



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO MARAJÓ-BREVES
FACULDADE DE CIÊNCIAS NATURAIS
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM EDUCAÇÃO EM CIÊNCIAS NA
CONTEMPORANEIDADE

ALTEMIR SOARES MONTEIRO

**DNA *Barcoding* COMO FERRAMENTA DE DESCRIMINAÇÃO DE
COMPLEXOS CRÍPTICOS EM PEIXES NEOTROPICAIS: uma história do gênero
Moenkhausia C. H. EIGENMANN, 1903 no nordeste Paraense.**

BREVES-PA

2018

ALTEMIR SOARES MONTEIRO

**DNA *Barcoding* COMO FERRAMENTA DE DESCRIMINAÇÃO DE
COMPLEXOS CRÍPTICOS EM PEIXES NEOTROPICAIS: uma história do gênero
Moenkhausia C. H. EIGENMANN, 1903 no nordeste Paraense.**

Monografia apresentada como requisito parcial para a
obtenção de grau de Especialista em Educação em
Ciências na Contemporaneidade, pela Universidade
Federal do Pará

Orientador: Prof. Dr. João Bráulio 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)**

M772d Monteiro, Altemir Soares Monteiro.
DNA Barcoding como ferramenta de discriminação de complexos crípticos em peixes neotropicais: uma história do gênero *Moenkhausia* C. H. Eigenmann, 1903 no Nordeste Paraense. / Altemir Soares Monteiro Monteiro, . — 2018.
35 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. João Braullio de Luna Sales Sales
Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - , Campus Universitário de Breves, Universidade Federal do Pará, Breves, 2018.

1. Ictiofauna. 2. Região neotropical. 3. Gênero *Moenkhausia*. 4. DNA Barcode. I. Título.

CDD 570.12

ALTEMIR SOARES MONTEIRO

**DNA *Barcoding* COMO FERRAMENTA DE DESCRIMINAÇÃO DE
COMPLEXOS CRÍPTICOS EM PEIXES NEOTROPICAIS: uma historia do gênero
Moenkhausia C. H. EIGENMANN, 1903 no nordeste Paraense.**

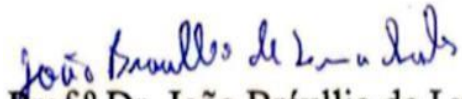
Monografia apresentada como requisito parcial para a
obtenção de grau de Especialista em Educação em
Ciências na Contemporaneidade, pela Universidade
Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. João Bráulio de Luna Sales

Data de aprovação: 20/06/2018

Conceito: Excelente.

Comissão examinadora:



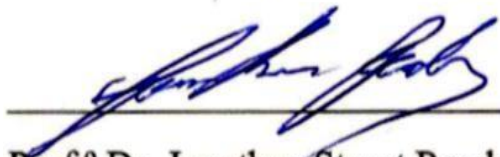
Prof.º Dr. João Bráulio de Luna Sales

UFPA (Orientador)



Prof.º Dr. Sílvio Carlos Ferreira Pereira Filho

FACIN – CUMB, UFPA (Membro Titular)



Prof.º Dr. Jonathan Stuart Ready

UFPA, Cidade Universitária José da Silveira Netto (Membro Titular)

Aos meus Pais; Aos meus irmãos; Ao meu orientador; À minha namorada; Aos amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e saúde que me concede a cada dia.

Aos meus pais, Alacid e Claudete pelo grande amor e dedicação, não medindo esforços para me dar o que a eles foi negado, a oportunidade de prosseguir nos estudos.

Aos meus irmãos Fabio, Benedito, Maria e Alacid pelo apoio que cada um do seu jeito me ofereceu.

A minha namorada pelo amor, paciência e compreensão aos tantos momentos em que a dedicação ao trabalho parecia ser maiores que a dela.

Ao meu orientador João Braullio, que demonstrou ser muito mais de que um orientador, pela sua dedicação e empenho no período de todo esse trabalho.

E, finalmente a todos meus amigos que ajudaram através de favores, palavras de incentivo, a todos muito obrigado.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda não pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

A megadiversa ictiofauna de peixes Neotropicais é, em número de espécies, a mais rica do mundo. A diversidade de peixes de água doce da América do Sul é centrada na Amazônia, os peixes compõem o mais antigo e numeroso grupo dentre os vertebrados existentes, representados por formas extremamente diversificadas e adaptadas as mais diferentes condições ambientais. O gênero *Moenkhausia*, atualmente é um dos gêneros com maior diversidade de espécies na família Characidae. O gênero compreende espécies com uma ampla variedade de formas corporais e padrões de coloração, com essa diversidade tão elevada, varias espécies do gênero *Moenkhausia* têm sido descritas nos últimos anos, desta forma, é primordial acelerar e simplificar o processo que envolve a identificação das espécies dentro do gênero. Nesse sentido, devido a certas limitações em classificar os seres vivos apenas por traços morfológicos, o método de classificações baseado em análise de DNA vem ganhando destaque nos últimos anos, portanto, é principalmente nesse contexto de identificação da diversidade que estão sendo aplicados os marcadores genéticos e moleculares nas espécies de peixes neotropicais. Assim o método de análise DNA *Barcoding* é um sistema inovador, que tem se mostrado significativo para identificar e classificar as espécies de maneira rápida e precisa. A iniciativa *barcoding* se baseia na amplificação de uma curta região de um gene mitocondrial, o gene Citocromo C oxidase subunidade I (COI), através da reação em cadeia da polimerase (PCR) amplificando aproximadamente 650 pares de base (bp) do gene COI. Apesar das controvérsias, o DNA *barcoding* se mostra uma técnica eficiente, rápida e barata, com bons resultados para a resolução de problemas taxonômicos. Dessa forma, esse trabalho tem a intenção de discriminar geneticamente as possíveis linhagens de peixes do gênero *Moenkhausia* que ocorrem em diferentes regiões do estado do Pará através da ferramenta de DNA *barcoding*. Entre os anos de 2008 a 2011, amostras de *Moenkhausia* foram coletadas em diferentes regiões do estado do Pará, em um total de 54 indivíduos. Os resultados gerados no presente estudo apontam a presença ao menos de 17 clados filogenéticos bem suportados, indicando também que as espécies *M. sanctafilomena* e *M. oligolepsi* apresentaram a presença de mais de uma linhagem genética. Os resultados aqui obtidos reforçam a efetividade do DNA *barcoding* em discriminar linhagens moleculares distintas dentro de peixes neotropicais, reforçam a utilidade da Ferramenta de DNA *barcoding* em discriminar linhagens evolutivas distintas para peixes neotropicais de água doce.

Palavras-chave: Ictiofauna; Região neotropical; Gênero *Moenkhausia*; DNA *Barcode*.

ABSTRACT

The mega-diversity of the Neotropical fish species is the richest in the world. The diversity of freshwater fish in South America is centered in the Amazon, the fish make up the oldest and largest group among the existing vertebrates, represented by extremely diverse forms and adapted to the most different environmental conditions. The genus *Moenkhausia*, is currently one of the genera with the highest diversity of species in the Characidae family. The genus comprises species with a wide variety of body shapes and coloring patterns, with such a diversity, several species of the genus *Moenkhausia* have been described in recent years, in this way, it is primordial to accelerate and simplify the process that involves the identification of species within the genre. In this sense, due to certain limitations in classifying the living beings only by morphological traits, the method of classifications based on DNA analysis has been gaining prominence in the last years, therefore, it is mainly in this context of identification of the diversity that the genetic markers are being applied and molecular changes in neotropical fish species. Thus, the DNA Barcoding analysis method is an innovative system that has shown to be significant to identify and classify species quickly and accurately. Thus, this work intends to genetically discriminate the possible strains of fish of the genus *Moenkhausia* that occur in different regions of the state of Pará through the DNA barcoding tool. Between the years 2008 and 2011, *Moenkhausia* samples were collected in different regions of the state of Pará, in a total of 54 individuals. The results obtained here shows at least 17 filogenetic clades well supported and also, indicates that the species *M. sanctafilomena* e *M. oligolepsi* aren't monophyletic lineages. The results generated in the present study point to the effectiveness of DNA barcoding in discriminating distinct molecular strains within neotropical fish, reinforcing the usefulness of the DNA barcoding tool in discriminating distinct evolutionary strains for neotropical freshwater fish.

