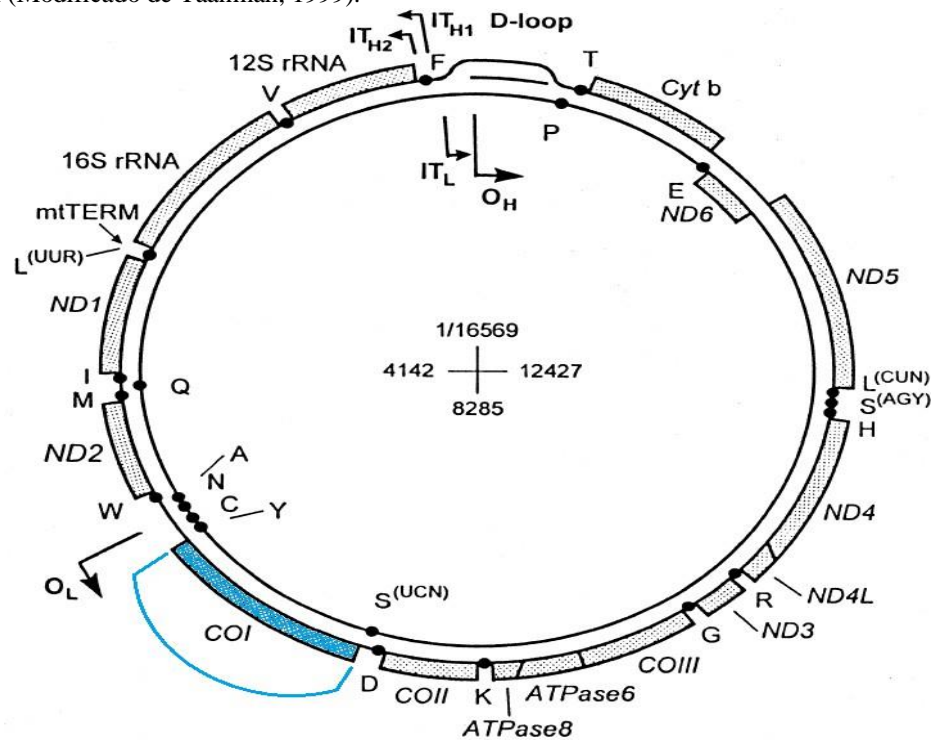
Apesar de o Brasil possuir um número significativo de taxonomistas, ainda existem grupos de espécies pouco estudadas, as quais podem apresentar espécies que não foram descritas e que precisam de identificação, o qual requer tempo, recursos e pessoas capacitadas para tal atividade. Por isso, a ampliação de estudos integrados com dados moleculares que possam facilitar o processo de identificação de espécies e resolver os problemas taxonômicos vem se intensificando ao longo do tempo (Silva, 2013).

Dentre as principais técnicas de identificação utilizadas neste sentido, está a identificação morfológica, principalmente usando caracteres merísticos. Entretanto muitas vezes um grupo específico pode apresentar ausência de caracteres morfológicos informativos para correta classificação das espécies, desta forma outras técnicas são necessárias para tal (Rocha, 2014). Pensando nisto a utilização de dados moleculares esta sendo essencial para facilitar a identificação de espécies (Herbert *et al.*, 2003). O DNA *barcoding* é um método rápido, eficiente e acessível globalmente para delimitar e identificar novas espécies (Herbert *et al.*, 2003; Ribeiro, 2006). O benefício da técnica de DNA *barcoding* abrange não somente estudos taxonômicos, mas também filogenéticos e de genética de populações (Silva, 2013).

A técnica de DNA *barcoding* utiliza o gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI), com um par de iniciadores universais para reação em cadeia da

polimerase (PCR) amplificando aproximadamente 650 pares de base (bp) do gene COI (Figura 2). Depois de sequenciada, esta região do espécime em questão pode ser comparada com outras sequências, como um código de barras de DNA, para se obter a identificação da mesma.

Figura 3: Mapa do genoma mitocondrial humano (16.569 bp) com destaque para o citocromo c oxidase subunidade I (Modificado de Taanman, 1999).



Fonte: Rocha (2014).

