



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

**ALAN ÉRIK SOUZA RODRIGUES**

INFERÊNCIAS MOLECULARES EM *Anableps anableps* (Linnaeus, 1758)  
PROVENIENTES DA REGIÃO DE BREVES, ILHA DE MARAJÓ

BREVES-PA

2018

**ALAN ÉRIK SOUZA RODRIGUES**

**INFERÊNCIAS MOLECULARES EM *Anableps anableps* (Linnaeus, 1758)  
PROVENIENTES DA REGIÃO DE BREVES, ILHA DE MARAJÓ**

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: Dr. João Bráullio de Luna Sales.

**BREVES-PA**

**2018**

**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)**

---

R696i Rodrigues, Alan Erik Souza.  
Inferências moleculares em *Anableps anableps* (Linnaeus, 1758) provenientes da região de Breves, Ilha de Marajó Breves-PA / Alan Erik Souza Rodrigues. — 2018.  
30 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Ciências Naturais, Campus Universitário de Breves, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

1. Ilha de Marajó. 2. Peixe neotropical. I. Título.

CDD 572.817

---

**ALAN ÉRIK SOUZA RODRIGUES**

INFERÊNCIAS MOLECULARES EM *Anableps anableps* (Linnaeus, 1758)  
PROVENIENTES DA REGIÃO DE BREVES, ILHA DE MARAJÓ

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, aprovado com o conceito **Excelente**.

**Comissão Examinadora:**

---

Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales  
FACIN – CUMB, UFPA (Orientador).

---

Dr. Jonathan Stuart Ready  
UFPA, Belem-PA

---

Cintia Oliveira Carvalho  
Mestranda do PPGBE, Museu Goeldi

Breves (PA), 19 de dezembro de 2018.

*Aos meu pais, Olival Rodrigues e Luciete  
Moraes, aos meus irmãos e por fim aos meus  
amigos, Ryglenildo, Suéllem, Jó Salles e Arlan,*

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a todos os meus professores que passaram pela minha formação, desde a educação básica até o Ensino Superior. Em especial o meu grande amigo e Orientador, Dr. João Bráullio de Luna Sales que foi determinante para que eu desse continuidade ao curso mediante a tantos problemas e que, incansavelmente esteve comigo na realização deste trabalho.

Segundo, agradeço aos meus pais que nunca falharam comigo. Minha mãe, Luciete Souza Moraes, que acreditou em mim e me ajudou diretamente com apoio emocional durante todo o curso. Meu pai, Olival Bastos Rodrigues, que teve participação direta na realização deste projeto, me ajudou com as viagens, coletas, material, não media esforços quando íamos para lugares distantes e perigosos realizar coleta, devo muito a esse homem.

Agradeço muito às pessoas que incansavelmente me ajudarem sem cobrar um centavo como os meus amigos Djavan Santos, Rogério Pinheiro, meu tio Leonildo Moraes, que sempre que precisei estiveram dispostos a me ajudar. E também às novas amizades que fiz durante as viagens que perduram até hoje.

Aos meus colegas de curso, Gabriel Costa, Ciro Roniel Ribeiro, Diego Nunes, Nilson Carlos Gomes, Luiz Henrique Cazares, Suéllem Tenório, Poliana Nascimento e Renan Gibson, que tornaram esse período de quatro anos muito mais agradável de se conviver.

Sou grato a Faculdade de Ciências Naturais – Facin pela minha formação acadêmica e pelo excelente corpo docente.

Finalmente, agradeço a todos que duvidaram e acreditaram em mim por todo esse período e especialmente àqueles que diziam que isso não iria dar certo.

*“O que nós fazemos nunca é compreendido,  
mas somente louvado ou condenado”.*

Friedrich Nietzsche

## RESUMO

O correto conhecimento sobre a diversidade ictiologia da região Sul Ocidental do Atlântico ainda aparece como um desafio aos ictiólogos, em especial de regiões extensas e de difícil acesso como a região inserida na Ilha de Marajó. Grupos de peixes que apresentam ainda uma baixa capacidade de dispersão, associada a estilo de vida estuarino-residentes, podem muitas vezes esconder uma diversidade críptica ainda não inferida por métodos de sistemática tradicionais, como o caso da espécie *Anableps anableps*, conhecida como tralhoto. Nos últimos anos, o surgimento de ferramentas moleculares tem auxiliado na resolução de problemas acerca de fauna não descrita, em especial para grupos de peixes com morfologia conservada, provando-se uma ferramenta útil em estudos evolutivos e sistemáticos. O presente estudo tem como objetivo, caracterizar geneticamente a linhagem de *A. anableps* provenientes do Rio Tajapuru, na Cidade de Breves, Ilha de Marajó, através do gene mitocondrial Citocromo Oxidase, Subunidade I. Adicionalmente a estes indivíduos, foram baixadas sequencias disponíveis no portal GenBank e implementadas no banco de dados do presente estudo. Os resultados indicam a provável presença de linhagens novas de *A. anableps* na região do Rio Itapecuru no Maranhão, bem como no Rio Tajapuru em Breves. Os eventos do Plesitoceno podem ser os responsáveis pelo isolamento destas linhagens presentes nos rios interiores em relação as linhagens litorâneas encontradas em estudos anteriores, fato este reforçado pela característica biológica da espécie como baixa capacidade dispersiva.

**Palavras chaves:** Tralhoto, Rio Tajapuru, Linhagens crípticas, COI, Ilha de Marajó.

## ABSTRACT

The correct knowledge about of the ichthyology diversity of the South Western Atlantic region still appears as a challenge to the ichthyologists, especially of extensive regions and of difficult access as the region inserted in the Marajó Island. Some fish groups that have a low dispersal capacity, associated with estuarine-resident lifestyle, can often hide a cryptic diversity not yet inferred by traditional methods such as the *Anableps anableps*, known as tralhoto or four-eyed fish. In recent years, the utilizing of molecular tools has assisted in the resolution of sytematic issues, helping discover cryptic fauna, especially for groups of fish with preserved morphology, proving to be a useful tool in evolutionary and systematic studies. The present study aims to characterize genetically the lineage of *A. anableps* from the Tajapuru River, in the city of Breves, Marajó Island, through the mitochondrial gene, Cytochrome Oxidase, Subunit I. In addition to these individuals, available sequences were downloaded from the GenBank site and implemented in the database of the present study. The results indicate the probable presence of new lineages of *A. anableps* in the region of the Itapecuru River in Maranhão, as well as in the Tajapuru River in Breves. The Plesitocene events may be responsible for the isolation of these lineages that inhabits continental rivers in relation to the shore lineages found in previous studies, reinforced by the biological characteristic of the species as low dispersive capacity.