Keywords: Ichthyofauna; Neotropical region; Genus *Moenkhausia*; DNA Barcode.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 -	Mapa da região neotropical se estende por parte do México, toda América Central e Sul, maior diversidade de vida do mundo, mapa adaptado.....	12
Figura 2 -	Esquema de exemplar do gênero <i>Moenkhausia</i> (<i>Moenkhausia petymbuaba</i>) indicando algumas estruturas utilizadas neste trabalho	13
Figura 3 -	Micrografia eletrônica de varredura da dentição de <i>Moenkhausia megalops</i> , INPA 40617, 43,2 mm SL, vista lateral esquerda interna dos ossos pré-maxilar, maxilar e dentário. Barra de escala: 0,5 mm.....	14
Figura 4 -	Representantes de espécies do gênero <i>Moenkhausia</i> : <i>Moenkhausia intermedia</i> (A), <i>Moenkhausia chlorophthalma</i> (B), <i>Moenkhausia lopesi</i> (C), <i>Moenkhausia chlorophthalma</i> (D).....	15
Figura 5 -	Região do Nordeste Paraense, onde foi coletada a maioria das amostras do gênero para estudo, adaptado.....	20
Figura 6 -	Representação da formação dos clados de <i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i> com autovalor de suporte entre os espécimes.....	23
Figura 7 -	Representação da formação dos clados de <i>Moenkhausia oligolepsi</i> com autovalor de suporte entre os espécimes.....	23
Figura 8 -	Representação da formação dos clados de <i>M. sanctaefilomenae</i> , <i>M. foresti</i> e <i>M. australe</i> com autovalor de suporte entre os espécimes.....	24
Figura 9 -	Árvore filogenética de Agrupamento de Vizinhos (NJ) do gene COI contendo as amostras de <i>Moenkhausia</i> do presente estudo.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Quadro dos espécimes coletadas em diferentes localidades do estado do Pará e analisadas no estudo.....	21
------------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Diversidade de peixes neotropicais.....	11
1.2	O gênero Moenkhausia Eigenmann, 1903.....	13
1.3	Utilização do código de barras de DNA na descrição de espécies.....	16
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivo Geral.....	19
2.2	Objetivos Especificos.....	19
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1	Amostragem e procedimentos moleculares.....	19
3.2	Análises moleculares.....	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5	CONCLUSÕES.....	27
	REFERÊNCIAS.....	28

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diversidade de peixes neotropicais

A megadiversa ictiofauna de peixes Neotropicais é, em número de espécies, a mais rica do mundo, com aproximadamente 6.000 espécies reconhecidas, o que compreende 20-25% da fauna total de peixes de água doce da Terra (Reis *et al.*, 2003) tendo sua diversificação ocorrido por volta do final do período Cretáceo e início da era Cenozoica, a pelo menos 70 Ma, como resultado da evolução geográfica do continente Sul Americano (Lundberg *et al.*, 1998).

A história evolutiva dos peixes da ordem Characiformes ainda é incerta. Esses peixes estão entre os mais diversos e abundantes componentes de água doce do mundo, com aproximadamente 2.000 espécies distribuídas em 23 famílias, destas, quatro são africanas e 19 neotropicais (Oliveira *et al.*, 2011). Os membros desta ordem são os maiores representantes da ictiofauna de água doce da América do Sul e Central (Vari & Howe, 1991; Reis *et al.*, 2003). Algumas características desta ordem incluem dentes bem desenvolvidos em algumas espécies e em outras não, presença de nadadeira adiposa e nadadeira pélvica e corpo quase sempre escamado (Nelson, 2004).

A diversidade de peixes de água doce da América do Sul é centrada na Amazônia, incluindo as bacias do Amazonas e do Orinoco e regiões adjacentes do Guiana e escudos brasileiros. Esta região constitui o núcleo biogeográfico do Sistema ictiológico neotropical (Figura 1). De muitas maneiras, a Bacia Amazônica serviu como berço e um museu de diversidade orgânica, uma área de origem das espécies, bem como um lugar onde as linhagens se acumulavam através do tempo geológico (Stenseth, 1984).

Figura 1: Mapa da região neotropical se estende por parte do México, toda América Central e Sul, maior diversidade de vida do mundo, mapa adaptado.



Fonte: <https://panda.maps.arcgis.com/apps/webappviewer/index.html>.

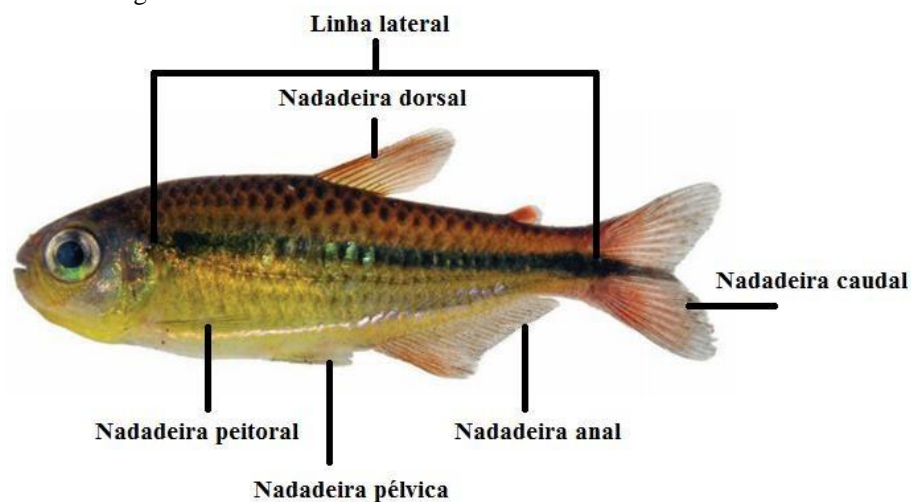
Segundo Lewinsohn & Prado (2002), o Brasil abriga a biota mais diversa entre os 17 países considerados detentores de megadiversidade. Há indícios de que somente na América do Sul ocorram mais de 8.000 espécies, tendo em vista apenas duas das diversas ordens descritas (Characiformes e Siluriformes). Dessa forma, apesar dos esforços de se catalogar o maior número possível destas espécies, ainda há uma grande diversidade desconhecida (Reis *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2013). Mesmo com este nível excepcional de riqueza, os peixes da região Neotropical pertencem a apenas 17 ordens, um número relativamente pequeno, considerando-se as 954 espécies de peixes encontradas na América do Norte os quais pertencem a 26 ordens (Nelson *et al.*, 2004; Albert & Reis., 2011).

A importância da Ictiologia como área de conhecimento está explícita no fato de que os peixes compõem o mais antigo e numeroso grupo dentre os vertebrados existentes, representados por formas extremamente diversificadas e adaptadas as mais diferentes condições ambientais (Souza *et al.*, 1999). Desta maneira, é fundamental para esclarecimento de composição de espécies, que hajam taxonomistas treinados bem como, que representatividade amostral de diversas áreas diferentes sejam realizadas. Exemplos sobre esta problemática nos últimos anos como *Hoplias malabaricus*, *Eigenmannia virescens* e *Synbrachus marmoratus* reforçam a necessidade de investigações, mas profundas na fauna de peixes Neotropicais (Reis *et al.*, 2013; Carvalho *et al.* 2011).

1.2 O gênero *Moenkhausia* Eigenmann, 1903

O gênero *Moenkhausia* foi proposto originalmente por Eigenmann (1903) para abrigar a espécie *Tetragonopterus xinguensis* (Steindachner, 1882) com a seguinte definição: “Similar to Markiana Anal naked, caudal scaled” (Parecido com Markiana, Nadadeira anal nua, nadadeira caudal com escamas). Atualmente é um dos gêneros com maior diversidade de espécies na família Characidae, composto ultimamente por 75 espécies válidas. Foi proposto em Tetragonapterinae por Eigenmann (1903), com base em *Tetragonopterus xinguensis*. Na descrição original, o autor comenta que o novo gênero é similar a Markiana e possui nadadeira anal nua (desprovida de escamas em sua base) e escamas na nadadeira caudal e que o nome do gênero é uma homenagem ao Dr. William J. Moenkhaus da Universidade de Indiana, colaborador do Museu Paulista em São Paulo (Raio, 2014).

Figura 2: Esquema de exemplar do gênero *Moenkhausia* (*Moenkhausia petymbuaba*) indicando algumas estruturas utilizadas neste trabalho.



Fonte: Imagem adaptado de (Sousa *et al.*, 2010).

O gênero *Moenkhausia* foi proposto com base principalmente na combinação da presença de dentes pré-maxilares em duas linhas, uma linha de dente pré-maxilar interna com cinco ou mais dentes, uma linha lateral completamente porada sem uma curva descendente anterior e uma bainha de balanças que cobrem a base de lobos caudal, (Benine *et al.*, 2009). O gênero compreende espécies com uma ampla variedade de formas corporais e padrões de coloração (Manoela & Fernando., 2016).

Figura 3: Micrografia eletrônica de varredura da dentição de *Moenkhausia megalops*, INPA 40617, 43,2 mm SL, vista lateral esquerda interna dos ossos pré-maxilar, maxilar e dentário. Barra de escala: 0,5 mm.



Fonte: Imagem retirado de SOUSA *et al.*, (2010).

Eigenmann (1917) apresenta uma descrição mais detalhada do gênero. Define que as espécies agrupadas compartilham duas fileiras paralelas de dentes pré-maxilares, com cinco ou mais dentes na fileira interna do pré-maxilar, linha lateral (geralmente) completa e nadadeira caudal recoberta por escamas. A presença de pequenas escamas cobrindo a base da nadadeira caudal, cinco ou mais dentes na série interna do pré-maxilar, grau de desenvolvimento e curvatura da linha lateral são os principais caracteres que separam os gêneros, no entanto espécies com características que não condizem com a definição tradicional são descritas e alocadas em *Moenkhausia* com base na semelhança morfológica com as espécies do gênero (Costa, 1994; Géry & Zarske, 2004; Benine; Oliveira, 2009; Lima *et al.*, 2013).