A sequência obtida de uma determinada espécie é armazenada em um banco de dados de vida online, o Barcode of Life Data Systems (BOLD) (www.bold.org) (Herbert *et al.*, 2003) ou então a plataforma GenBank disponível no endereço eletrônico (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para reunir em uma biblioteca online todas as sequências de peixes obtidas com o DNA barcoding, criou-se o Fish Barcode of Life Initiative (FISH-BOL), um banco de dados que armazena as sequências, imagens, coordenadas geográficas e informações importantes dos espécimes analisados, facilitando a identificação de espécies para os usuários do mesmo (Rocha, 2014). Este banco de dados compara a sequência atual com a sua biblioteca, se caso a sequência tiver uma similaridade considerável podemos dizer que a espécie foi identificada, caso contrário podemos ter uma nova espécie. É importante destacar que o DNA barcoding emprega o conceito filogenético de espécies (Rocha, 2014).

Mesmo com sua ampla distribuição e abundância na América do Sul, ainda existem

lacunas a cerca da composição de espécies atuais, realizados apenas prioritariamente com inferências morfológicas nos últimos anos (Rosa *et al.*, 2010; Carvalho e Lovejoy, 2011). Dentre os principais fatores atuantes nesta problemática, quatro podem ser listados: 1- Algumas descrições originais são incompletas (baseadas em apenas um único *voucher*); 2- possível existência de espécies híbridas; 3-Variabilidade intraespecífica nos padrões de coloração e por fim, 4-falta de coleções zoológicas representativas de suas amplas áreas de distribuição (Brooks *et al.*, 1981; Lasso *et al.*, 2014).

Desta forma, o presente estudo, através da ferramenta de DNA barcoding, pretende testar a utilizada da mesma na identificação de quais espécies de Potamotrygonidae ocorrem na região da cidade de Portel, permitindo assim, a detecção de possíveis espécies ainda não descritas, bem como ter indícios de quais são as espécies mais capturadas e comercializadas na cidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar as espécimes de raias de água doce da família Potamotrygonidae existente nos rios de Portel, nunca antes explorado, utilizando a ferramenta de DNA barcoding.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a eficiência do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I, como ferramenta de Identificação molecular para identificação de raias de água doce;
- Gerar sequências deste gene mitocondrial para os espécimes capturados;
- Inferir quais são as espécies que são capturadas com mais frequência na cidade de Portel-PA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

O município de Portel está localizado no estado do Pará o qual faz parte de um conjunto de pequenas ilhas chamado de Ilha do Marajó consistindo em aproximadamente 25.385 km² de área da unidade territorial, com 52.170 mil habitantes (IBGE, 2010). O município está a 326 km de distância da capital paraense, com acesso por via fluvial, onde o trajeto total dura cerca de 16 horas. As coletas foram localizadas nos Rios Anapú, Pacajá e Camarapi, seu deslocamento ocorre no sentido sul-noroeste do município. Os rios Pacajá e Camarapi lança suas águas na baía da cidade de Portel, já o rio Anapú lança suas águas na baía de Pracui e na Baía de Caxiuanã (Schaan & Martins, 2010). (Figura 3).

Espécimes de raias foram capturados através de espinhel, tendo o tempo entre colocação das redes e coleta dos animais de 24 horas, utilizando como isca pedaços de tecidos de mapará (*Hypophthalmus marginatus*), sendo coletados um total de 36 indivíduos. Os mesmo foram fotografados e as imagens foram utilizadas na identificação morfológica seguindo o guia mais atualizado proposto por Lasso *et al.*, (2014). Adicionalmente, um indivíduo foi coletado no município de Mosqueiro, no nordeste do Pará, o qual serviu como indivíduo *voucher* no presente estudo, totalizando 37 indivíduos utilizados. Os indivíduos coletados tiveram uma porção de tecido muscular retirada e acondicionada em tubos eppendorf contendo etanol a 100% de concentração. Posteriormente, os tecidos foram acondicionados em freezers a -10°C antes do procedimento de extração de DNA.

Figura 4: Locais de amostragem dos indivíduos utilizados no presente estudo. Em vermelho, o município de Portel, Amazônia Oriental, em verde a região do município de Mosqueiro, nordeste paraense. Os números representam a quantidade de espécimes coletados por localidade.