**Keywords:** Four-eyed-Fish, Tajapuru river, Cryptic lineages, COI, Marajo Island

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 -	Espécies do gênero <i>Anableps</i> . <i>A. anableps</i> (A); <i>A. microleps</i> (B) e <i>A. dowei</i> (C).....	12
Figura 2 -	Distribuição da Família Anablepidae. <i>Oxyzygonectes</i> em Vermelho, <i>Anableps</i> em Amarelo e <i>Jenynsia</i> em Verde.....	13
Figura 3 -	Divisão horizontal do olho do Tralhoto permitindo visão aérea e aquática simultaneamente.....	14
Figura 4 -	Principais características morfológicas do Tralhoto. Corpo alongado, cabeça achatada, listras horizontais, boca superior e terminal.	14
Figura 5 -	Mapa do o local de coleta.....	20
Figura 6 -	Árvore filogenética de ML contendo as amostras utilizadas no presente estudo.....	23

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÊNERO <i>Anableps</i> Scopoli, (1777) E DISTRIBUIÇÃO DE <i>Anableps anableps</i> .....	11
1.2	UTILIZAÇÃO DE TÉCNICA DE DNA DE CÓDIGO DE BARRAS.....	15
1.3	DIVERSIDADE ICTIOLOGICA DA REGIÃO DA ILHA DE MARAJÓ.....	16
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	18
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
3.1	OBJETIVO GERAL.....	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>4</b>	<b>MATERIAL E METODOS</b> .....	20
4.1	AMOSTRAGEM E PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS.....	20
4.2	ANÁLISES IMPLEMENTADAS.....	21
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	22
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	26
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27

## 1 INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a fauna de peixes neotropicais ainda representa um desafio a muitos pesquisadores, onde estimativas atuais indicam que muito pouco sobre a diversidade e composições de espécies é conhecido (Reis *et al.*, 2003). Algumas questões como a baixa disponibilidade de resoluções filogenéticas entre grupos de peixes (Vari & Malabarba, 1998) e até mesmo o elevado número de espécies que não apresentam características morfológicas plausíveis (Albert & Reis, 2011) estão ligados a essa problemática. Com isso há a necessidade de um número maior de pesquisadores a fim de identificar e catalogar corretamente as espécies ainda não descritas, o que pode fornecer um número correto sobre a diversidade de espécies que habitam uma dada região (BÖHLKE, *et al.*, 1978; REIS, *et al.*, 2003).

Cerca de 4.475 espécies de peixes foram descritas até o ano de 2013 a partir de estudos na região neotropical (Reis *et al.*, 2003), enquanto até o ano de 2011 houve um aumento significativo no número de espécies catalogadas, chegando a aproximadamente 6.000 (Albert & Reis 2011), entretanto este número pode ser ainda maior se for levado em consideração as espécies que ainda não foram descritas, (MARCENIUK, *et al.*, 2011). A região neotropical é reconhecida por ser uma área que possui uma diversidade grande de espécies de peixes, onde as ordens Characiformes e Siluriformes são os grupos de peixes mais comuns pertencente a ictiofauna da região (VARI & MALABARBA, 1998; OLIVEIRA, *et al.*, 2011).

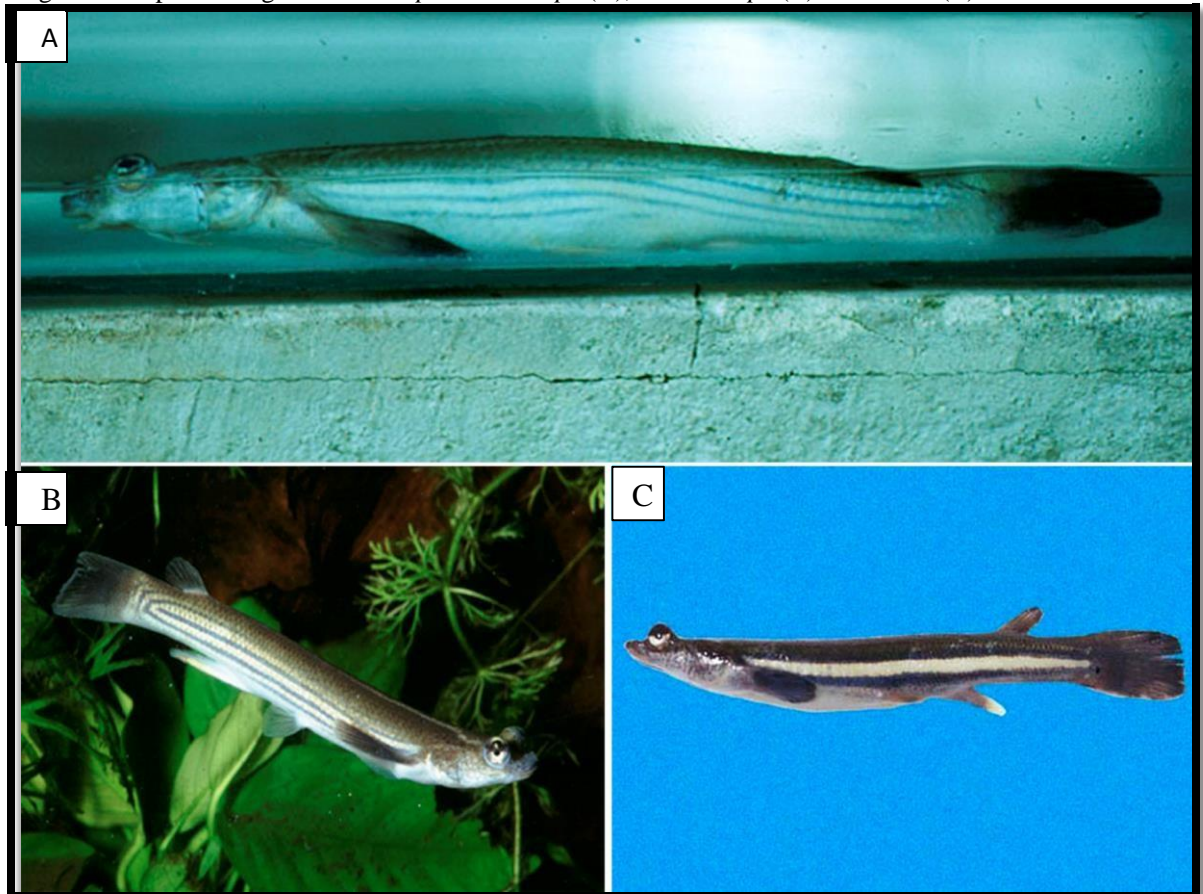
As Inferências moleculares são de extrema importância para podermos compreender as histórias evolutivas das espécies de uma determinada região, um exemplo é o trabalho de Watanabe *et al.*, (2014) que utilizou a região de controle mitocondrial como marcador para Inferências das espécies do gênero *Anableps* com sua área de estudo situado na Zona Costeira que corresponde a região Norte-Nordeste do Brasil.