Machado *et al.*, (2009), analisando o conteúdo estomacal de 16 espécimes identificadas como *Moenkhausia intermedia* (eigenmann, 1908), concluir que essa espécie, possui o hábito alimentar onívoro com tendência à carnivoria devido a variedade alimentar encontrada, outros estudos também tem relatado o consumo do gênero preferencialmente por insetos aquáticos e terrestres, aproveitam grande variedade de alimentos disponíveis em diversos locais, por esse motivo uma mesma espécie pode apresentar dieta diversificada, dependendo da região e da época do ano (Zavala & Camin, 1996).

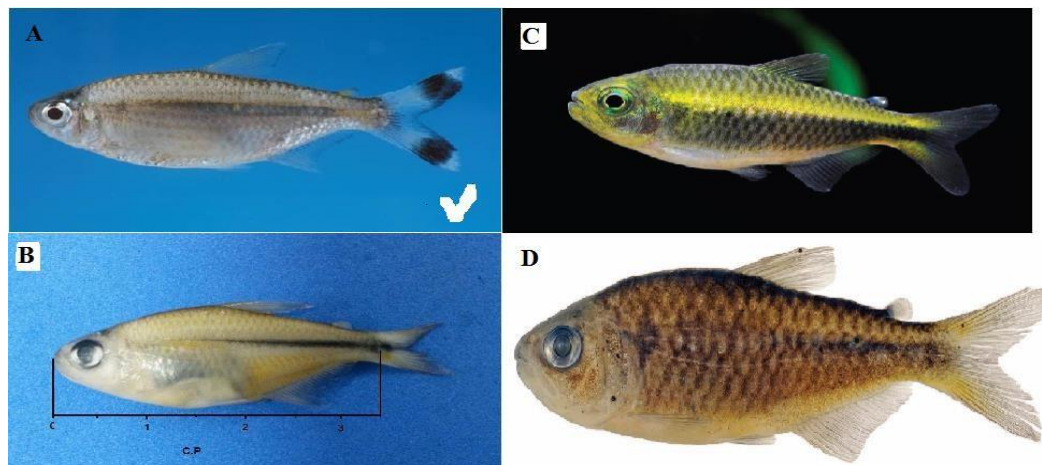
Em diversos estudos realizados na região Neotropical, tem se identificado diferentes espécies do gênero *Moenkhausia*, ao mesmo tempo espécies idênticas são encontradas em

diferentes locais, o que pode demonstrar uma distribuição de diferentes espécies por amplas regiões da região Neotropical (Fowler, 1948). São peixes considerados de pequeno porte, e um importante componente da cadeia alimentar, especialmente para outras espécies de peixes, de aves e de outros carnívoros (Lizama; Ambrósio, 2003).

No estudo desenvolvido por Marceno *et al.*, (2016), sobre a ecologia da espécie *Moenkhausia lopesi*, essa foi classificada como insetívora colaborando com os resultados (Machado *et al.*, 2009), sendo que 95% da sua dieta foi composta por insetos. Lourenço *et al.*, (2008), estudando o processo de reprodução *M. sanctafilomenae*, verificou que as fêmeas apresentaram gônadas maduras em dezembro, quando as chuvas iniciaram, o que promove mudanças nas características do habitat, principalmente o aumento das águas nas lagoas, o que resulta em maiores quantidades de alimento, o que pode justificar que a mesma espécie em todas as lagoas estudadas estavam com as gônadas maduras, dessa forma o gênero *Moenkhausia* possui espécies muito diversificadas e com adaptações próprias ao ambiente em que estão inseridas.

Para Raio (2014), *Moenkhausia* é um gênero que agrupa espécies morfológicamente muito distintas, não monofilético, que compartilham a presença de escamas na nadadeira caudal e dentes multicúspides na fileira interna do pré-maxilar. Dentro do gênero estão, atualmente, inseridas espécies com diferentes padrões de colorido: máculas presentes (com distintas formas) ou ausentes, estrias longitudinais presentes ou ausentes; diferentes formas e quantidades de dentes, rastros branquiais no primeiro arco branquial, de números de ossos supra neurais entre outras características anteriormente apresentadas.

Figura 4: Representantes de espécies do gênero *Moenkhausia*: *Moenkhausia intermedia* (A), *Moenkhausia chlorophthalma* (B), *Moenkhausia lopesi* (C), *Moenkhausia chlorophthalma* (D).



Fonte: Machado *et al.*, (2009), Maceno *et al.*, (2016) e Sousa *et al.*, (2010) respectivamente.

Com essa diversidade tão elevada, várias espécies do gênero *Moenkhausia* têm sido descritas nos últimos anos como: *Moenkhausia celibela* (Marinho & Langeani., 2010); *Moenkhausia aurantia* (Bertaco *et al.*, 2011); *Moenkhausia jamesi* (Petrolli & Benine., 2015); *Moenkhausia lineomaculata* (Dagosta *et al.*, 2015); *Moenkhausia britskii sp* (Azevedo-Santos & Benine., 2016); *Moenkhausia monicae* (Marinho *et al.*, 2016). Dentre essas espécies, Petrolli & Benine, (2015), examinaram espécimes identificadas como *Moenkhausia jamesi*, onde foi verificado que existiam na verdade três espécies não descritas sob este nome. Estas, junto com *M. jamesi* e *M. justae* formam um grupo muito semelhante, compartilhando muitas características, o que demonstra alto grau de dificuldade em identificar espécies do gênero *Moenkhausia* apenas por dados morfológicos, principalmente pela diversidade críptica dentro desse gênero (Petrolli & Benine., 2015 ; Dagosta *et al.*, 2015; Azevedo-Santos & Benine., 2016; Marinho *et al.*, 2016). Desta forma, é primordial acelerar e simplificar o processo que envolve a identificação das espécies dentro do gênero.

1.3 Utilização do código de barras de DNA na descrição de espécies

Um dos principais entraves ao conhecimento completo da diversidade de espécies na Terra é a identificação e discriminar as mesmas. Normalmente, o processo de descrição de uma espécie é feito através de caracteres taxonômicos, o que demanda profissionais muito bem treinados além de muito tempo para revisão dos espécimes coletados. A identificação baseada em caracteres morfológicos também pode apresentar alguns entraves (quantidade elevada de espécies, poucos taxonomistas para as diversas espécies) para espécimes muito similares, ou seja, que compartilham características morfológicas de um ancestral recente, o que muitas vezes dificulta a identificação ou em alguns casos até a impede (Hebert *et al.*, 2003, Hajibabaei *et al.*, 2007).

Nesse sentido, devido a certas limitações (formas e tamanho muito parecido entre as espécies, as chaves de identificação não são capazes de identificar em todas as etapas da vida do organismo) em classificar os seres vivos apenas por traços morfológicos, o método de classificações baseado em análise de DNA vem ganhando destaque nos últimos anos, uma vez que o DNA é relativamente estável, e pode ser acessado de todas as etapas da vida usando pequenas quantidades de tecido. Além do fato de que as sequências de DNA são altamente reproduzíveis por inúmeras técnicas criadas ao longo dos últimos 30 anos

(Jarman *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2009).

Portanto, é principalmente nesse contexto de identificação da diversidade que estão sendo aplicados os marcadores genéticos e moleculares nas espécies de peixes neotropicais, usando, inclusive, a exploração de características de interesse econômico, bem como a preservação de unidades evolutivas significativas para a manutenção dessa biodiversidade (Ryder, 1986, Valdez-Moreno *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2011; Rosso *et al.*, 2012).

Assim o método de análise DNA *Barcoding* é um sistema inovador, que tem se mostrado significativo para identificar e classificar as espécies de maneira rápida e precisa usando regiões de genes curtas e padronizadas (Hebert *et al.*, 2003; Hebert *et al.*, 2004; Hebert & Gregory, 2005). A iniciativa *barcoding* se baseia na amplificação de uma curta região de um gene mitocondrial, o gene Citocromo *C* oxidase subunidade I (COI), através da utilização de um par de iniciadores universais para reação em cadeia da polimerase (PCR) amplificando aproximadamente 650 pares de base (bp) do gene COI.

O DNA mitocondrial possui algumas características favoráveis, como: os genes mitocondriais exibem hereditariedade exclusivamente materna para a maioria das espécies animais (Nussbaum *et al.*, 2008), havendo poucas exceções com relação a casos de herança bi parental (Zouros *et al.*, 1992). Adicionalmente, apresenta alta taxa de mutação e facilidade de isolamento, desta forma, até mesmo espécies muito próximas podem ser discriminadas (Rubinoff, 2006). Para estudos genéticos que utilizam o DNA mitocondrial, sua principal vantagem frente a outras regiões genômicas, como genes nucleares, é a maior abundância de cópias (Awise *et al.*, 1994). Cada célula possui centenas de mitocôndrias e cada mitocôndria dezenas de cópias de seu cromossomo circular. Não apresentam íntrons, praticamente não sofrendo recombinação (Saccone *et al.*, 1999).