Fonte: Lasso *et al.*, (2014).

3.2 EXTRAÇÃO DE *DNA*, *PCR* E SEQÜENCIAMENTO DE *DNA*

O DNA foi isolado com a utilização do Kit Wizard Genomics DNA Purification (Promega Corporation, Madison, USA), seguindo-se o protocolo Mouse Tail. A partir da extração, foram realizadas as amplificações, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do gene Citocromo oxidase subunidade I – COI, utilizando os seguintes pares de primers: FishF1, 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' e FishR1, 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3' (Ward *et al.*, 2005). Os PCR's foram realizados com uma concentração final de 25 µl contendo: 0,5 µl de cada primer, 2 µl de MgCl₂, 4 µl de dNTP (1,25mM), 5,0 µl de 5x buffer, 0,2 µl de Taq polimerase (5U/µl) e o restante completado com água ultra pura.

As condições de amplificação dos PCR's foram as seguintes: 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 1 minuto; anelamento de 52 °C por 35 segundos; extensão a 72 °C por 90 segundos e uma extensão final foi realizada a 72 °C por 5 minutos. Para o

sequenciamento dos fragmentos obtidos, as PCR's serão previamente purificadas com a enzima ExoSAP-IT (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), e as reações de sequenciamento realizadas com os reagentes do Kit BigDye (Applied Biosystems) e então sequenciadas no sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems).

3.3 ALINHAMENTO DE DNA E ANÁLISE DOS DADOS

Todas as sequências de raias obtidas foram comparadas com os bancos de dados presentes no site Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e Fish-BOL (www.fishobol.edu.org). As sequências contidas nos dois portais eram exatamente iguais, desta forma, foram mantidas as sequências baixadas a priori do banco de dados do Genbank, sendo incorporadas ao banco de dados. As sequências obtidas foram alinhadas no programa BioEdit v.5.0.6 (Hall, 1999), através da ferramenta Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). A divergência genética foi calculada através do modelo de substituição Kimura 2 parâmetros (K2P) (Kimura, 1980), no programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). O critério de identificação estabelecido através da similaridade genética de pelo menos 99% de comparação entre as sequências obtidas e os bancos de dados utilizados. Uma árvore de agrupamento de vizinhos (NJ) (Saitou & Nei, 1987) foi construída no programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) com o intuito de fornecer uma representação das divergências entre as amostras analisadas. O suporte para os nós foi verificado através de 1.000 réplicas de bootstrap (Felsenstein, 1985).

