



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

VALÉRIA MARTINS DE ANDRADE

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE BAIACU DO
GÊNERO *Colomesus* Gill, 1884 NA REGIÃO DE BREVES, ILHA DE
MARAJÓ

BREVES-PA
2020

VALÉRIA MARTINS DE ANDRADE

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE BAIACU DO
GÊNERO *Colomesus* Gill, 1884 NA 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: Prof. Dr. João Braullio de Luna Sales

BREVES-PA
2020

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)

A553i Andrade, Valéria Martins de
Identificação molecular das espécies de baiacu do gênero
Colomesus Gill, 1884 na região de Breves, Ilha de Marajó / Valéria
Martins de Andrade. — 2020.
34 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. João Braullio de Luna Sales
Coorientador(a): Prof. Dr. Tiago Magalhães da Silva Freitas

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de
Ciências Naturais, Campus Universitário de Breves, Universidade
Federal do Pará, Breves, 2020.

1. Tetraodontiformes. 2. COI. 3. DNA barcode. 4. Filogenia.
5. Linhagem. I. Título.

CDD 576.5809811

VALÉRIA MARTINS DE ANDRADE

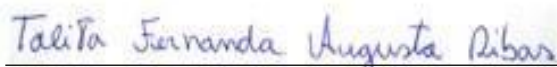
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE BAIACU DO
GÊNERO *Colomesus* Gill, 1884 NA REGIÃO DE BREVES, ILHA DE
MARAJÓ

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 **BOM**.

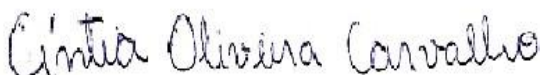
Comissão examinadora:



Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales
CEABIO, ICB – UFPA (Orientador)



Dra. Talita Fernanda Augusto Ribas
CEABIO, PPGEAP-UFPA (Titular)



Msc. Cintia Oliveira Carvalho CEABIO,
PPGEAP-UFPA (Titular)

Breves (PA), 21 de Julho de 2020.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe pelo apoio incondicional, por me permitir parar de trabalhar e me dedicar a graduação, a minha primeira orientadora pela paciência e companheirismo, ao atual orientador e aos amigos que sempre estiveram comigo durante a graduação.

“From so simple a beginning endless forms
most beautiful and most wonderful have been,
and are being, evolved.”

Charles Darwin, *On the origins of species*
(1859)

RESUMO

A ordem Tetraodontiforme está distribuída em mares e águas doces de clima tropical e temperado. Possuem notável diversidade em forma, tamanho e estilo de vida. Esta ordem abriga peixes popularmente conhecidos como “baiacus” pertencentes as famílias, Diodontidae e Tetraodontidae. Baiacus possuem poucas características externas úteis para taxonomia e estas são facilmente distorcidas quando os espécimes são fixados em formol e preservadas em etanol, tornando difícil o processo de reconhecimento de espécies e sua classificação. Dessa forma, ferramentas complementares à sistemática, como a utilização de DNA, vêm auxiliando pesquisadores na investigação da presença de novas linhagens moleculares. DNA Barcoding, é um método para a identificação rápida de espécies, baseado na extração de uma sequência de DNA de uma pequena amostra de um organismo utilizando o gene COI como marcador universal. O objetivo do presente estudo é, através da ferramenta do DNA Barcoding, investigar qual linhagem do gênero *Colomesus*, ocorre na região de Breves, Ilha do Marajó. Amostras de tecido muscular foram retiradas de oito espécimes previamente identificadas como *Colomesus asellus* coletados na região de Breves onde as sequências geradas foram comparadas com sequências disponíveis de outras localidades. Os resultados revelaram a formação de três clados distintos com valor de suporte significativos sugerindo a existência de uma nova linhagem dentro do gênero. Foi possível demonstrar desta forma, a eficácia da ferramenta DNA Barcode em evidenciar que o status da espécie em questão na região de Breves deve ser revisado com ampliações de amostragens ao longo da região oeste da Ilha do Marajó.

Palavras-chave: Tetraodontiformes, Citocromo Oxidase subunidade I, DNA barcode, linhagem, filogenia.