### 1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÊNERO *Anableps* Scopoli, (1777) E DISTRIBUIÇÃO DE *Anableps anableps*

O gênero *Anableps* pertence à Família Anablepidae a qual é formada ainda por mais dois gêneros morfológicamente distintos: *Jenynsia* (Gunther, 1866) e *Oxyzygonectes* (Fowler, 1916) (Nelson, 2006). O Gênero *Anableps* é formado por três espécies: *Anableps anableps* (Linnaeus, 1758), *Anableps microlepis* (Muller & Troschel, 1844) e *Anableps dowi* (Gill, 1861).

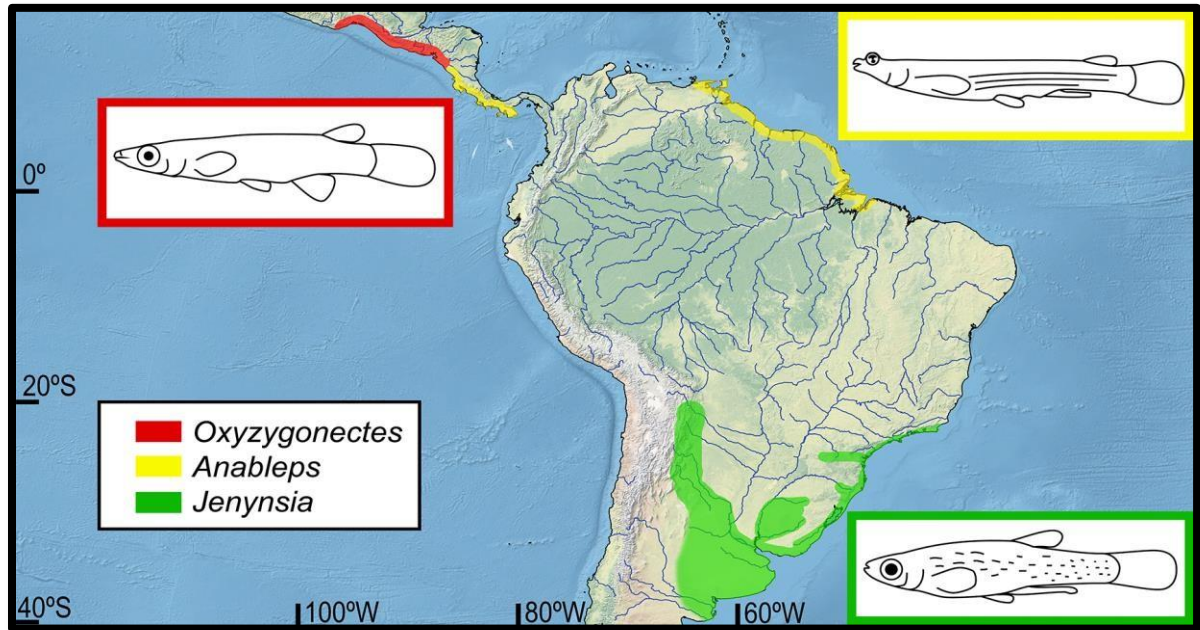
Na Figura 1 *A. microlepis*, e *A. anableps* são espécies simpátricas, apresentando também características morfológicas bem próximas, sendo ambos encontrados no lado do Atlântico na América do Sul, enquanto o *A. dowi* é uma espécie limitada a porção da América Central (Oceano Pacífico) sendo considerada a espécie mais basal do gênero (GHEDOTTI, 2003; AMORIM & COSTA, 2018)

Figura 1 - Espécies do gênero *Anableps*. *A. anableps* (A); *A. microlepis* (B) e *A. dowi* (C).



Fonte: Fishbase.

Figura 2 - Distribuição da Família Anablepidae. *Oxyzygonectes* em Vermelho, *Anableps* em Amarelo e *Jenynsia* em Verde.



Fonte: Modificado de Amorim & Costa, 2018.

Para as espécies do gênero que ocorrem no Atlântico, tanto *A. microleps* quanto *A. anableps* são conhecidas pelo mesmo nome comum (tralhoto), embora para algumas regiões como o norte do Brasil, *A. microleps* seja chamado de tralhoto da praia e *A. anableps* tralhoto do mangue ou simplesmente peixe de quatro olhos, assim conhecido popularmente por conta da divisão horizontal da sua retina permitindo visão aérea e aquática simultaneamente que é uma característica exclusiva do gênero *Anableps* (Figura 3), essas espécies vivem em estuários em regiões tropicais, no entanto pode ser encontrado em ambiente marinho (Nelson, 2006), não tendem a migrar por uma longa distância e costumam viver em grupos (CÉRVIGON, *et al.*, 1993).