Esse método além de ser utilizado na identificação de peixes (Pereira *et al.*, 2010b, 2013; Nwani *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2011) também apresenta precisão na identificação de outras espécies de animais, o que tem apresentando alta taxa de sucesso como em diversos grupos de artrópodes (Hebert *et al.*, 2003, 2004a), aves (Kerr *et al.*, 2007) e anfíbios (Smith *et al.*, 2008a).

Como o código de barras geralmente é alvo de um grande número de espécies pode ser uma ferramenta poderosa para facilitar a estudos comparativos de diversidade genética em diferentes espécies ou configurações ecológicas (Hajibabaei *et al.*, 2007). Nesse contexto, a utilização de outras técnicas que visam à obtenção da sequência de DNA da espécie como a PCR, que tem tipicamente o objetivo sintetizar material genético para

análise da região de interesse do DNA, de modo que essa possa ser analisada e utilizada de alguma outra maneira (Gil, 2007; Rasmussen & Morrissey, 2008; Yuan, 2010).

Apesar dessa técnica se mostrar eficiente para identificação de espécimes, desde a publicação do artigo de Hebert *et al.*, (2003), muitas polêmicas e debates surgiram, com certa resistência de alguns taxonomistas (Ebach e Holdrege, 2005), argumentam que a técnica de identificação baseada na taxonomia é muito mais precisa que técnicas moleculares, outro ponto importante é que a técnica de DNA *barcode* vai receber uma quantidade maior de fundos e incentivos, tirando recursos de áreas mais tradicionais a identificação de espécies como a morfologia, além da redução de investimentos em museus e coleções taxonômicas, o que representaria a possível perda do conteúdo intelectual da taxonomia, reduzindo-a a um trabalho de realizar identificações moleculares, (Lipscomb *et al.*, 2003). Cameron *et al.*, (2006), questionaram a viabilidade de identificações moleculares sendo realizadas pelo público em geral, além disso, calcularam os custos de obtenção de sequências de códigos de barras e concluíram que a manutenção dessa metodologia na linha de frente das identificações biológicas custaria mais do que seus defensores haviam inicialmente previsto.

Os taxonomistas tradicionais também questionaram a questão da amostragem de táxons (Moritz & Cicero 2004, Meyer & Paulay 2005). Para explicar esse problema, a representação ideal no banco de dados teria que ser muito maior que 10 indivíduos por cada espécie (Meyer & Paulay 2005). A confiabilidade de tal procedimento depende de uma distinção efetiva entre variação intra e interespecífica, que está faltando para vários dos táxons estudados, como indicado pela significativa justaposição de sequências (Whitworth *et al.*, 2007).

Apesar das controvérsias, o DNA *barcoding* se mostra uma técnica eficiente, rápida e barata, com bons resultados para a resolução de problemas taxonômicos especialmente onde a taxonomia morfológica fica em dúvida. (Pereira *et al.*, 2011). Contribuindo dessa maneira, em trabalhos que visam à identificação e reclassificação de espécimes alocados em grupos de espécies diferentes, principalmente de peixes que apresentam semelhanças morfológicas muito próximas.

Com a grande diversidade de peixes da região neotropical, e a intensa similaridade entre as espécies, há a necessidade de conhecer geneticamente esses organismos. Dessa forma, esse trabalho tem a intenção de gerar dados sobre a diversidade de linhagens genéticas do gênero *Moenkhausia*, e assim demonstrar a importância de ampliação dos

estudos focados a este gênero de peixes neotropicais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Discriminar geneticamente as possíveis linhagens de peixes do gênero *Moenkhausia* que ocorrem em diferentes regiões do estado do Pará através da ferramenta de DNA *barcoding*.

2.2 Objetivos Específicos

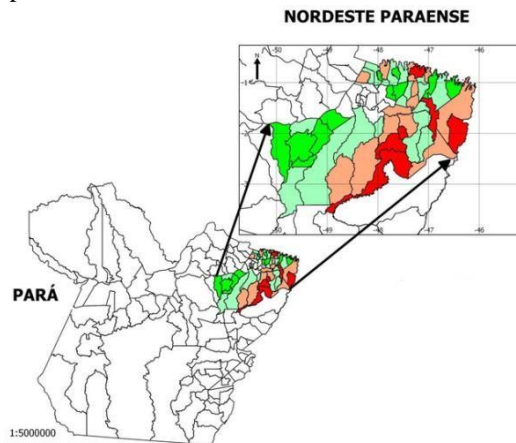
- Comparar exemplares do gênero *Moenkhausia* com exemplares de outras regiões para verificação de possíveis espécies não descritas;
- Inferir sobre a precisão da ferramenta DNA *barcoding*, na identificação de espécies de *Moenkhausia*;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem e procedimentos moleculares

Entre os anos de 2008 a 2011, amostras de *Moenkhausia* foram coletadas em diferentes regiões do estado do Pará, em um total de 54 indivíduos (tabela 1) sendo a maioria do Nordeste Paraense (figura 5). Os espécimes foram fotografados e tiveram um pequeno pedaço de tecido muscular retirado e acondicionado em tubos eppendorf contendo álcool absoluto, sendo posteriormente levado ao Laboratório de Ictiologia Integrada (Lii) no campus de Bragança e armazenados em freezer a -4°C até o momento dos procedimentos moleculares.

Figura 5: Região do Nordeste Paraense, onde foi coletada a maioria das amostras do gênero para estudo, adaptado.



Fonte: disponível em <<https://www.researchgate.net/publication/303403810> Credito rural e rede bancaria no Nordeste Paraense evolução e concentração espacial 2000-2010 > Acesso em junho 15. 2018.

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 LIICO1R1 (TTYTGRTTYTTCGGACACCCAGAAGT) e LIICO1F3 (GATTTTTCTCAACTAACCAYAAAGA).

O mix de PCR para cada amostra utilizou uma solução com 7µl de H₂O, 1µl de dNTP 1,25mM, 1µl de tampão 10X, 1µl de MgCl₂ 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 serão 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).

Tabela 1: Quadro dos espécimes coletadas em diferentes localidades do estado do Pará e analisadas no estudo.