ABSTRACT

The order Tetraodontiforme is distributed in seas and fresh waters of tropical and temperate climate areas around the world. The specimens have a remarkable diversity in shape, size and lifestyle. This order houses fish popularly known as "pufferfish" belonging to the families, Diodontidae and Tetraodontidae. Pufferfish have few external characteristics useful for taxonomy and these are easily distorted when specimens are fixed in formaldehyde and preserved in ethanol, making the process of species recognition and classification difficult, therefore, complementary to systematic tools, such as the use of DNA, have been assisting researchers in investigating the presence of new molecular strains. DNA Barcoding, is a method for the rapid identification of any species, based on the extraction of a DNA sequence from a small sample of any organism utilizing the gene COI like an universal marker. The objective of the present study is, apply the barcodes approach to investigate which lineage of the *Colomesus* genus, occurs in the region of Breves, Marajó's Island. Muscle tissue samples were taken from eight specimens of *Colomesus asellus* collected in Breves and compared to sequences from other locations. The results revealed the formation of three distinct clades with significant support value. The data obtained show the possible existence of a new lineage within the genus. We were able to present the effectiveness of the barcode tool and show that the status of the species *C. asellus* in Breves region must be revised, with a wider sampling of the species through the west of Marajó's Island.

Keywords: Tetraodontiformes, Cytochrome Oxidase subunit I, DNA barcode, lineages, phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Filogenia da ordem Tetraodontiformes, destacando as famílias Tetraodontidae e Diodontidae.....	10
Figura 2 -	Representantes de famílias da ordem Tetraodontiformes.....	13
Figura 3 -	Padrões de distribuição de espécies da família Tetraodontidae de ocorrência marinha (sombreado) e de água doce (verde – América do Sul, amarelo – África Central e vermelho – Sudeste da Ásia).....	15
Figura 4 -	<i>Colomesus asellus</i> (Müller & Troschel, 1849).....	16
Figura 5 -	<i>Colomesus psittacus</i> (Bloch & Schneider, 1801).....	16
Figura 6 -	<i>Colomesus tocantinensis</i> (Amaral, Brito, Silva & Carvalho, 2013).....	16
Figura 7 -	Área de coleta (pontilhado) dos espécimes do presente estudo.....	19
Figura 8 -	Localidade e número de sequências de <i>Colomesus</i> utilizadas neste estudo e da espécie tipo de <i>C. asellus</i> em azul (Guiana-Rio Barama), amarelo (três) (Santana-AP), vermelho (três) (Belém-PA), laranja (quatro) (Mocajuba-PA), marrom (sete) (Iquitos-Peru), verde (oito) (Breves-PA-presente estudo), <i>C. tocantinenses</i> (nove), roxo (Porto Nacional-TO) e <i>C. psittacus</i> em verde marinho 1, 2 (três) (1-Soare-PA), (dois) (2-Raposa-MA).....	20
Figura 9 -	Árvore filogenética com espécies do gênero <i>Sphoeroides</i> e <i>Colomesus</i> . Valores de suporte dos clados em NJ, ML e IB, respectivamente. As cores estão de acordo com as marcações do mapa.....	23
Figura 10 -	Paleogeografia do noroeste da América do Sul durante o período do Mioceno.....	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	10
1.2	PEIXES NEOTROPICAIS.....	12
1.3	ESPÉCIES DE BAIACU E SUA IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA.....	13
1.4	FERRAMENTAS MOLECULARES COMO MÉTODO E AUXÍLIO DE IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE ANIMAIS.....	17
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	AMOSTRAGEM.....	18
3.2	PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS E ANÁLISES MOLECULARES.....	19
4	RESULTADOS E DICUSSÃO	21
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
	REFERÊNCIAS	27
	ANEXO A – CÓDIGOS DAS ESPÉCIES, ORIGENS E REFERÊNCIAS	34