São animais que não possuem uma alta importância comercial, porém possui pequena significância para o mercado de aquarismo, além de ser consumidos por pessoas de algumas localidades (CÉRVIGON, *et al.*, 1993). *A. anableps* é a espécie do gênero que apresenta a maior distribuição, se estendendo do Golfo de Pária na Venezuela até a região do Delta do Parnaíba (Cervigon, *et al.*, 1993) embora a espécie já tenha sido encontrada em regiões mais ao leste do Atlântico Sul Ocidental (Marcieniuk, *et al.* dados não publicados). São peixes que não atingem grandes proporções em tamanho, podendo chegar a 30cm e cerca de 400g, tendo corpo inteiramente alongado ou estendido, cabeça achatada, podendo apresentar algumas listas horizontais ao longo do corpo, com boca superior e terminal (GARMAN, 1985; WATANABE, 2010).

Figura 3 - Divisão horizontal do olho do Tralhoto permitindo visão aérea e aquática simultaneamente.



Fonte: Andreas Werth.

Figura 4 - Principais características morfológicas do Tralhoto. Corpo alongado, cabeça achatada, listras horizontais, boca superior e terminal.



Fonte: Autoria própria.

Apresentam dimorfismo sexual, onde o macho apresenta um menor tamanho e ainda a presença de um gonopódio tubular (diferenciação dos raios da nadadeira anal), o que facilita no momento da reprodução, uma vez que ele passa a transferir espermatozoides livres direto no canal reprodutivo das fêmeas (GRIER, *et al.*, 1981). As espécies são vivíparas, onde os peixes são liberados juvenis pelo canal reprodutivo feminino, não apresentando um período larval (NELSON, 2006). Outra característica marcante desse gênero é que os machos apresentam o gonopódio orientado para a direita ou para a esquerda sem que isso interfira no processo de copula com a fêmea já que a mesma é adaptada e não mostra uma distinção quanto a isso, ou seja, podem reproduzir com qualquer macho independente da orientação do gonopódio (GRIER, *et al.*, 1981).

As espécies que correspondem ao gênero *Anableps* possuem uma dieta variada, costumam se alimentar de partícula em suspensão, insetos, macroalgas e pequenos artrópodes. Tendem a entrar em área de mangue no período de maré cheia o que facilita a busca por alimentos e voltam para o leito do rio de acordo com a maré baixa, o qual corresponde o melhor período para observar esses peixes em maior número em ambiente estuarino (IKEDA, *et al.*, 2005; BRENNER & KRUMME, 2007).

## 1.2 UTILIZAÇÃO DE TÉCNICA DE DNA DE CÓDIGO DE BARRAS

Mediante a um número relativamente baixo de espécies identificadas se comparado ao número estimado de variedade existente, biólogos se depararam com a necessidade de desenvolver métodos que facilitassem a identificação das mesmas tentando fugir de maneiras tradicionais que se baseavam apenas em características morfológicas, fisiológicas e comportamentais dos indivíduos (Eiziriki, *et al.*, 2009), onde ao invés disso, foram desenvolvidas técnicas a nível molecular como dado o nome o *DNA Barcoding* ou código de barras de DNA (HEBERT, *et al.*, 2003)

O *DNA Barcoding* possui uma variedade de aplicações relacionadas a biologia, tais como: identificação de espécies crípticas (semelhantes morfologicamente) (Ribeiro, *et al.*, 2012), descobertas de novas espécies (Hebert, *et al.*, 2004), identificação de indivíduos invasores em ecossistemas (Costion, *et al.*, 2011), bem como aplicabilidade como uma ferramenta de controle de fraude em produtos pesqueiros (BRITO, *et al.*, 2015). São esses e outros fatores que elevam a importância e crescimento da utilização dessa ferramenta molecular como um meio de identificação rápida, confiável e padronizada a nível de espécie (EIZIRIKI, *et al.*, 2009).

De acordo com Hebert & Gregory (2005), o *DNA Barcoding* aplicado no reino animal poderia ter base na distinção de uma porção de um gene mitocondrial, especificamente a subunidade I do citocromo oxidase (COI ou *cox1*), gene com uma alta capacidade de discriminação entre espécies e oferece uma facilidade na amplificação, fragmento com cerca de 650pb (pares de bases) de extensão (HEBERT, *et al.*, 2003, 2004).

Pereira *et al.*, (2011) utilizou o DNA de Código de Barras para enriquecer os dados sobre a diversidade ictiológica de espécies de água doce para a região Neotropical com a espécie *Piabina argentea* sendo objeto de seu estudo, enquanto Pimenta Neto, (2013) fez uso dessa ferramenta molecular para a identificação de fraude comercial em pescados e derivados, tendo suas amostras coletadas em restaurantes de culinária japonesa. Estes são exemplos claros da aplicação do *DNA Barcoding* relacionada ao pescado.

Embora algumas pessoas possam ver a técnica com desconfiança (Ebach & Holdredge, 2005), esta não substitui a sistemática tradicional. As duas técnicas devem trabalhar juntas para um resultado mais apurado onde para forma implicações em diversas vertentes, além de chamar a atenção para a grande diversidade biológica, sendo ainda mais importante do ponto de vista de redução de tempo e esforços por partes dos sistematas em focar os esforços em grupos mais problemáticos de espécies (HEBERT, *et al.*, 2004; HEBERT; GREGORY, 2005, PEREIRA, *et al.*, 2013).

### 1.3 DIVERSIDADE ICTIOLOGICA DA REGIÃO DA ILHA DE MARAJÓ

A região do Marajó pode ser subdividida em duas, sentido leste e oeste, enquanto a porção leste corresponde as savanas amazônicas ou campos alagados, a região oeste pode ser definida como uma região de furos por conta de diversos canais, rios e pequenas ilhas (CRUZ, 1987; BRASIL, 1999). Caracterizadas como duas áreas bastante distintas, o conhecimento relacionado a diversidade ictiológica da área ainda precisa enriquecido, desde os primeiros trabalhos com o objetivo de catalogar espécies da região, como o de Boulenger (1897), ainda não se tem uma listagem satisfatória quanto a variedade íctica da fauna presente no arquipélago.