Codigo	BOLD ID	Localidade de coleta	Drenagem	Long	Lat	Data
08B88	<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	Taciateua	Rio Maracanã	-47,42445	-1,31204	25/11/2008
08D13	<i>Moenkhausia oligolepis</i>	Igarapé Açu	Rio Guamá	-47,03444	-1,57432	27/11/2008
09B14	<i>Moenkhausia oligolepis</i>	Dr. Sid's, Inhangapi	Rio Guamá	-47,8746	-1,47097	06/03/2009
09C14	<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	Taciateua	Rio Maracanã	-47,42445	-1,31204	01/06/2009
09C66	<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	Rio das Cobras	Rio Quatipuru	-46,99982	-1,07652	02/06/2009
09E03	<i>Moenkhausia oligolepis</i>	Igarapé Açu	Rio Guamá	-47,03444	-1,57432	05/06/2009
10A53	<i>Moenkhausia sp.</i>	South of Jatuarana	Rio Jauru	-53,65686	-1,61816	16/06/2010
10A54	<i>Moenkhausia sp.</i>	South of Jatuarana	Rio Jauru	-53,65686	-1,61816	16/06/2010
10A75	<i>Moenkhausia oligolepis</i>	Fazenda Santana	Rio Jauru	-53,43136	-1,7329	16/06/2010
10A76	<i>Moenkhausia sp.</i>	Fazenda Santana	Rio Jauru	-53,43136	-1,7329	16/06/2010
10A83	<i>Moenkhausia oligolepis</i>	Fazenda Santana	Rio Jauru	-53,43136	-1,7329	16/06/2010
10B37	<i>Moenkhausia sp.</i>	Ponte sobre o Rio Maicuru	Rio Maicuru	-54,37605	-1,61402	17/06/2010
10B38	<i>Moenkhausia sp.</i>	Ponte sobre o Rio Maicuru	Rio Maicuru	-54,37605	-1,61402	17/06/2010
10B39	<i>Moenkhausia sp.</i>	Ponte sobre o Rio Maicuru	Rio Maicuru	-54,37605	-1,61402	17/06/2010
10B73	<i>Moenkhausia sp.</i>	Curucambá 01	Rio Curucambá	-55,45684	-1,7324	18/06/2010
10C03	<i>Moenkhausia sp.</i>	Curucambá 03	Rio Curucambá	-55,61077	-1,64168	18/06/2010
10C04	<i>Moenkhausia sp.</i>	Curucambá 03	Rio Curucambá	-55,61077	-1,64168	18/06/2010
10C93	<i>Moenkhausia sp.</i>	Ponte sobre o Rio Curuá	Rio Curuá	-54,9119	-1,5972	20/06/2010
10C95	<i>Moenkhausia sp.</i>	Ponte sobre o Rio Curuá	Rio Curuá	-54,9119	-1,5972	20/06/2010
10H10	<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	Jatuarana	Rio Jauru	-53,6793	-1,55215	16/06/2010
11A35	<i>Moenkhausia sp.</i>		Rio Uatumã?	-60,03164	-2,2486	07/02/2011
11A47	<i>Moenkhausia sp.</i>			-60,40608	-1,34549	08/02/2011
11A64	<i>Moenkhausia sp.</i>			-60,27205	-1,47095	08/02/2011
11A68	<i>Moenkhausia sp.</i>	Igarapé da Coruja		-60,23825	-1,53543	08/02/2011
11A81	<i>Moenkhausia sp.</i>	Igarapé Canasta		-60,13719	-1,82505	08/02/2011
11A88	<i>Moenkhausia sp.</i>	Igarapé Canasta		-60,13719	-1,82505	08/02/2011
11AB87	<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	Rio das Cobras	Rio Quatipuru	-46,99982	-1,07652	24/02/2011
11AB88	<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	Rio das Cobras	Rio Quatipuru	-46,99982	-1,07652	24/02/2011
11AF28	<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	Alta Caeté	Rio Caeté	-47,1878	-1,39386	05/08/2011
11AF3 /	<i>Moenkhausia oligolepis</i>	Igarapé Açu	Rio Guamá	-47,03444	-1,57432	05/08/2011
11AF45	<i>Moenkhausia oligolepis</i>	Fazenda Cachoeira	Rio Guamá	-47,10125	-1,64988	05/08/2011
11AG24	<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	Jeju	Rio Maracanã	-47,54421	-1,33767	04/08/2011
11B97	<i>Moenkhausia sp.</i>	Igarapé Canasta		-60,13719	-1,82505	08/02/2011
11B98	<i>Moenkhausia sp.</i>	Igarapé Canasta		-60,13719	-1,82505	08/02/2011
11BA08	<i>Moenkhausia sp.</i>	Ramal Agua boa km 15? Depois rio maior	Rio Xingu	-52,056056	-2,8456944	07/10/2011
11BA16	<i>Moenkhausia sp.</i>	Ramal Agua boa 2nd igarape from entrance very close	Rio Xingu	-52,028333	-2,8888056	07/10/2011
11BA28	<i>Moenkhausia sp.</i>	Ramal Agua boa 2nd igarape from entrance very close	Rio Xingu	-52,028333	-2,8888056	07/10/2011
11BA33	<i>Moenkhausia sp.</i>	Ramal Agua boa 2nd igarape from entrance very close	Rio Xingu	-52,028333	-2,8888056	07/10/2011
11BA41	<i>Moenkhausia sp.</i>	Ramal Agua boa 2nd igarape from entrance very close	Rio Xingu	-52,028333	-2,8888056	07/10/2011
11BB42	<i>Moenkhausia sp.</i>	Rio Itatá	Rio Xingu	-51,91557	-3,74752	10/10/2011
11BC20	<i>Moenkhausia sp.</i>	Atuna	Rio Xingu	-52,03827	-3,5049	10/10/2011
11BC34	<i>Moenkhausia sp.</i>	N rodovia altamira Belo Monte	Rio Xingu	-51,88605	-3,03188	11/10/2011
11BC36	<i>Moenkhausia sp.</i>	N rodovia altamira Belo Monte	Rio Xingu	-51,88605	-3,03188	11/10/2011
11BC37	<i>Moenkhausia sp.</i>	N rodovia altamira Belo Monte	Rio Xingu	-51,88605	-3,03188	11/10/2011
11BC38	<i>Moenkhausia sp.</i>	N rodovia altamira Belo Monte	Rio Xingu	-51,88605	-3,03188	11/10/2011
11C23	<i>Moenkhausia sp.</i>			-60,27205	-1,47095	08/02/2011
11C24	<i>Moenkhausia sp.</i>			-60,27205	-1,47095	08/02/2011
11C38	<i>Moenkhausia sp.</i>			-60,40608	-1,34549	08/02/2011
11C39	<i>Moenkhausia sp.</i>			-60,40608	-1,34549	08/02/2011
11C60	<i>Moenkhausia sp.</i>	Fazenda Santa Claudia		60,01262	2,0398	07/02/2011
11C78	<i>Moenkhausia sp.</i>		Rio Uatumã?	-60,03164	-2,2486	07/02/2011
11C80	<i>Moenkhausia sp.</i>		Rio Uatumã?	-60,03164	-2,2486	07/02/2011
11D32	<i>Moenkhausia sp.</i>	Barreto		-59,49302	-1,96624	06/02/2011

Fonte: produzida pelo autor.

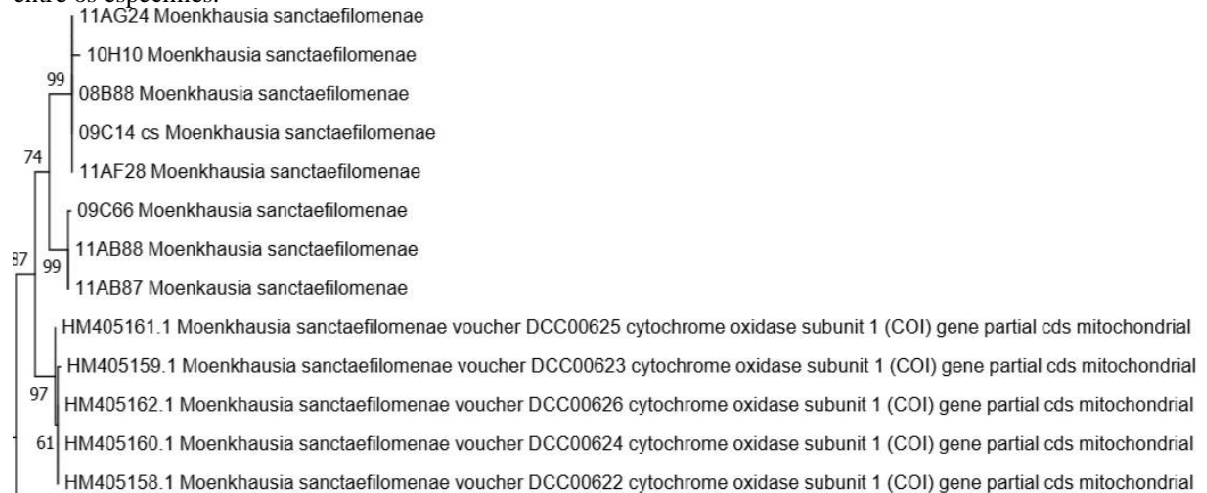
3.2 Análises moleculares

Adicionalmente as sequências obtidas no presente estudo, com sequências de espécies do gênero *Moenkhausia* que foram baixadas do site GeneBank e acrescentadas ao banco de dados. As sequências são provenientes dos trabalhos de Carvalho *et al.*, 2011, Benine *et al.*, (não publicado), Van Der Walt *et al.*, (não publicado), Javonillo *et al.*, 2010, Pereira *et al.*, 2013, Mota *et al.*, (não publicado), Rossini *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2017. As sequências obtidas foram alinhadas através da ferramenta de alinhamento automático CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1997) implementada no programa BioEdit v. 7.0.4 (Hall, 1999). O programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) foi utilizado para construir uma árvore filogenética de Agrupamento de Vizinhos (NJ) utilizando-se o modelo de Kimura 2 parâmetros (K2P) (Kimura 1980), onde o suporte dos ramos foi verificado através de 1000 pseudo-replicas de bootstrap (Felsenstein, 1985).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados gerados no presente estudo apontam a efetividade do DNA *barcoding* em discriminar linhagens moleculares distintas dentro de peixes neotropicais. Inicialmente, vamos focar atenção à espécie *M. sanctaefilomenae*. Os indivíduos coletados no presente estudo formaram 2 clados com altos valores de suporte (99% para cada um). O primeiro clado é formado por indivíduos provenientes do Nordeste paraense + 1 indivíduo do Rio Jarauçú, próximo ao Xingu (10H10). O segundo clado é composto por 3 indivíduos todos provenientes do Rio das Cobras, na região de Quatipuru, também no nordeste Paraense (Figura 6). Chama atenção também o fato da formação de um terceiro e quarto clado com indivíduos de *M. sanctaefilomenae* provenientes do Rio Pandeiros em Minas Gerais (Códigos HM405158- HM405162) também apoiado por altos valores de suporte (97%) sendo este clado, irmão aos clados com as amostras do presente estudo e 3 espécimes com 84% de suporte respectivamente.