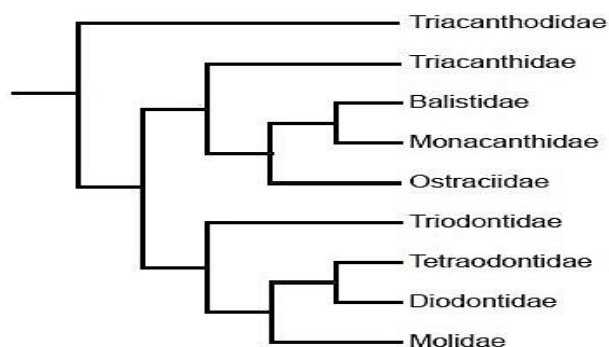
1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os peixes correspondem a mais da metade das 55.000 espécies de vertebrados vivos. A cada ano novos indivíduos são descritos, segundo Nelson (2016), cerca de 32.000 espécies de vertebrados do mundo são peixes, estes exibem muita complexidade em sua morfologia, fisiologia, comportamento e habitats que ocupam. Pode ser difícil tentar definir o que é um “peixe”, dada a diversidade de adaptações que caracterizam as espécies de hoje, tendo cada grupo uma história evolutiva de milhões de anos (HELFMAN, *et al.*, 2009). Para colonizar e se estabelecer em meios tão variados, estes desenvolveram impressionantes adaptações, dito isto, são excelentes exemplos do processo evolucionário, exemplificando o íntimo relacionamento entre forma e função e entre habitat e adaptação (HELFMAN, *et al.*, 2009).

Os peixes foram capazes de ocupar quase todos os ecossistemas aquáticos que ocorrem naturalmente, com qualquer grau de permanência ou previsibilidade (HELFMAN, *et al.*, 2009). E apesar da água doce ocupar uma pequena porção da superfície terrestre, os peixes habitantes representam cerca de 40-45% de todas as espécies (YAMANOUE, *et al.*, 2011). Dentre estas espécies de peixes, a ordem Tetraodontiforme está distribuída em mares e águas doces de clima tropical e temperado. Possuem uma notável diversidade em forma, tamanho e estilo de vida (MATSUURA, 2015). Esta ordem abriga peixes popularmente conhecidos como “baiacus” que compreendem duas famílias, Diodontidae (Bonaparte, 1835) e Tetraodontidae (Bonaparte, 1831). Devido a sua relação familiar e análises moleculares, esses grupos foram considerados por Santini e Tyler (2003), como grupos irmãos (Figura 1).

Figura 1: Filogenia da ordem Tetraodontiformes, destacando as famílias Tetraodontidae e Diodontidae



Fonte: Yamanoue (2008) baseada em Santini e Tyler (2003).

Matsuura (2015) argumenta que, baiacus possuem poucas características externas úteis para taxonomia e estas são facilmente distorcidas quando os espécimes são fixados em formol e preservadas em etanol, o que torna difícil o processo de reconhecimento de espécies e sua classificação. Além do mais, pesquisadores que não possuem especialidade em taxonomia – ou até mesmo especialistas – podem encontrar dificuldades para identificação em campo, pois chaves taxonômicas são demoradas e trabalhosas, com o adendo de que alguns animais podem ter sua morfologia externa danificada por algum evento, prejudicando ainda mais um possível reconhecimento (HEBERT, *et al.*, 2003, 2004) Dito isto, maneiras alternativas de identificação devem ser buscadas, como por exemplo, o uso de ferramentas moleculares.

Nos últimos anos, ferramentas complementares à sistemática, como a utilização de DNA, vêm auxiliando pesquisadores na investigação sobre a presença de novas linhagens moleculares, dentro de espécies de peixes (CARVALHO, *et al.*, 2008; PEREIRA, *et al.*, 2013; PUGEDO, *et al.*, 2016; CARVALHO, *et al.*, 2018; GUIMARÃES, *et al.*, 2018). Segundo Helfman, *et al.* (2009), o acesso a sequências de DNA revolucionou o campo da filogenética. Pesquisadores podem distinguir desde o relacionamento entre peixes e suas linhagens iniciais até os mais recentes eventos de especiação. Ramadan & Baeshen (2012), acreditam que a perspectiva única para uma capacidade de identificação sustentável encontra-se na construção de sistemas que empreguem sequências de DNA.

DNA Barcode, é uma ferramenta molecular utilizada para a identificação rápida de qualquer espécie, baseado na extração de uma sequência de DNA de uma pequena amostra de qualquer organismo (KRESS; ERICKSON, 2012). Como uma ferramenta para a descoberta de biodiversidade, pode ajudar a sinalizar espécies potencialmente novas para a ciência (CARVALHO, *et al.* 2011; SHIMABUKURO-DIAS, *et al.* 2016; MELO, *et al.* 2016; NASCIMENTO, *et al.* 2016; RAMIREZ, *et al.* 2017). E como uma ferramenta biológica, é usado para tratar questões ecológicas e evolutivas (KRESS; ERICKSON, 2012). Essa ferramenta é um empreendimento global que fornece um marcador genético padronizado e eficaz para a biodiversidade, com significantes aplicações em conservação (TURAN, *et al.* 2017).