De acordo com Montag *et al.* (2009), foram catalogadas até então 254 espécies para campos alagados do Marajó, onde, as ordens Characiformes (29%), Siluriformes (25%), Perciformes (exclusivos de água doce) (13%) e Gymnotiformes (13%) representam 86% das espécies encontradas e depositadas na coleção ictiológica dos museus. Outras ordens como: Clupeiformes, Cyprinodontiformes, Pleuronectiformes, Rajiformes, Synbranchiformes,

Beloniformes, Osteoglossiformes, Tetraodontiformes e Lepidosireniformes somaram menos de 5% da representatividade com o total de 13% das espécies encontradas, uma delas pertencente à família Anablepidae, *A. microlepis* espécie irmã do *A. anableps* (objeto do presente estudo) sendo o único representante da Família para campos alagados, sendo encontrado próximo a região de Salvaterra, adjacente a zona costeira.

Um estudo feito por Barthem (1985) mostrou a riqueza de espécies presentes na baía de Marajó na região sul do arquipélago, segundo ele, foram capturadas e registradas 63 espécies de peixe quem fazem parte de 34 famílias, representando uma ictiofauna perene e sazonal com espécies marinhas e de água doce, ou seja, apresenta um fluxo de espécies relativamente elevado. A baía de Marajó, que faz parte de ambiente estuarino, recebe o fluxo do Rio Tocantins, de algumas afluentes e do Rio Amazonas através do trecho que corresponde ao estreito de Breves. Algumas espécies registradas no inverno por Barthem (1985) como as que fazem parte da Ordem Siluriformes e da Família Sciaenidae, podem ser encontradas no Rio Tajapuru, estreito de Breves, mas ainda assim não se tem um conhecimento muito grande sobre a diversidade ictiológica pertencente a região oeste (Afuá, Currálinho, São Sebastião da Boa vista, Breves e Anajás (CRUZ, 1987).

## 2 JUSTIFICATIVA

A região neotropical, como já citado, possui uma grande variabilidade de espécies que correspondem a ictiofauna, esses ambientes estão se tornando cada vez mais susceptíveis a ações antrópicas e isso apresenta um risco muito grande a conservação das espécies endêmicas da região. Ambientes estuarinos que correspondem a região neotropical servem de criadouro para diversas linhagens de peixes, podendo também incluir o Gênero *Anableps*.

O fato de *A. anableps* ter sido registrado em um ambiente relativamente distante do litoral como o Rio Tajapuru, próximo a cidade de Breves na Ilha de Marajó, pode levantar suspeitas acerca da validade desta espécie neste ambiente, visto que previamente, a mesma só era registrada em ambientes mais costeiros. Este fato ganha ainda mais importância devido ao fato da existência prévia de quatro linhagens mitocondriais distintas no litoral brasileiro, onde as populações de Breves, ainda não foram alvo de estudos moleculares, podendo tanto a população ser uma nova linhagem mitocondrial, como fazer parte de uma das linhagens anteriormente descritas.

Desta forma, a utilização de ferramentas moleculares como o *DNA barcoding* é de fundamental importância para a delimitação de uma possível nova linhagem do gênero ocorrendo na região, o que acarretaria no aumento da biodiversidade ictiológica da região.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo é utilizar o DNA de Código de Barras (*DNA Barcoding*) para analisar o status de *Anableps anableps* coletadas na região do Rio Tajapuru no município de Breves, ilha do Marajó, podendo estes indivíduos indicarem uma homogeneidade genética ao longo das porções dos litorais Norte-Nordeste do Brasil ou a presença de uma nova linhagem do gênero *Anableps*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a existência de uma sub estruturação genética ao longo da distribuição da espécie *A. anableps*;
- Verificar a eficiência do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) como marcador eficiente em identificar possíveis linhagens de *Anableps*.

## 4 MATERIAL E METODOS

### 4.1 AMOSTRAGEM E PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Foram coletadas 14 amostras de *A. anableps* utilizando rede de pesca (tarrafa) no Rio Tajapurú, no município de Breves, Ilha de Marajó durante o mês de Fevereiro de 2017 com três visitas ao local de coleta (Tabela 1, Figura 5). Os indivíduos coletados foram armazenados em gelo e trazidos ao Laboratório de Filogenômica da UFPA, Campus de Bragança para os procedimentos moleculares. Os indivíduos foram identificados com base na chave de Cervigon *et al.* (1993), onde posteriormente. Foi retirado um pedaço de tecido muscular de cada um e acondicionado em tubo *ependorf* contendo etanol absoluto, sendo armazenados em freezer a -4°C até o momento das extrações de DNA.

Figura 5 - Mapa do o local de coleta.



Fonte: Google Earth Pro.

O DNA genômico total foi obtido utilizando-se o Kit Wizard Genomics DNA Purification (Promega Corporation, Madison, USA), seguindo-se o protocolo Mouse Tail. A partir do DNA extraído, realizou-se a amplificação de um fragmento de 661bp da região 5' do gene Citocromo *c* oxidase subunidade 1 através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em um termociclador. Os primers utilizados para a amplificação foram Fish F1: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' e Fish R1: 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3' (WARD, *et al.*, 2005).

O mix de PCR para cada amostra utilizou uma solução com 7µl de H<sub>2</sub>O, 1µl de dNTP 1,25mM, 1µl de tampão 10X, 1µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1,5µl de cada primer (10µM), 1,5µl de Taq Polimerase (5U/µl) e 1µl de DNA totalizando 15,5 µl. O protocolo de amplificação consiste de desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 25s, anelamento a 50°C por 40s e extensão a 72°C por 45s, com extensão final de 72°C por 5 min. Para o sequenciamento dos fragmentos obtidos, as PCR's foram previamente purificadas com a enzima ExoSAP-IT (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), e as reações de sequenciamento realizadas com os reagentes do Kit BigDye (AppliedBiosystems) e então sequenciadas no sequenciador automático ABI 3500 (AppliedBiosystems).