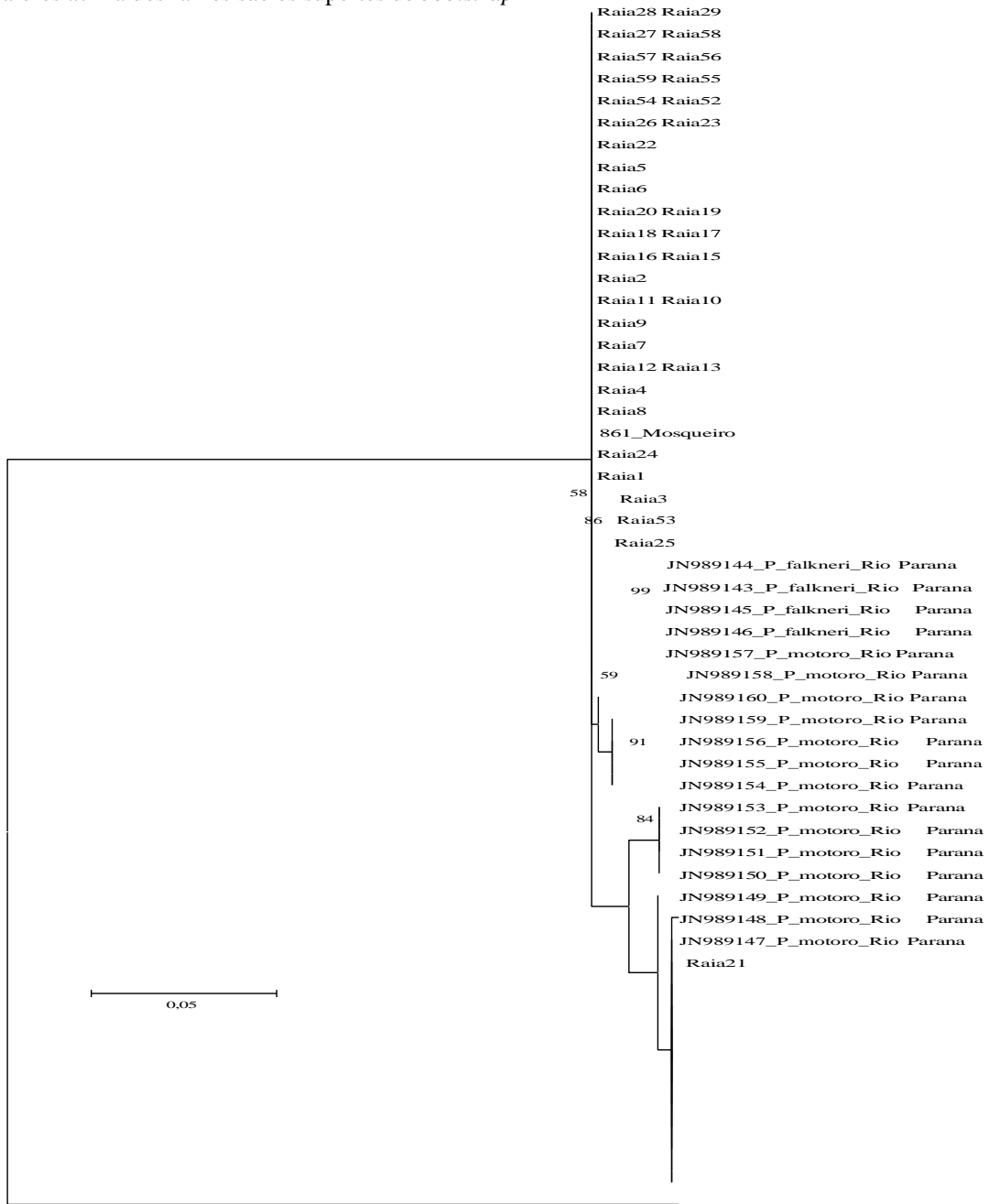
4 RESULTADOS

Foram obtidos um total de 631 pares de base do gene mitocondrial COI de todos os indivíduos analisados no presente estudo. Quando as sequências do presente estudo foram comparadas com as sequências presentes no site Genbank, foram adicionadas 18 sequências provenientes do trabalho de Pereira *et al.*, (2013). Sendo assim, o banco de dados resultante foi montado com um total de 55 sequências. Os resultados obtidos pela árvore de agrupamentos de vizinhos revelaram padrões interessantes a respeito da diversidade de espécies de Potamotrygonideos da região de Portel. Dos 36 indivíduos amostrados, 30, foram geneticamente identificados como *Potamotrygon motoro* Muller & Henle, 1841. Este resultado foi compatível com a identificação morfológica realizada previamente dos indivíduos amostrados com base na morfologia do disco e padrão de ocelos.

Quando comparamos as sequências obtidas e identificadas no presente estudo como *P. motoro* com as sequências da mesma espécie depositadas no *Genbank*, nossos resultados indicam a formação de dois grupos distintos dentro desta espécie. O primeiro, com todos os indivíduos amostrados no presente estudo e o segundo, constituído apenas por *P. motoro* provenientes da bacia do Rio Paraná. Esta separação entre as duas regiões é suportada por um valor intermediário de *bootstrap* (62 %) (Figura 4). Dentro das sequências de *P. motoro* provenientes do Rio Paraná, ainda é possível observar que uma sequência (JN 989157) difere geneticamente das outras sequências de *P. motoro* da mesma região, apresentando outra subestruturação dentro da região, apoiada por alto valor de suporte (88 %). Desta forma, de acordo com os dados do presente estudo, *P. motoro* não é uma espécie monofilética (Figura 4).