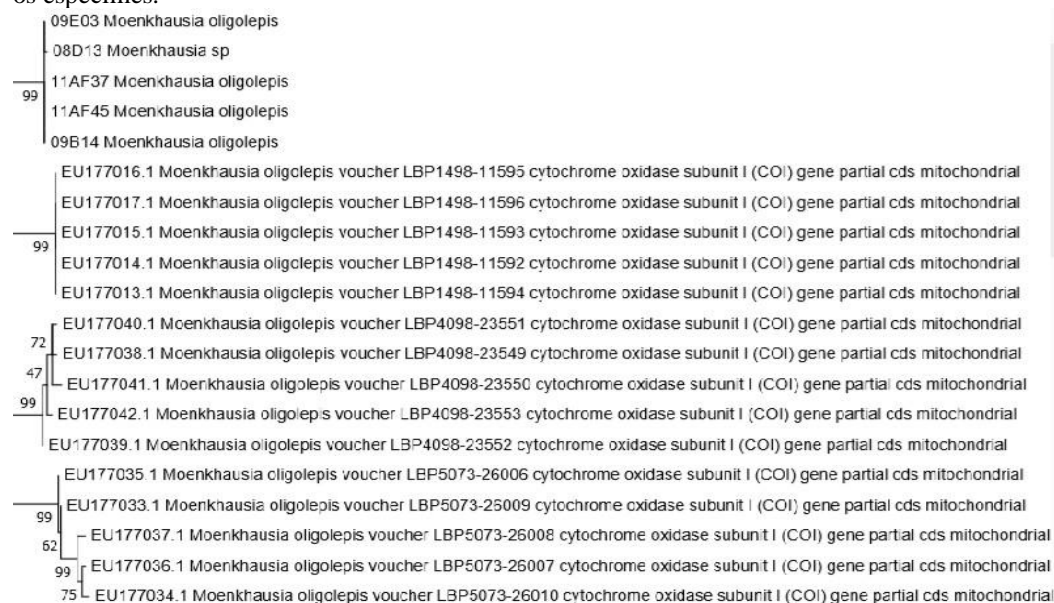
Figura 6: Representação da formação dos clados de *Moenkhausia sanctaefilomenae* com autovalor de suporte entre os espécimes.



Fonte: imagem do autor.

M. oligolepsi também não foi recuperada como espécie monofilética nos dados gerados no presente estudo. Todos os indivíduos provenientes do Rio Guamá, formaram um clado genético com alto valor de suporte (99%) em relação os clados formados pelas sequências provenientes do Gene Bank. Neste caso, assim como *M. sanctaefilomenae*, mais 3 clados foram recuperados, além do clado formado pelas amostras do presente estudo onde todos os indivíduos são provenientes da Bacia do Rio Paraná (Sequências com códigos EU177013- EU177042) (Figura 7).

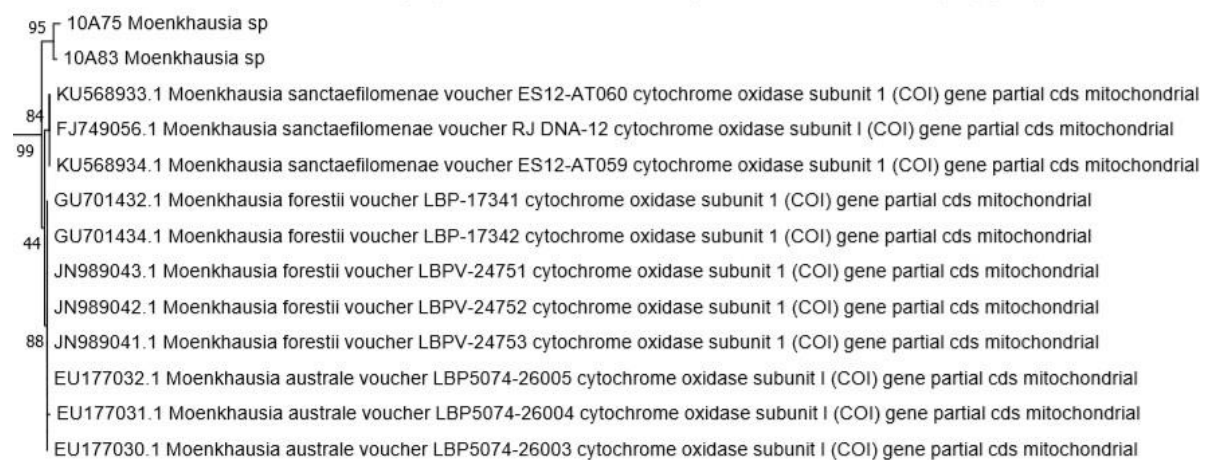
Figura 7: Representação da formação dos clados de *Moenkhausia oligolepsi* com autovalor de suporte entre os espécimes.



Fonte: imagem do autor.

Dois indivíduos provenientes do Rio Juaru foram recuperados dentro de um grande clado contendo as espécies *M. sanctaefilomenae*, *M. foresti* e *M. australe* onde essas duas últimas estão dentro de um clado com valores de suporte alto (88%). Os outros indivíduos do presente estudo formaram clados distintos entre localidades, ou seja, espécies provenientes de cada bacia foram todas agrupadas juntas, todas com alto valor de suporte (entre 88%-99%).

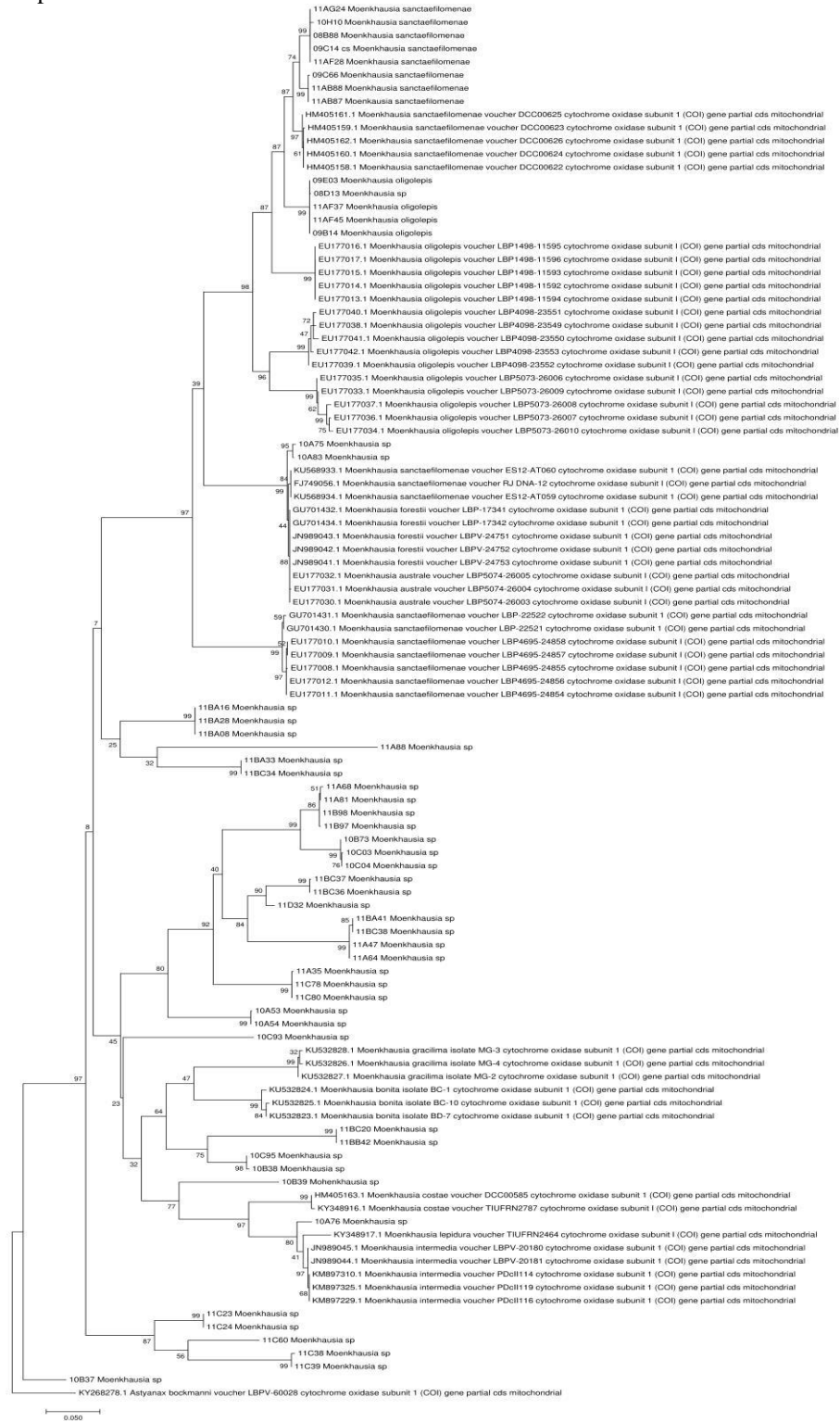
Figura 8: Representação da formação dos clados de *M. sanctaefilomenae*, *M. foresti* e *M. australe* com autovalor de suporte entre os espécimes.



Fonte: imagem do autor.