#### 4.2 ANÁLISES IMPLEMENTADAS

As seqüências obtidas foram alinhadas através da ferramenta de alinhamento automático CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1997) implementada no programa BioEdit v. 7.0.4 (Hall, 1999). Posteriormente, as mesmas passaram por inspeção visual no intuito de corrigir quaisquer inconsistências. Sequências adicionais de *Anableps* foram disponibilizadas pela Dra. Luciana Watanabe provenientes de regiões do litoral brasileiro bem como baixadas no site Genbank e implementadas em nosso banco de dados, tendo *Oxyzygonectes dovii* como outgroup (Tabela 1).

Tabela 1 - Listagem de amostras do presente estudo e sequencias utilizadas.

<b>Especie</b>	<b>Codigo</b>	<b>Origem</b>	<b>GenBank</b>
<i>Oxyzygonectes dovii</i>	Odovii	Panama	MG937086
<i>Anableps microlepis</i>	Amicr	-	KY031536
<i>Anableps anableps</i>	Anab	-	LC154806
-	Anab2MA	Itapecuru, MA	-
-	Anab5MA	Itapecuru, MA	-
-	Anab6MA	Itapecuru, MA	-
-	Anab10MA	Itapecuru, MA	-
-	Anab11MA	Itapecuru, MA	-
-	Anab1Bra	Bragança, PA	-
-	Anab2Bra	Bragança, PA	-
-	Anab5Bra	Bragança, PA	-
-	Anab8Bra	Bragança, PA	-
-	Anab1Bre	Breves, PA	-
-	Anab2Bre	Breves, PA	-
-	Anab3Bre	Breves, PA	-
-	Anab4Bre	Breves, PA	-
-	Anab5Bre	Breves, PA	-
-	Anab6Bre	Breves, PA	-
-	Anab7Bre	Breves, PA	-
-	Anab8Bre	Breves, PA	-
-	Anab10Bre	Breves, PA	-
-	Anab11Bre	Breves, PA	-
-	Anab12Bre	Breves, PA	-
-	Anab13Bre	Breves, PA	-
-	Anab16Bre	Breves, PA	-
-	Anab17Bre	Breves, PA	-

Fonte: Pesquisa de campo.

Uma árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (MV), foi estimada no programa PhyML v.3.0 (GUIDON, *et al.*, 2010). Os modelos evolutivos mais adequados para cada banco de dados foram estimados no programa jModeltest 2 (DARRIBA, *et al.*, 2012). Para as análises de ML, o índice de confiabilidade dos ramos foi estimado através de 1000 réplicas de *bootstrap* não paramétrico (FELSENSTEIN, 1985).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises implementadas revelaram resultados interessantes com relação a identificação molecular dos tralhotos da região de Breves. As topologias de máxima verossimilhança e Inferência Bayesiana foram muito similares e desta forma, apenas a de máxima verossimilhança é mostrada. Todas as amostras utilizadas no presente estudo são referentes a *A. anableps*, entretanto, as árvores filogenéticas recuperaram três agrupamentos. Inicialmente, um grupo com a maior parte dos indivíduos provenientes tanto de Breves, quanto da região de Bragança, nordeste do Pará, Rio Itapecuru no Maranhão, e uma sequência proveniente do genbank foram recuperadas juntas num clado com alto valor de suporte (99%) (Figura 6).



muito grande, isso indica que eles passam o ciclo de vida restrito a áreas que oferecem condições físico-químicas e geográficas adequadas a esses indivíduos (BILTON, *et al.*, 2002).

Segundo Beheregaray & Sunnucks (2001), fatores ambientais como temperatura e salinidade da água estão ligados a baixa troca genética, isso pode acelerar o processo de adaptação de populações locais estuarinos. Esse fato pode explicar a tolerância de espécies viventes nesses ambientes efêmeros. Esses ambientes constantemente sofrem ações dependentes das dinâmicas das marés dos rios e sobretudo ações antrópicas, está última acarreta na mudança de conformidade do estuário dando origem à processos erosivos e deposicionais de sedimentos, entretanto, esses mesmos processos podem ocorrer de maneira natural (MIRANDA, *et al.*, 2002).

Uma das hipóteses para explicar a ocorrência desses indivíduos na porção do rio Tajapuru, área relativamente distante de ambientes costeiros, é que este encontra-se em um ecossistema de transição entre o Delta do Rio Amazonas e a área que corresponde ao perímetro da cidade de Curralinho - PA (Baía do Marapatá), mais próximo a zona de transição entre rio e mar, onde normalmente essa espécie é encontrada com maior frequência. Outro provável fator observado durante as coletas é, na medida em que subíamos o curso do rio em direção ao Delta do Rio Amazonas, a frequência desses indivíduos também aumentava, enquanto seguindo o curso abaixo do rio, não foi avistado nenhum indivíduo até ao final do Rio Buiúçu, onde espécie do gênero *Anableps* foi avistado com certa frequência a cerca de 10km da cidade de Bagre - PA. Desse modo, indica que, o forte fluxo do Rio Amazonas pode ter influenciado uma migração passiva de indivíduos assim formando três grupos com padrão filogenético distinto de outras regiões da Costa Norte e Nordeste do Brasil.

Os estudos de Watanabe, *et al.*, (2014) mostraram a formação de quatro grandes linhagens: Linhagem Viseu-Gurupi, Linhagem Pará, Linhagem Amazonas e Linhagem Amapá, nomeados de acordo com o seu possível centro de origem e distribuição geográfica. As áreas de estudos e amostragem situam-se em zona costeira e correspondem as regiões do Amapá – Ap, Calçoene – Ap, Santana – Ap, Soure – Pa, Curuçá – Pa, Maracanã – Pa, Salinas – Pa, Japerica – Pa, Quatipuru – Pa, Bragança – Pa, Viseu – Pa, São Luis – Ma, Delta do Parnaíba – Pi, enquanto o campo de amostragem do presente estudo situou-se apenas na região de Breves – PA, o qual faz parte da região oeste da Ilha de Marajó, caracterizada como uma região de furos (Cruz, 1987) que ainda apresenta um conhecimento muito raso sobre a sua riqueza ictiológica. Infelizmente, o marcador utilizado por Watanabe, *et al.*, (2014) é diferente do presente estudo, enquanto Watanabe, *et al.*, (2014) utilizou a região de controle, o marcador usado no presente estudo foi o COI.