Ainda não há estudos feitos sobre uma possível população de espécimes de *Colomesus* (GILL, 1884) nesta região específica da América do Sul a fim de ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade da região e avaliar a eficácia da ferramenta DNA Barcode. Desta forma, o presente estudo visa gerar os primeiros dados sobre a caracterização molecular das

espécies deste gênero, presentes no entorno de Breves, Ilha de Marajó. Visto que investigações anteriores mostraram diversificação do gênero na região do rio Tocantins (AMARAL, *et al.* 2011).

1.2 PEIXES NEOTROPICAIS

A definição formal da região Neotropical começou com Sclater (1858), que dividiu o mundo em seis regiões zoogeográficas, baseadas em classes de aves. Duas décadas depois, Wallace (1876) fez o mesmo com outros vertebrados. De acordo com Morrone (2014), o sistema de Sclater-Wallace diz que, a região Neotropical abrange desde a América do Sul e América Central até o México. É uma das regiões com mais riqueza de espécies na Terra, pois compreende diferentes biomas e habitats, tais como zonas áridas e extensas florestas tropicais, como a Floresta Atlântica e a Amazônia (ANTONELLI, *et al.*, 2018).

Segundo Antonelli *et al.* (2018), a diversidade Neotropical é extensa em algumas regiões, como por exemplo na Amazônia, onde a especiação em ambientes de floresta tropical tomaram lugar desde o Paleoceno a ~58 milhões de anos atrás (*apud* WING, Scott L. *et al.*, 2009). Isso nos mostra que a Amazônia é a fonte primária da biodiversidade Neotropical, que não apenas gerou enorme diversidade local como também providenciou linhagens para outras regiões neotropicais (ANTONELLI, *et al.*, 2018).

De acordo com Lundberg, *et al.* (1998), a história sobre a origem dos peixes Neotropicais de água doce está relacionada com a evolução geomorfológica do continente e a longa e complexa história de formação do cenário e sistema de rios da América do Sul deve ser considerada como precedente da diversificação ocorrida durante os antigos períodos Cretáceo e Cenozóico, devido as constantes mudanças de sistemas de drenagem, vicariância, divergência alopátrica e especiações. Apesar da grande informação disponível, discussões sobre a biodiversidade da ictiofauna Neotropical ainda são escassas, a maioria dos estudos sobre a ascendência da riqueza de espécies são focados em pássaros, mamíferos e insetos (ALBERT; REIS, 2011).

Os peixes neotropicais de água doce representam uma em cinco das espécies mundiais de peixes, ou cerca de 10% de todas as espécies de vertebrados (VARI; MALABARBA, 1998). Albert; Reis (2011) enfatizam que, qualquer entendimento sobre a evolução de vertebrados deve considerar antes a diversificação de peixes na bacia amazônica e regiões

adjacentes.

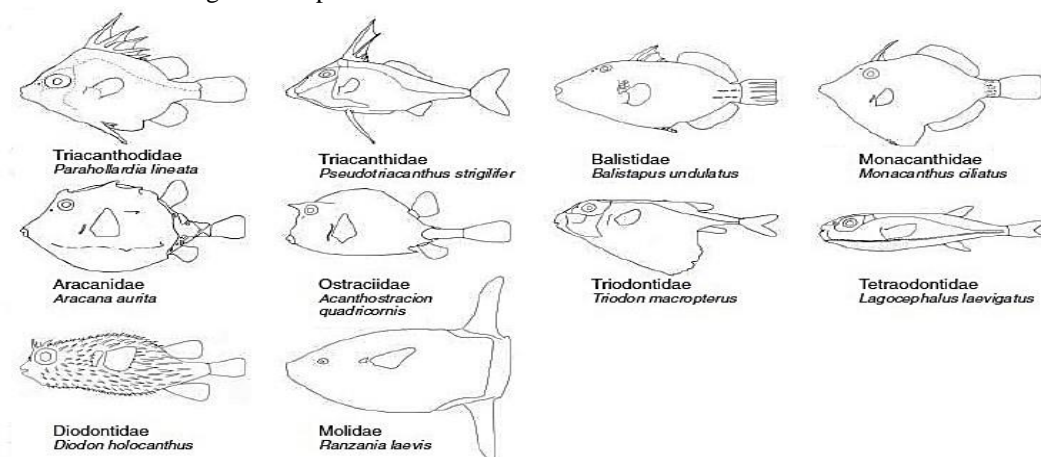
A ictiofauna neotropical é facilmente reconhecida, pois peixes dessa região pertencem a relativamente poucos clados, e esses clados estão conspicuamente ausentes de regiões adjacentes (ALBERT, *et al.*, 2011). Na classificação Lineana a ictiofauna neotropical inclui 43 famílias ou sub-famílias endêmicas, e quase todas destas estão presentes na Amazônia (REIS, *et al.* 2003). Essa fauna é dominada por peixes da super ordem Ostariophysi, isto é, ordens como: Characiformes, Siluriformes e Gymnotiformes (ALBERT, *et al.* 2011).