Cinco indivíduos coletados no presente estudo se mostraram geneticamente diferentes *P. motoro*, sendo identificados com base em sua morfologia como *Potamotrygon orbignyi* Castelnau, 1855 (Figura 4). Estes indivíduos apresentaram valores de *bootstrap* baixos em relação a *P. motoro*, entretanto, houve a formação de um segundo subclado dentro de *P. orbignyi*, este com valor de suporte mais alto (86%). Ao comparar estas sequências com as sequências disponíveis no *Genbank*, elas foram mais geneticamente similares as sequências de *Potamotrygon falkneri* Castex & Maciel, 1963. As sequências desta espécie foram agrupadas em nossa árvore filogenética mais proximamente relacionada à *P. motoro* da mesma bacia hidrográfica, formando um agrupamento com alto valor de suporte (99 %) (figura 4). No presente estudo, um indivíduo amostrado (Raia 21) apresentou sua sequência genética bastante contrastante com relação as outras sequências geradas pelos indivíduos amostrados. Comparando as imagens deste indivíduo, principalmente o formato do disco e presença de uma concavidade na porção superior do manto, este indivíduo foi classificado como *Paratrygon aireba* Muller & Henle, 1841. Provavelmente devido a presença de apenas um sequência no nosso banco de dados, os níveis de suporte obtidos não foram tão altos, entretanto a sequência de *P. aireba* não foi recuperada dentro do agrupamento das outras espécies de *Potamotrygon* no presente estudo (Figura 4).

Figura 5: Arvore filogenética de Agrupamento de vizinhos (NJ) construída no programa MEGA 5.0. Os valores acima dos ramos são os suportes de *bootstrap*



Os valores de distâncias nucleotídicas obtida no presente estudo reforçam o padrão de agrupamento obtido na árvore filogenética. A divergência dentro das amostras coletadas no presente estudo variaram entre 0 % a 0,6 % (entre alguns indivíduos e a amostra coletada em Mosqueiro). Entre os indivíduos de *P. motoro* do presente estudo e *P. motoro* do Rio Paraná, os valores variaram entre 1,7 a 2,3 %. Comparando as sequências de *P. motoro* com as outras espécies utilizadas no presente estudo, os valores variaram entre 0,4 % (quando comparado com a amostra Raia 24) a 0,6 % (indivíduos 1, 3, 25 e 53). A distância entre *P. motoro* do presente estudo e *P. aireba* variou entre 13,7 a 14,2 %. Quando comparada com *P. motoro* do Rio Paraná, estes valores aumentaram para 14,2 a 15,0 %.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro trabalho genético a caracterizar as espécies de raias de água doce que ocorrem na região ocidental da Ilha do Marajó, município de Portel. O uso de ferramentas moleculares para inferências genéticas nas raias de água doce é recente e pouco difundido ainda no Brasil. Toffoli *et al.*, (2008) realizando uma inferência genética da Família Potamotrygonidae no estado do Amazonas encontraram três espécies mais frequentes: *P. motoro*, *P. scobina* e *P. orbignyi*. Os dados moleculares deste estudo apontam que estas três espécies formam um complexo da “mancha em forma de roseta”, ou seja, as três espécies apresentam o padrão de manchas do dorso muito similares, além do fato de compartilharem haplótipos entre si. No presente estudo, a grande maioria dos indivíduos coletados na região do Portel foram identificados como *P. motoro* e poucos indivíduos de *P. orbignyi*, não havendo sido encontrado *P. scobina* na região. Lasso *et al.*, (2014) reportam para a região próxima a porção Oriental da Ilha do Marajó apenas as duas espécies encontradas no presente estudo, estando *P. scobina* restrita a porção Ocidental da ilha, próxima ao município de Soure. Almeida *et al.*, (2009), realizando os fatores que afetam a distribuição e abundância de potamotrigonideos na região Norte e Leste da Ilha do Marajó, nos municípios de Muaná, Afuá, Soure e Arari, também encontraram *P. scobina* no porção Leste da Ilha do Marajó. Os autores ainda conseguiram amostrar duas espécies de *Potamotrygon* ainda não descritas, tendo estas duas, características morfológicas distintas e outras espécies do gênero. No presente estudo, um indivíduo (Raia 24) se mostrou relativamente distinta das sequências de *P. motoro* e *P. orbignyi* (58 % em relação a *P. orbignyi*). Infelizmente não existem sequências moleculares do trabalho de Almeida *et al.*, (2009) que servisse para comparação genética com o intuito de verificar se nossa sequência possa ser uma destas duas espécies diferente

previamente identificadas pelos autores.