Os resultados obtidos no presente estudo reforçam a utilidade da Ferramenta de DNA *barcoding* em discriminar linhagens evolutivas distintas para peixes neotropicais de água doce. Pereira *et al.*, (2011) realizando a mesma inferência através da ferramenta de DNA *barcode* na espécie *Piabina argentea*, na bacia do rio Paraná, encontraram que esta espécie na verdade é constituída por 6 linhagens evolutivas distintas, distribuídas ao longo da bacia. Este mesmo padrão de alta diversidade em linhagens pode ser observado nas linhagens do gênero *Moenkhausia* do presente estudo. Ao longo das drenagens da porção amazônica de onde provem as amostras, foi possível observar ao menos 17 linhagens distintas de espécies do gênero (Figura 9).

Figura 9: Arvore filogenética de Agrupamento de Vizinhos (NJ) do gene COI contendo as amostras de *Moenkhausia* do presente estudo.



Fonte: imagem do autor.

Esta alta diversidade de linhagens, refletem 2 problemas: 1-Ausência de sequências de referência para comparação entre nossos dados e dados de genebank; 2-ausência de taxonomistas realizando inferência dentro do gênero na região. Levando-se em conta os últimos trabalhos de descrição de espécies do gênero *Moenkhausia*, como *M. calibela* presente nos Rios Amazonas e Tapajós (Marinho e Langeani., 2010) , *M. eurystaenia* no Xingu (Marinho, 2010) e *M. dasalmas* na bacia do Tocantins (Bertaco *et al.*, 2011)

Entretanto, para as espécies que possuem sequência de referência, a precisão da ferramenta em apontar presença de espécies crípticas é muito grande. No presente estudo, todos os indivíduos identificados como *M. sanctafilomeneae* foram geneticamente distintos de indivíduos de Minas Gerais. Este fato ate pode ser explicado em parte devido à distância geografia entre as bacias distintas dos rios, o que pode ser efeito do período das glaciações (Dahl, 1946) onde diferentes refúgios ambientais podem ter isolado grupos que estavam mais distantes. Entretanto, os dados do presente estudo apontam que houve a presença de mais de uma linhagem dentro de áreas relativamente próximas (linhagens nordeste paraense + Xingu e Quatipuru). O mesmo pode ser aplicado a *M. oligolepsi* do presente estudo, em relação às sequencias do Genebank.

Nos últimos anos, os esforços conjuntos entre sistemática tradicional e técnicas moleculares tem auxiliado na resolução de problemas taxonômicos em vários grupos de peixes neotropicais como *Bramocharax* (Valdez-Moreno *et al.*, 2009), *Megaleporinus* (Ramirez *et al.*, 2017), bem como uma serie de espécies da província argentina (Rosso *et al.*, 2012). Entretanto, este mesmo tipo de inferência conjunto (morfologia+ molecular) é escasso para *Moenkhausia* havendo poucos trabalhos ate o presente (Benine *et al.*, 2009, Domingos *et al.*, 2014). Tendo em vista a alta diversidade de linhagens apontadas no presente estudo, inferências conjuntas se fazem necessárias para elucidar a real diversidade de espécies do gênero *Moenkhausia* presente ao longo das bacias que cortam o estado do Pará.

5 CONCLUSÕES

De modo geral, os resultados apresentados mostram a grande eficácia de identificação molecular por DNA *barcode* para os peixes estudados, discriminando os espécimes analisados. Os resultados também revelaram divergências genéticas ocultas sugestivas de isolamento reprodutivo e especiação críptica. Finalmente, nosso estudo constituiu uma contribuição importante para o projeto internacional Barcoding of Life (iBOL.org), fornecendo sequências de códigos de barras para uso na identificação dessas espécies por especialistas e não especialistas, e permitindo que elas estejam disponíveis para uso em outras aplicações.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO-SANTOS, V.M. AND R. C. BENINE. A new species of *Moenkhausia* (Characiformes, Characidae) from the Içá River, Amazon Basin, northern Brazil. **Zoosystematics and Evolution**, v. 92 (n. 2): 203-209. 2016.
- ALBERT, J. S., & REIS, R. (Eds.). **Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes**. Univ of California Press. 2011.
- BENINE, R. C., MARIGUELA, T. C., & OLIVEIRA, C. New species of *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) with comments on the *Moenkhausia oligolepis* species complex. **Neotropical Ichthyology**, 7(2), 161-168. 2009.
- BERTACO, V. A., JEREP, F. C., & CARVALHO, F. R. New species of *Moenkhausia* Eigenmann (Ostariophysi: Characidae) from the upper Rio Tocantins basin in central Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 9(1), 57-63. 2011.
- CAMERON, S., RUBINOFF, D. & WILL, K. Who will actually use DNA barcoding and what will it cost? **Syst. Biol**, 55: 844-847, 2006.
- COSTA, W. J. E. M., Description of two new species of the genus *Moenkhausia* (Characiformes: Characidae) from the central Brazil. **Zool. Anz.** 232 (1-2): 21-29. 1994.
- DAGOSTA, F. C. P., M. M. F. MARINHO AND R. C. BENINE. A new species of *Moenkhausia* Eigenmann (Characiformes: Characidae) from the upper rio Juruena basin, central Brazil. **Zootaxa** 4032, (n. 4): 417-425. 2015.
- DAHL, E. On different types of unglaciated areas during the ice ages and their significance to phytogeography. **New Phytologist**, 45(2), 225-242. 1946.
- DOMINGOS, T. J., MORAES, L. N., MORESCO, R. M., MARGARIDO, V. P., & VENERE, P. C. Genetic and morphological diversity of *Moenkhausia oligolepis* (Characiformes: Characidae) populations in the tributaries of the Araguaia River, Brazil: implications for taxonomy and conservation. **Genetics and Molecular Research**, 13(3), 7979- 7991, 2014.
- EBACH, M. C & HOLDREGE, C. More Taxonomy, Not DNA Barcoding. **BioScience**, 55(10): 822-823, 2005.
- FOWLER, H. W. Os peixes de água doce do Brasil 1. **Arqui. Zool. Estado de S. Paulo**, v.6, n.1, 204 p. 1948.

GÉRY, J. A. & ZARSKÉ Moenkhausia heikoi n. sp., a new tetra (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the Rio Xingú basin, Brazil, with a supplementary description of the genus type species. aqua, **Journal of Ichthyology and Aquatic Biology**, v. 9 (no. 1): 29-43. 2004.

GIL, L. A. PCR-based methods for fish and fishery products authentication. **Trends in Food Science & Technology**, 18(11), 558-566, 2007.

HAJIBABAEI, M; SINGER, G. A; CLARE, E. L, HEBERT, P. D. N: Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. **BMC Biol**, 5:24. 2007.

HEBERT, P. D. N, RATNASINGHAM. S; DEWAARD. JR. Barcoding vida animal: as divergências da subunidade 1 da citocromo c oxidase estão intimamente relacionadas espécies. Procedimentos da Sociedade Real de Londres, série B: **Ciência Biológica, cias**, 270 (Supl.), S96-S99. 2003b .

HEBERT, P. D. N., CYWINSKA, A., BALL S. L., DE WAARD. J. R: Biological identifications through DNA barcodes. **Proc Biol Sci**, 270:313–321, 2003.

HEBERT, P. D. N., STOECKLE, M. Y., ZEMIAK, T. S., FRANCIS, C. M.. Identification of birds through DNA barcodes. **Plos boil.**, 2, 01-06, 2004.

JAVONILLO, R., MALABARBA, L. R., WEITZMAN, S. H., & BURNS, J. R. Relations hips among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 54(2), 498-511. 2010.

JARMAN, S. N., GALES, N. J., TIERNEY, M., GILL, P. C., & ELLIOTT, N. G. A DNA-based method for identification of krill species and its application to analysing the diet of marine vertebrate predators. **Molecular Ecology**, 11(12), 2679-2690. 2002.

KERR, C. R., STOECKLE, M. Y., WEIGT, L. A., FRANCIS, C. F., HEBERT, P. D. N. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. **Mol. Ecol. Notes**, 7, 535-543, 2007.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol**, 16: III- 120. 1980.

KUMAR. S., STECHER, G., TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol. Biol. Evol**, 33(7): 1870–1874. 2016.

LARA, A., PONCE, J. L., RODRÍGUEZ. R., CASANE. D., CÔTÉ, G., BERNATCHEZ. L., GARCÍA-MACHADO, E. DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, p. 421-430, 2010.

LIPSCOMB, D., N. PLATNICK, AND Q. WHEELER. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. **Trends in Ecology & Evolution**, 18:64–66, 2003.

LUNDBERG, J. G., MARSHALL, L. G.; GUERRERO, J.; HORTON, B.; MALABARBA, M. C. S. L.; WESSELINGH, F. The stage for neotropical fish diversification: A history of tropical South America rivers. Pp.13-48. *In*: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**, Porto Alegre, Edipucrs, 603p, 1998.

LEWINSOHN, T. M. e PRADO, P. I. **Biodiversidade brasileira**: síntese do estado atual do conhecimento. São Paulo: Editora Contexto, 2002.