O neotrópico é a única região biogeográfica em que os ecossistemas aquáticos retêm um alto nível de riqueza de espécies (ALBERT, *et al.* 2011). Conhecer a razão da diversidade dessas espécies de peixes é um pré-requisito para termos a capacidade de avaliar, prever e amenizar as consequências das modificações humanas, presentes e futuras, sobre os sistemas aquáticos neotropicais (VARI; MALABARBA, 1998).

1.3 ESPÉCIES DE BAIACU E SUA IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA

A ordem Tetraodontiformes é composta por cinco subordens, dez famílias (figura 2) com aproximadamente 106 gêneros e 435 espécies (Nelson, 2016), e possuem grande diversidade na forma do seu corpo e estrutura osteológica (Santini & Tyler, 2003). O estômago de alguns tetraodontiformes é altamente modificado para permitir a inflação a um tamanho maior que seu corpo e peixes com essa habilidade pertencem a família Tetraodontidae, Diodontidae, e Triodontidae, sendo que esta última possui essa habilidade menos desenvolvida (NELSON, 2016).

Figura 2: Representantes de famílias da ordem Tetraodontiformes.



Fonte: Santini e Tyler (2003).

Baiacus são conhecidos por serem venenosos, devido a presença de neurotoxinas letais, Tetrodotoxina (TTX) e/ou Saxitoxina (STX) (SILVA, *et al.*, 2010). A carne, especialmente as vísceras de alguns baiacus, são contaminadas. E em algumas espécies, existem altas concentrações nas gônadas no período de reprodução (NELSON, 2016). De acordo com o estudo de caso reportado por Field (1998), a ação das neurotoxinas pode ocasionar paralisia muscular, problemas de respiração e falhas circulatórias, devido agirem no sistema nervoso periférico, motor, sensorial e autônomo, portanto, bloqueiam os canais de sódio por onde íons de sódio transitam durante o início do potencial de ação.

Na família Diodontidae os baiacus diferem externamente de outras famílias da mesma ordem. Seu corpo tem uma capacidade maior de inflar e sua pele possui espinhos (MATSUURA, 2015). Os Tetraodontidae também inflam o corpo ao se sentirem ameaçados, porém, possuem pouca quantidade ou nenhum espinho, quando presente são curtos e se localizam na face ventral (NELSON, 2016). Uma classificação baseada em morfologia que dividiu a família Tetraodontidae em duas subfamílias, Canthigasterinae e Tetraodontinae, foi refutada após a realização de estudos moleculares (YAMANOUE, *et al.*, 2011).

A família Tetraodontidae possui 184 espécies de baiacus e está distribuída em 27 gêneros (tabela 1) (MATSUURA, 2015). Podem ocorrer em habitats como o litoral e estuários, mas aproximadamente 29 espécies de tetraodontidae passam seu ciclo de vida completo em águas doces localizadas na América do Sul, África Central e no sudeste da Ásia (figura 3) (YAMANOUE, *et al.*, 2011).