Porém, dois fatos no presente estudo chamam atenção: Indivíduos provenientes do Rio Itapecuru, no estado do Maranhão, formaram dois clados com valores de suporte moderado. O primeiro, contendo três indivíduos e o segundo, junto com algumas sequências de Bragança, porém com baixo suporte. Provavelmente, no segundo caso, estes indivíduos corresponderiam a linhagem quatro encontradas por Watanabe, *et al.* (2014), contendo indivíduos de (Caeté, Japerica, Gurupi, Quatipuru, São Marcos e Parnaíba), entretanto, no caso da primeira, provavelmente se trata de uma linhagem nova. Para as amostras provenientes de Breves, visto que não temos as sequências de Watanabe, *et al.*, (2014) amplificadas no mesmo marcador, algumas hipóteses são possíveis: 1-A linhagem que ocorrem em Breves, pode ser correspondente a linhagem 1 de Watanabe (Caete, Calçoene e Amapá); 2-A linhagem de Breves pode ser correspondente a linhagem 3 (Paracauari, Curuça, Urindeua e Maracana); 3-A linhagem que ocorre em Breves é distinta das encontradas anteriormente por Watanabe *et al.*, (2014).

Levando-se em consideração o hábito estuarino-residente da espécie, bem como a baixa capacidade de dispersão, atrelada a aparente presença de uma outra linhagem no rio Itapecuru-MA mostrada aqui, provavelmente, a linhagem de Breves deve ser distinta em relação as outras. Nossos resultados indicam que possivelmente a ocorrência de *A. anableps* no litoral e em regiões de rios interiores está atrelada a efeitos do Pleistoceno, onde estes indivíduos foram isolados durante este período. Para estudos futuros, deve-se aumentar a amostragem de indivíduos ao redor da Ilha de Marajó, visto que há relatos da ocorrência da espécie nos municípios de Chaves e Afuá, bem como amplificação de mais marcadores para a inferência completa da história evolutiva de *A. anableps* no Atlântico Sul Ocidental.

## 6 CONCLUSÃO

O uso do *DNA barcoding* para inferência molecular em espécies estuarinas se mostrou muito eficaz. Os resultados indicaram uma possível nova linhagem de peixes do Gênero *Anableps* para a região de Breves, evidenciando a eficiência do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) como marcador, elevando ainda mais a importância da utilização de ferramentas moleculares para identificação a nível de espécie em uma área com um conhecimento ictiológico muito baixo como a do presente estudo. Lembrando que a utilização dessas técnicas não exclui os métodos de sistemática tradicionais, mas sim oferece ainda mais suporte e confiabilidade no processo de descrição e composição da ictiofauna estuarina, dessa forma incrementando de maneira significativa o conhecimento sobre a diversidade íctica para a região neotropical.

## REFERÊNCIAS

- ALBERT, J. S. & R. E. REIS. Introduction to Neotropical Freshwaters. In: Albert, J. S. & R. E. Reis (Eds.). Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes. **Berkeley**. University of California Press; 3-19. 2011.
- AMORIM, P. F & COSTA, W. J. E. M. Multigene phylogeny supports diversification of four-eyed fishes and one-sided livebearers (Cyprinodontiformes: Anablepidae) related to major South American geological events. Related to major South American geological events. **PLoS ONE**, 13 (6), 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199201>>. Acesso em: 30 jun. 2018.
- BARTHEM, R. B. Ocorrência, distribuição e biologia dos peixes da Baía de Marajó, Estuário Amazônico. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi – Zoologia**, 2(1); 49-46. 1985.
- BEHEREGARAY L. B. & SUNNUCKS, P. Fine-scale genetic structure estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish *Odontesthes argentinensis*. **Molecular Ecology**, 10; 2849-2866. 2001.
- BOHLKE, J.E.; WEITZMAN, S. H. & MENEZES, N. A. Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. **Acta Amazônia**. vol.8, n.4, p. 657-677. 1978.
- BRASIL, M.C. Marajó: em busca da sobrevivência. **Textos IESAM**, n. 7. Belém, Pará, 1999.
- BRENNER, M & KRUMME, U. Tidal migration and patterns in feeding of the four-eyed fish *Anableps anableps* L. in a north Brazilian mangrove. **Journal of Fish Biology**, 70: 406– 427. 2007.
- BRITO, M. A.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; & SANTOS, S. DNA barcoding reveals high substitution rate and mislabeling in croaker fillets (*Sciaenidae*) marketed in Brazil: The case of “pescada branca” (*Cynoscion leiarchus* and *Plagioscion squamosissimus*). **Food Research International**, 70, 40-46. 2015.
- CERVIGÓN, F.; CIPRIANI, R.; FISCHER W.; GARIBALDI, L.; HENDRICKX, M, LEMUS, A.J; MÁRQUEZ, R; POUTIERS, J. M.; ROBAINA, G. & RODRIGUEZ, B. FAO species identification sheets for fishery purposes: Field guide to the commercial marine and brackish-water resources of the northern coast of South America, **FAO-Rome**; 1993. 513 p.

COSTION, C.; FORD, A.; CROSS, H.; CRAYN, D.; HARRINGTON, M. & LOWE, A. Plant DNA Barcodes Can Accurately Estimate Species Richness in Poorly Known Floras. **Plos One**, v. 6, n.11, 2011.

CRUZ, M.E.M. **Marajó: essa imensidão de ilha**. São Paulo: EMBRAPA, 1987. 111 p.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R. & POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. **Nat Methods**, 9:(8); 2012.

EBACH, M. C. & HOLDREGE, C. DNA barcoding is no substitute for taxonomy. **Nature**, 434; 2005.

EIZIRIKI, E.; MIYAKI, C. & SANTOS, F. C. **Código de Barra de DNA**. 2009. Disponível em: <<http://www.capes.gov.br/36-noticias/3235-encontro-discute-codigo-de-barras>> . Acesso em: 05/08/2018.

FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. **Evolution**, 39; 783-791. 1985.