Os indivíduos coletado em Mosqueiro (861) que foi utilizado como voucher no presente estudo, se mostrou geneticamente idêntico aos indivíduos amostrados no presente estudo. Outros estudos também indicam que *P. motoro* é a espécie mais presente na região da Ilha do Marajó (Charvet-Almeida, 2001; Almeida, 2003, Carvalho *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2009; Lasso *et al.*, 2014). Quando nossas sequências foram comparadas com sequências de indivíduos provenientes do Rio Paraná, foi possível constatar uma distância genética elevada entre as sequências e formação de dois grupos de espécies geneticamente distintos, onde desta forma, *P. motoro* não foi recuperada como uma espécie monofilética. A presença de espécies crípticas, ou seja, espécies morfológicamente muito semelhantes, mas geneticamente distintas dentro de *P. motoro* já havia sido reportado anteriormente e, atualmente é fonte de debates (Toffoli, 2006; Toffoli *et al.*, 2008; Lasso *et al.*, 2014). Mais recentemente, Garcia *et al.*, (2015) realizando uma filogenia molecular das raias de água doce das bacias dos Rios Orinoco, Amazonas, Maracaibo, Magdalena e Esequibo através de três genes mitocondriais, também verificou que *P. motoro* constitui mais de uma espécie geneticamente distinta entre os rios Amazonas e Orinoco.

Recentemente Lobada & Carvalho (2013) realizaram a redescrição morfológica de *P. motoro*, restringindo a espécie apenas a bacia do Rio Paraná-Paraguai. Adicionalmente duas novas espécies crípticas dentro do complexo *P. motoro* foram descritas para a região: *Potamotrygon pantanensis* Lobada e Carvalho, 2013 e *Potamotrygon amandae* Lobada e Carvalho, 2013. O espécime original usado para descrição de *P. motoro* usado por Muller & Henle, 1841 foi descrito com base em seis indivíduos provenientes do Rio Guaporé, no estado do Mato Grosso. Os indivíduos analisados no estudo de Lobada & Carvalho (2013) são da bacia adjacente (Sistema Paraná-Paraguai), mesmo local de onde as sequências utilizadas no presente estudo provenientes do trabalho de Pereira *et al.*, (2013). Desta forma, a espécie *Potamotrygon motoro* coletada no presente estudo representa uma espécie geneticamente distinta de *Potamotrygon motoro* recentemente descrita e aceita, necessitando os indivíduos passarem por estudos morfológicos e genéticos adicionais.

O espécime de *Paratrygon aireba* coletado no presente estudo também já havia sido registrado para a região da Ilha do Marajó, entretanto apenas para a porção Leste da Ilha (Frederico *et al.*, 2012; Lasso *et al.*, 2014). Frederico *et al.*, (2012) analisando *P. aireba* de diferentes bacias amazônicas encontrou a formação de três grupos geneticamente distintos de *P. aireba*. Um grupo constituído por indivíduos provenientes do Rio Araguaia, um segundo grupo formado por amostras dos Rios Solimões, Amazonas e Negro e um terceiro grupo

formado apenas com indivíduos do Rio Xingu, cada um deles, amplamente suportado por valores altos de *bootstrap*. Infelizmente os autores utilizaram uma região diferente do gene COI o que impossibilitou a comparação de nossa sequência com o banco de dados utilizados pelos autores.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo é o primeiro a fornecer informações genéticas sobre a fauna de potamotrygonídeos da porção oriental da região do Marajó, cidade de Portel. Os dados gerados aqui também indicam a necessidade de revisão taxonômica de *Potamotrygon motoro*,

P. orbigny e *Paratrygon aireba*, presentes na região, devido as diferenças genéticas encontradas quando comparadas com sequências de outros estudos disponíveis do *genbank*. Através deste estudo, foi possível conhecer quais tipos genéticos estão presentes na região de Portel, entretanto, estudos adicionais são necessários para o conhecimento mais apurado em relação a fauna de potamotrygonídeos da região da Ilha do Marajó.