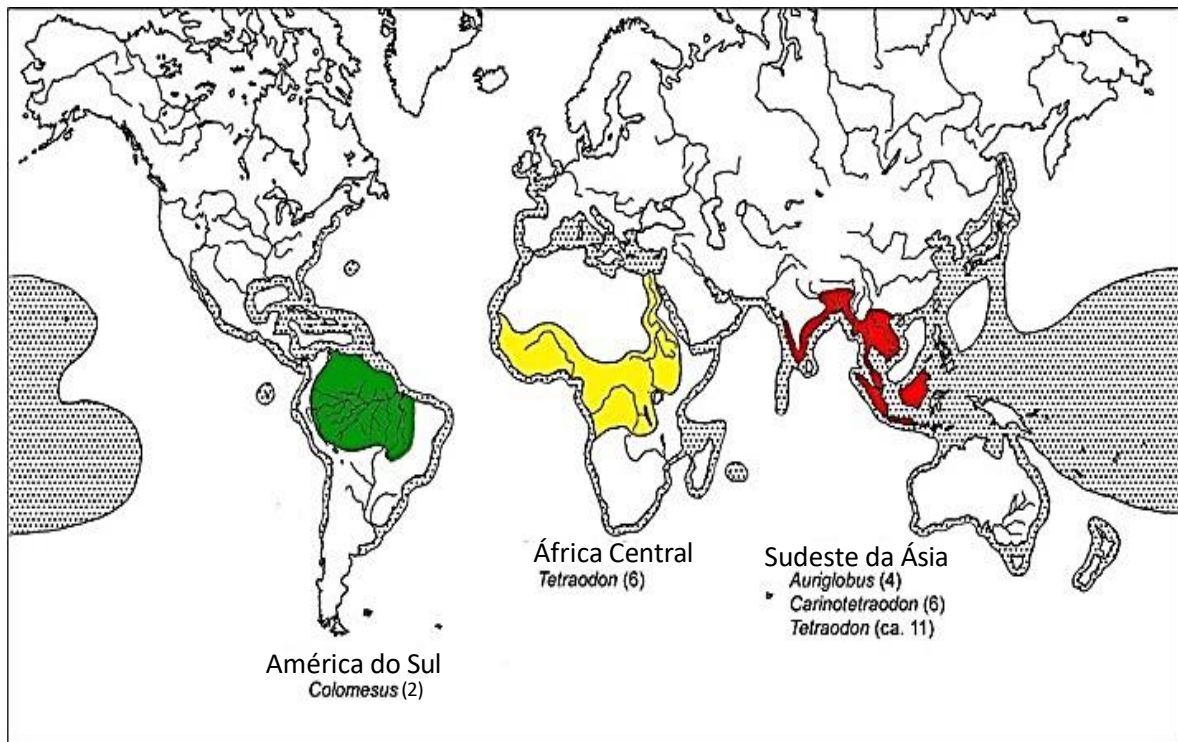
Tabela 1: Membros atuais da Família Tetraodontidae contendo gêneros e número de espécies válidas.

Gênero	Número de espécies	Gênero	Número de espécies
<i>Amblyrhynchote</i> Bibron & Duméril, 1855	1	<i>Contusus</i> Whitley, 1947	2
<i>Arothron</i> Müller, 1841	11	<i>Dichotomyctere</i> Duméril, 1855	6
<i>Auriglobus</i> Kottelat, 1999	5	<i>Ephippion</i> Bibron & Duméril, 1855	1
<i>Carinotetraodon</i> Benl, 1957	5	<i>Guentheridia</i> Gilbert & Starks, 1904	1
<i>Chelonodontops</i> Smith, 1958	2	<i>Javichthys</i> Hardy, 1985	1
<i>Colomesus</i> Gill, 1884	3	<i>Lagocephalus</i> Swainson, 1839	11

<i>Leiodon</i> Swainson, 1839	1	<i>Marilyna</i> Hardy, 1982	3
<i>Omegophora</i> Whitley, 1934	2	<i>Pelagocephalus</i> Tyler & Paxton, 1979	2
<i>Pao</i> Kottelat, 2013	14	<i>Polyspina</i> Hardy, 1983	1
<i>qReicheltia</i> Hardy, 1982	1	<i>Spherooides</i> Anonymous, 1798	20
<i>Takifugu</i> Abe, 1949	25	<i>Tetractenos</i> Hardy, 1983	2
<i>Tetraodon</i> Linnaeus, 1758	6	<i>Torquigener</i> Whitley, 1930	20
<i>Tylerius</i> Hardy, 1984	1		
Total de espécies: 184			

Fonte: Matsuura (2015)

Figura 3: Padrões de distribuição de espécies da família Tetraodontidae de ocorrência marinha (sombreado) e de água doce (verde – América do Sul, amarelo – África Central e vermelho – Sudeste da Ásia).