LIMA, F. C. T., L. R. MALABARBA, P. A. BUCKUP, J. F. P, SILVA, R. P. VARI, A. HAROLD, R. BENINE, O. T. OYAKAWA, C. S. PAVANELLI, N. A. MENEZES, C. A. S. LUCENA, R. E. REIS, F. LANGEANI, L. CASATTI, V. A. BERTACO, C. R. MOREIRA & P. H. F. LUCINDA. Genera Incertae Sedis in Characidae. Pp. 106-169. *In*: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr. (Eds.). **Check List of the Freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Edipucrs, 2003. 729p.

LIZAMA, M. L. A. P.; AMBRÓSIO, A. M. Crescimento, recrutamento e mortalidade do pequi, *Moenkhausia intermedia* (Osteichthyes, Characidae) na planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum**: biological sciences. Maringá, v.25, n.2, p. 329-333, 2003.

LIMA, S. M. Q., RAMOS, T. P. A., DA SILVA, M. J., & DE SOUZA ROSA, R. Diversity, Distribution, and Conservation of the Caatinga Fishes: Advances and Challenges. *In*: **Caatinga**, (pp. 97-131). 2017. Springer, Cham.

LOURENÇO, L. S., MATEUS, L. A., MACHADO, N. G. Sincronia na reprodução de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Steindachner) na planície de inundação do rio Cuiabá, Pantanal Mato-grossense, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v 25, n.1, p. 20–27, 2008.

MARINHO, M. M. A new species of *Moenkhausia* Eigenmann (Characiformes: Characidae) from the rio Xingu basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 8(3), 655-659. 2010.

MARINHO, M. M. F., F. C. P. DAGOSTA, P. CAMELIER AND F. C. T. LIMA. Description of a new species of *Moenkhausia* (Characiformes, Characidae) from the Upper Rio Tapajós Basin, Brazil. **Copeia**, v. 104, n. 1: 243-249. 2016.

MARINHO, M. M. F., & LANGEANI, F. *Moenkhausia celibela*: a new species from the Amazon basin, Brazil (Characiformes: Characidae). **Journal of fish biology**, 77(4), 879-889. 2010.

MANOELA M. F. M., & FERNANDO, C. P. D. A new species of *Moenkhausia* Eigenmann (Characiformes: Characidae) from the rio Arinos basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 14(2): 2016.

MACHADO, C. A. S., RODRIGUES, T., MORALES, A. C. Análise do conteúdo estomacal de *Moenkhausia intermedia* (eigenmann, 1908) (characiformes: characidae), proveniente da lagoa do Diogo, bacia do Rio Mogiguaçu, Luís Antônio, estado de São Paulo. **Nucleus**, v.6, n.2, 7-20, 2009.

MACENO, J. F. S., NUNES, W. C., GODOI, D. S., DUARTE, C. R. A., JACYNTHO, L. A. Ecologia de *Moenkhausia lopesi*, (Britski & Silimon, 2001), (Characiformes: Characidae), da Sub-Bacia do Rio Queima-Pé em Tangará da Serra-MT. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13 n.24; p. 1215. 2016.

MORITZ, C. & CICERO, C. DNA barcoding: promise and pitfalls. **Plos Biol.**, 2:1529-1531. 2004.

MEYER, C.P. & PAULAY, G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. **Plos Biol.**, 3: 2005.

MYERS, N., MITTERMEIER, C.G., FONSECA, G. A.B., KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 408: 853-858, 2000.

NUSSBAUM, R. L., RODERICK R. M., HUNTINGTON F. W. **Thompson & Thompson, genética na medicina**. Rio de Janeiro : Ed. Elsevier, 2008.1514p.

NELSON, J. S., CROSSMAN, E. J., ESPINOSA-PEREZ, H., FINDLEY, L. T., GILBERT, C. R., LEA, R. N., & WILLIAMS, J. D. **Common and scientific names of fishes from the United States, Canada and Mexico**. American Fisheries Society. 2004

NWAN, C. D., BECKER, S., BRAID, H. E., UDE. F. E., OKOGWU, O. I., HANNER, R. DNA barcoding discriminates freshwater fishes from southeastern Nigeria and provides river system-level phylogeographic resolution within some species. **Mitochondrial DNA**, 22(S1):43-51. 2011

OLIVEIRA, C. AVELINO, S. G., ABE, T. K., MARIGUELA, C. T., BENINE, C. R., ORTÍ, G., VARI, P. R., AND CASTRO, C. M. R. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC evolutionary biology**, v. 11, n. 1, p. 275, 2011.

PEREIRA, L. H. G., MAIA, G. M. G., HANNER, R., FOREST, F., OLIVEIRA, C. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba de Sul River Basin, São Paulo, Brazil. **Mitochondrial DNA**, 21(S2):1-9. (2010b)

PEREIRA, L. H. G., HANNER, R., FORESTI, F., OLIVEIRA, C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics**, 14(20):1-14. 2013

PETROLI, M. G. AND R. C. BENINE. Description of three new species of *Moenkhausia* (Teleostei, Characiformes, Characidae) with the definition of the *Moenkhausia jamesi* species complex. **Zootaxa**, 3986 (n. 4): 401-420. 2015.

RASMUSSEN, R. S. & MORRISSEY, M. T. DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, 7(3), 280-295. 2008.

RAMIREZ, J. L., BIRINDELLI, J. L., CARVALHO, D. C., AFFONSO, P. R., VENERE, P. C., ORTEGA, H., & GALETTI JR, P. M. Revealing Hidden Diversity of the Underestimated Neotropical Ichthyofauna: DNA Barcoding in the Recently Described Genus *Megaleporinus* (Characiformes: Anostomidae). **Frontiers in genetics**, 8, 149. 2017

ROSSINI, B. C., OLIVEIRA, C. A. M., DE MELO, F. A. G., DE ARAÚJO BERTACO, V., DE ASTARLOA, J. M. D., ROSSO, J. J. & OLIVEIRA, C. Highlighting *Astyanax* species diversity through DNA barcoding. **PloS one**, 11(12), 2016.

RUBINOFF, D., CAMERON, S. & WILL, K. A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for “Barcoding” identification. **J. Hered.**, 97:581-594. 2006.

RAIO, C. B. **Caracterização sistemática do gênero *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes, Characidae)**. 2014. 321p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2014.

ROSSO, J. J., MABRAGAÑA, E., GONZALEZ CASTRO, M., & DÍAZ DE ASTARLOA, J. M. DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. **Molecular Ecology Resources**, 12(6), 999-1011, 2012.

RUBINOFF, D. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. **Conservation Biology**, v. 20, n. 4, p. 1026-1033, 2006.

RYDER, O. A. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. **Trends Ecol. Evol.**, n.1, p.9-10, 1986.

SACCONI, C., DECARLA, G., GISSI, C., PESOLE, G. & REYNES, A. Evolutionary genomics in the Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238, 195-210.
STENSETH, N. C. 1984. The tropics: Cradle or museum? **Oikos**, 43: 417–420. 1999.

SMITH, M. A; POYARKOV, N. A; HEBERT, P. D. N. COI DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. **Mol. Ecol. Notes**, 8, 235-246. 2008a.

SOUSA, L. M; NETTO-FERREIRA, A. L.; BIRINDELLI, J. O. Two new species of *Moenkhausia* Eigenmann (Characiformes: Characidae) from Serra do Cachimbo, Pará, **Northern Brazil**, 8(2):255-264, 2010.

SOUZA, N. G. S.; WORTMANN, M. L. C.; KINDEL, E. A. I. A importância de considerar-se o ambiente no estudo dos peixes. In: WORTMANN, M. L. C; SOUZA, N. G. S; KINDEL, E. A. I. (Org). **O estudo dos vertebrados na escola fundamental**. São Leopoldo – RS: Ed. UNISINOS, 1999. p. 111-117.

VALDEZ-MORENO, M., IVANOVA, N. V., ELÍAS-GUTIÉRREZ, M., CONTRERAS-BALDERAS, S., & HEBERT, P. D. N. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA *barcodes*. **Journal of Fish Biology**, 74(2), 377-402. 2009.

WARD, R. D., ZEMLAK, T. S., INNES, B. H., LAST, P. R., & HEBERT, P. D. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857. 2005

WARD, R.D; HANNER. R; HEBERT, P.D. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of Fish Biology**, 74 , 329–356. 2009

WHEELER, W. et al. **Dynamic Homology and Phylogenetic Systematics: A Unified Approach Using POY**. New York: American Museum of Natural History, 2006.

WHITWORTH, T., DAWSON. R., MAGALON. H, BAUDRY, E. DNA *barcoding* cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1619):1731-1739. 2007. doi:10.1098/rspb.2007.0062.

YUAN, W. A. Diagnostic PCR to identify five rare species of Cypriniformes in China. **Molecular ecology resources**, 10(6), 1092-1097, 2010.

ZAVALA-CAMIN, L. A. **Introdução aos estudos sobre alimentação natural em peixes**. Maringá: Eduem Nupelia, 1996. 129p.