A ferramenta de códigos de barras de DNA se mostrou efetiva na discriminação entre as espécies, porém, sua eficiência foi mais elevada quando combinada com dados morfológicos, demonstrando que desta forma, a identificação morfológica também se faz necessária para confirmação do status taxonômico das espécies da família Potamotrygonidae.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M.P. **Pesca, policromatismo e aspectos sistemáticos de *Potamotrygon scobina*, Garman 1923 (Chondrichthyes, Potamotrygonidae) da região de Colares da Ilha de Marajó, Pará.** 2003. Dissertação de Mestrado. Pará. Universidade Federal do Pará & Museu Paraense Emílio Goeldi. 2003.
- ALMEIDA, M.P.; BARTHEM, R.B.; VIANA, A.S. & CHARVET-ALMEIDA, P. Factors affecting the distribution and abundance of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) at Marajó Island, mouth of the Amazon River. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, 4(1): 1-11. 2009.
- ARAÚJO, M.L.G. **Biologia reprodutiva e Pesca de *Potamotrygon* sp. (Chondrichthyes, Potamotrygonida), no Médio Rio Negro, Amazonas.** Dissertação de Mestrado. Manaus. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia & Universidade do Amazonas. 1998. 171p.
- BROOKS, D.R.; MAYES, M.A. & THORSON, T.B. Systematic review of cestodes infecting freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) including four new species from Venezuela. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, 48: 43-64. 1981.
- BRASIL. **Instituto Brasileiro de Estatística e Geografia (IBGE).** 2010. Municípios Brasil. Brasília. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidades>; Acesso em 10 de março de 2016.
- CARVALHO, MR.; LOVEJOY, N.R. & ROSA, RS. Family Potamotrygonidae (river stingrays). In: Reis, RE., Kullander, SO. & Ferraris CJ (Eds). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America.** EDIPUCRS. 2003. 22-28p.
- CARVALHO, M.R & LOVEJOY, N.R. Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **Zootaxa** 2776: 2011. 13-48.
- CHARVET-ALMEIDA, P. **Ocorrência, biologia e uso das araias de água doce na baía do Marajó (Pará, Brasil), com ênfase na biologia *Plesiontrygon iwamae* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae).** Dissertação de mestrado. Belém. Universidade Federal do Pará & Museu Paraense Emílio Goeldi. 2001. 213p.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M.L.G.; ROSA, R.S. & RINCON, G. Neotropical freshwater stingrays: diversity and conservation status. **Shark News**, 14: 1-2. 2002.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; ARAÚJO, M.L.G. & PINTO DE ALMEIDA, M. Reproductive aspects of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. **Journal Northwestern Atlantic Fisheries Sciences**, 35: 2005. 165-171

COMPAGNO, L.J.V. & COOK, S.F. The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. In: *The Biology of Freshwater Elasmobranchs*, a Symposium to Honor Thomas B. Thorson (Eds. Oettinger, M.I., Zorzi, G.D). **Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences**, v. 7. 1995. 62-90p

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, 39: 783-791. 1985.

FREDERICO, R.G.;FARIAS, I.P.;ARAUJO, M.L.G.;CHARVET-ALMEIDA, P. & ALVES GOMES, J.Á. Phylogeography and conservation genetics of the Amazonian freshwater stingray *Paratrygon aiereba* Muller & Henle, 1841 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **Neotropical Ichthyology**, 10 (1): 71-80. 2012.

GARCIA, DA.;LASSO, C.A.;MORALES, M. & CABALLERO, S.J. Molecular systematics of the freshwater stingrays (myliobatiformes: potamotrygonidae) of the Amazon, Orinoco, Magdalena, Esequibo, Carribean, and Maracaibo basins (Colombia-Venezuela): evidence from three mitochondrial genes. 2015. **Mitochondrial DNA**, DOI: **10.3109/19401736.2015.1101536**.

GARRONE NETO, D.;HADDAD JR, V.;VILELA, M.J.A. & UIEDA, V.S. Registro de ocorrência de duas espécies de potamotrigonídeos na região do Alto Rio Paraná e algumas considerações sobre sua biologia. **Biota Neotropica**, 7: 1-3. 2007.