Fonte: Yamanoue et al. (2011) com modificações.

Algumas espécies de baiacus são consumidas como um tipo de iguaria, principalmente no Japão onde é conhecido popularmente como Fugu e são preparados por chefes com um certificado e especializados no corte desse tipo de carne exótica, já que suas toxinas podem ser letais (Silva *et al.*, 2010). Em dois estados do Brasil (Santa Catarina e Bahia), no período de

1984 a 2009, houveram 27 casos de envenenamento devido o consumo da carne do baiacu, onde dois óbitos foram registrados (Silva *et al.*, 2010). Um estudo de Piah (2011), mostra as espécies *Marilyna pleurosticta* (Günter, 1872) e *Tetractenos hamiltoniano* (Richardson, 1846) como biomonitores de metais e pesticidas na contaminação de estuários australianos. A espécie *C. asellus*, possui valor comercial para a aquariofilia.

O gênero *Colomesus* está confinado a América do Sul e abrange três espécies válidas. *Colomesus psittacus* (Bloch & Schneider, 1801), pode ser encontrado em águas marinhas ou salobras, distribuídas entre Cuba, costa norte da América do Sul e Sergipe. *Colomesus asellus* (Müller & Troschel, 1849), de água doce, encontra-se em toda a Amazônia, drenagens do Tocantins-Araguaia e águas costeiras da boca do Amazonas até a Venezuela. E a espécie *Colomesus tocantinensis* (Amaral, Brito, Silva & Carvalho, 2013), está distribuída ao longo do Rio Tocantins (Amaral *et al.*, 2013).

Figura 4: *Colomesus asellus* (Müller & Troschel, 1849)



Fonte: FishBase. Holm, E.

Figura 5: *Colomesus psittacus* (Bloch; Schneider, 1801).



Fonte: FishBase. Holm, E.

Figura 6: *Colomesus tocantinensis* (Amaral, Brito, Silva & Carvalho, 2013).



Fonte: Amaral *et al.* (2011)

1.4 FERRAMENTAS MOLECULARES COMO MÉTODO E AUXÍLIO DE IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE ANIMAIS

Ferramentas moleculares baseadas em DNA tem sido um marco no auxílio e na identificação de espécies. Proposto por Hebert *et al.* (2003), o conceito de DNA barcode tem atraído a atenção de pesquisadores que encontram diversas dificuldades na realização da identificação de espécies. Seja por motivos de falta de conhecimento em taxonomia, ou mesmo quando se tem esse conhecimento e possui uma chave de identificação em mãos no campo, mas a espécie pode estar em estágio larval, ser um juvenil, apresentar dimorfismo sexual ou examiná-los pode ser perigoso e inapropriado por questões éticas (Cerutti-Pereyra *et al.*, 2012). As ferramentas moleculares também podem ser usadas por taxonomistas que desejam confirmar a veracidade do seu diagnóstico sobre a identificação de uma espécie.

O DNA barcode consiste em isolar uma parte específica do DNA mitocondrial (mtDNA), e padronizá-la para a identificação global de todas as espécies de animais. Um fragmento do gene codificador da proteína Citocromo Oxidase subunidade I (COI), foi escolhido pela razão de que o mesmo tem facilidade para ser amplificado em qualquer estágio de vida do animal e sua variação é menor dentro de espécies do que entre espécies. Existem outros genes que também podem ser usados, mas o COI é considerado como a melhor alternativa até o momento (Tresbach *et al.*, 2014).