FOWLER, H. W. Notes on fishes of the orders Haplomi and Microcyprini. **Proc. Acad. Nat. Sci. Phila**, v. 68: 415-439. 1916.

GARMAN, S. The Cyprinodonts. Men. **Museum of Comparative Zoology at Harvard College**. Cambridge, 1985.79 p.

GHEDOTTI, M. J. Family Anablepidae (four-eyed fishes, onesided livebears and the white eye). In: *Checklist of the freshwater fishes of South and Central America* (eds Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ). **EDIPUCRS**; 582-585. 2003.

GILL, T. N. Description of a new species of the genus Anableps of Gronovius. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 3-6. 1861.

GRIER H. J; BURNS J.R & FLORES J.A. Testis structure in three species of teleosts with tubular gonopódio. **Copeia**, 4, 797-80. 1981.

GUINDON, S.; DUFAYARD, J-F. LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W; & OLIVIER GASCUEL. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**; 59, Issue 3, 1; 307–321, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>>. Acesso em: 25 abr. 2018

GÜNTHER, ALBERT C. L. G. Catalogue of the fishes of the British Museum. Volume 6. Catalogue of the Physostomi, containing the families Salmonidae, Percopsidae, Galaxidae, Mormyridae, Gymnarchidae, Esocidae, Umbridae, Scombresocidae, Cyprinodontidae. In: **the collection of the British Museum. Taylor & Francis**, London. v. 6: i-xv, 1-368. 1866.

HALL, T.A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor 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 identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 270. 313-321. 2003.

HEBERT, P. D. N. & GREGORY, T. R. The promise of DNA Barcoding for taxonomy. **Systematic Botany**, 54: 852-859. 2005.

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

LINNEAUS, C. Sistema Nature per regna tria naturae secundum classes ordines genera species cum characteribus differentiis synonymis locis. Tomus. **I Editio Decima Reformata Homiae**. 1758. 824 p.

MARCENIUK, A.P., HILSDORF, A.W.S. & LANGEANI, F. The ichthyofauna from the headwaters of the rio Tietê, São Paulo, Brazil. **Biota Neotrop.**, 11(3). 2011. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v11n3/en/abstract?inventory+bn00311032011>> Acesso em: 30/07/2018.

MIRANDA L. B.; CASTRO B. M. & KJERFVE, B. **Princípios de Oceanografia Física de estuários**. São Paulo: EDUSP, 2002.

MONTAG, L.F.A.; ALBUQUERQUE, A. A.; FREITAS, T.M.S.; & BARTHEM, R.B. The Ichthyofauna of Savannas from Marajó Island, State of Pará, Brazil. **Biota Neotrop.**, 9(3): 2009. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v9n3/en/abstract?inventory+bn01609032009>>. Acesso em: 25 jun. 2018.

MÜLLER, J & TROSCHER, F.H. Bericht über die zur Behanntmachung geeigneten Montaberiichte. **Akadem Wiss Berlin**, 1844. 36 p.

NELSON, J. N. **Fishes of the World**. 4. ed. Canadá: Wiley, 2006. 622p.

IKEDA, R. G. P., J. M. SILVA & S. C. S. MIRANDA, Morfologia do Tralhoto, *Anableps anableps* (Linnaeus, 1758), do estuário de Caratateua – Curuçá – Pará. **Boletim técnico-científico do CEPNOR**, 5(1): 93-103. 2005.

PEREIRA, L. H. G.; PAZIAN, M. F.; HANNER, R.; Foresti, F. & Oliveira, C. DNA barcoding reveals hidden diversity in the neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Paraná Basin of Brazil, **Mitochondrial DNA**, 22: sup1, 87-96. 2011. Doi: [10.3109/19401736.2011.588213](https://doi.org/10.3109/19401736.2011.588213)

PEREIRA, H. M.; FERRIER, S.; WALTERS, M.; GELLER, G. N.; JONGMAN, R. H. G.; SCHOLLES, R. J.; BRUFORD, M. W.; BRUMMITT, N.; BUTCHART, S. H. M.; CARDOSO; COOPS, N. C.; DULLOO, E.; FAITH, D. P.; FREYHOF, J.; GREGORY, R. D.; HEIP, C.; HÖFT, R.; HURTT, G.; JETZ, W.; KARP, D. S.; MCGEOCH, M. A.; OBURA, D.; ONODA, Y.; PETTORELLI, N.; REYERS, B.; SAYRE, R.; SCHARLEMANN, J. P. W.; STUART, S. N.; TURAK, E.; WALPOLE, M. & WEGMANN, M. Essential Biodiversity Variables. **Science**, 18.; 277-278. 2013.

PIMENTA NETO, D. A. **Detecção de adulteração de espécies em pescado e derivados por meio da técnica de DNA Barcoding**. 2013. 43 p. Dissertação de Mestrado. Minas Gerais. Universidade Federal de Minas Gerais, 2013

REIS, R.E.; O. KULLANDER & C.J. FERRARIS-JR. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre, EDIPUCRS, 2003. 742p.

THOMPSON, J. D; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. & HIGGINS D. G. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, 25; 4876–4882. 1997.

VARI, R-P. & MALABARBA, L-R. Neotropical ichthyology: Un Overview. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. 1998.12p.

WARD, R.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST, P. R. & PAUL, H. DNA Barcoding Australia's fish species. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 360. 1847-57. 10.1098/rstb.2005.1716. 2005.

WATANABE, L. A.; VALLINOTO, M.; NETO, N. A.; MURIEL-CUNHA, J.; SAINT-PAUL, U.; SCHNEIDER, H. & SAMPAIO, I. The Past and Present of an Estuarine-Resident Fish, the ‘‘Four-Eyed Fish’’ *Anableps anableps* (Cyprinodontiformes, Anablepidae), Revealed by mtDNA Sequences. **PLoS ONE**, 9(7); 2014.

WATANABE, L. A. **Influência dos estuários na estruturação genética de populações de tralhoto (*anableps anableps*, linnaeus, 1758) da costa Norte e Nordeste do Brasil**. 2010. 67p. Dissertação de Mestrado. Pará. Universidade Federal do Pará, 2010.