HADDAD-JR, V. Ocorrência de arraias da família Potamotrygonidae no rio Paraná e relato da presença no rio Tietê: resultados preliminares. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia** 78: 3. 2005.

HALL, T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment edit and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41: 95-98. 1999.

HEBERT, P.D.N.;CYWINSKA, A.;BALL, S.L. & DEWAARD, J.R. Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*. **Biological Sciences**, 270: 313-321. 2003.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, 16: 111-120. 1980.

LASSO, C.A. Las Rayas de agua Dulce. **Nature**, 77: 6-9. 1985.

LASSO, C.A.; ROSA, R.S.; SÁNCHEZ-DUARTE, P.; MORALES-BETANCOURT, M.A. & AGUDELO-CÓRDOBA, E. **Rayas de agua Dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica. Parte I. Colombia, Venezuela, Ecuador, Peru, Brasil, Guyana, Surinam y Guayana Francesa: diversidad bioecología, uso y conservación.** Colombia. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia & Instituto de Investigación de los Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). Bogotá, D.C. 2013. 368 pp.

LOBADA, T.S. & CARVALHO, M.R. 2013. Systematic revision of the *Potamotrygon* motoro (Muller & Henle, 1841) species complex in the Paraná-Paraguay basin, with description of two new ocellated species (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae). **Neotropical Ichthyology**, 11 (4): 693-737.

PEREIRA, L.H.G.; HANNER, R.; FORESTI, F. & OLIVEIRA, C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. **BMC Genetics**, 14: 20. 2013.

RIBEIRO, T.D. **História evolutiva de espécies do gênero *Potamotrygon* Garman, 1877 (Potamotrygonidae) na Bacia Amazônica.** Dissertação de Mestrado. Manaus. Universidade Federal do Amazonas. 2006.

RICON-FILHO, G. **Aspectos taxonômicos, alimentação e reprodução da raia de água doce *Potamotrygon orbigny* (Castelnau) (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) no Rio Paraná-Tocantins.** Tese de Doutorado. Rio Claro. Universidade Estadual Paulista. 2006. 132p.

ROCHA, A.C.G. **Identificação Molecular (DNA Barcoding) de Peixes de igarapés da região Costeira do Nordeste Paraense.** Dissertação de mestrado. Pará: Bragança. Universidade Federal do Pará. 2014. 68p.

ROSA, R. **A systematic revision of South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonida).** Tese de Doutorado. Virginia. Williamsburg, College of William and Mary. 1985. 523pp.

RODRÍGUEZ-GUERRA, J.C.; LASSO, C.A. & LASSO-ALCALÁ, O.M. Aportación al conocimiento de la bioecología de la raya fluvio-estuarina *Potamotrygon* sp. (Myliobatiformes, Potamotrygonidae) em el delta del Orinoco y golfo de Paria, Venezuela. **Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales** 168: 83-104. (2008).

ROSA, R.S.; CHARVET-ALMEIDA, P. & QUIJADA, C.C.D. **Biology of South American potamotrygonid stingrays.** Pp. 241-86. In: Carrier, J.C., Musick, J.A. e Heithaus, M.R (Eds). *Sharks and their relatives II: Biodiversity, adaptative physiology and conservation.* Taylor & Francis Group, New York, USA. 2010.

SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstruction phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** 4: 406-425. 1987.

SILVA, T.F.S. **Aplicação do Sistema de Código de Barras de DNA para avaliar a biodiversidade amazônica: uma análise com peixes da ordem *Gymnotiformes***. Trabalho de Conclusão de Curso. Pará: Bragança. Universidade Federal do Pará, 2013. 37p.

TAANMAN, J.W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and Replication. **Biochemical Biophys. Acta**, 1410: 103-123. 1999.

TAMURA, K.;PETERSON, D.;PETERSON, N.;STECHEER, G.;NEI, M. & KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetic Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**. 2011.

THOMPSON, J.D.;GIBSON, T.J.;PLEWNIAK, F.;JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D.G. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. **Nucleic Acids Research**, 24: 4876-4882. 1997.