Kress & Erickson (2012) afirmam que, barcoding consiste em dois passos básicos: (1) construção de uma biblioteca com sequências hospedadas e (2) combinar a sequência de barcode desconhecida com alguma outra sequência hospedada previamente na biblioteca. Hebert *et al.*, (2003), acreditam que em vinte anos essa ferramenta terá avançado o suficiente para tornar possível a identificação da maioria das espécies, por um baixo custo e que a partir de estabelecido, esse sistema de identificação micro genômica irá superar os déficits de abordagens morfológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo é, investigar qual ou quais linhagens do gênero *Colomesus*, ocorrem na região de Breves, Ilha do Marajó. Assim, enriquecendo o conhecimento a respeito da ictiofauna regional.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar se a linhagem da espécie presente na região de Breves, corresponde de maneira molecular a *C. asellus*;
- Investigar a possível presença de mais de uma linhagem molecular de *C. asellus* na região.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

O rio Parauaú, onde as amostras foram coletadas, é o principal meio de acesso à cidade de Breves, localizada na Ilha do Marajó. Apesar das ações antrópicas sobre o rio, como descarte irregular da rede de esgoto do município e tráfego intenso de embarcações, este ainda contém ictiofauna relativamente variada.

Para o presente estudo, oito espécimes de *Colomesus asellus* foram coletadas com rede de emalhar, no rio Parauaú, em frente a cidade de Breves (figura 7). Os indivíduos foram colocados em gelo e tiveram um pedaço de tecido muscular retirado e acondicionado em eppendorf, contendo álcool absoluto e em condições livres de contaminação. Os indivíduos então foram enviados ao museu de Ictiologia da Universidade Santa Cecília (SP), onde foram identificados com chaves específicas (Nelson, 2006). Os eppendorfs foram levados ao laboratório de filogenômica da UFPA-Campus de Bragança e mantidos em freezer até o momento da extração de DNA.

Figura 7: Área de coleta (pontilhado) dos espécimes do presente estudo



Fonte: ArcGIS.

3.2 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS E ANÁLISES MOLECULARES

O DNA das amostras foi extraído a partir do tecido muscular utilizando o kit Wizard Genomics DNA Purification (Promega) seguindo o protocolo Mouse Tail. Um fragmento do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI) de 650 pares de base foi isolado e amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os iniciadores LCO1490 (5'-GGTCAAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HCO 2198 (5'-TAAAATTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994).

As reações da PCR foram realizadas contendo um volume final de 25 µl contendo 4 µl de dNTP, 2,5 µl de solução tampão (10X), 1 µl de MgCl₂, 0,25 µl de cada iniciador, 0,2 µl de Taq DNA polimerase, 2 µl de DNA genômico e água bi-destilada estéril para completar o volume final da reação. As reações foram realizadas na máquina Termocycler sob as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial de 94°C durante 2 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 s, hibridização a 51°C durante 1 min e extensão a 72°C durante 2 min, com a etapa de extensão final de 72°C no período de 7 min. Os resultados positivos foram sequenciados utilizando o Kit *ABI PrismTM Dye Terminator Cycle Sequencing Reading Reaction (Applied Biosystems)*, seguindo-se de eletroforese, no sequenciador *ABI 3500 (Applied Biosystems)*.

As sequências de DNA obtidas no presente estudo foram alinhadas com auxílio da ferramenta de alinhamento automática CLUSTAL W (Thompson et al., 1997) implementada no programa BioEdit versão 7.0.9.1 (Hall, 1999). Posteriormente, as sequências foram conferidas manualmente a olho nu na busca de possíveis erros do alinhamento automático. Adicionalmente as sequências geradas, sequências do gênero *Colomesus* (figura 8) foram baixadas do banco de dados do *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov), além de sequências de *Sphoeroides testudineus* (Linnaeus, 1758), *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842) e *Sphoeroides spengleri* (Bloch, 1785), que foram utilizadas como grupo externo para as reconstruções filogenéticas, totalizando um banco de dados com 42 sequências (anexo 1).

Figura 8: Localidade e número de sequências de *Colomesus* utilizadas neste estudo e da espécie tipo de *C. asellus* em azul (Guiana-Rio Barama), amarelo (três) (Santana-AP), vermelho (três) (Belém-PA), laranja (quatro) (Mocajuba-PA), marrom (sete) (Iquitos-Peru), verde (oito) (Breves-PA-presente estudo), *C. tocantinenses* (nove), roxo (Porto Nacional-TO) e *C. psittacus* em verde marinho 1, 2 (três) (1-Soure-PA), (dois) (2-Raposa-MA).



Fonte: Google Earth.

Três métodos distintos foram empregados no presente estudo. Inicialmente, foi gerada uma árvore de agrupamento de vizinho (*Neighbor-Joining*) (Saitou & Nei, 1987), com o auxílio do programa MEGA 6.0 (Tamura, et al., 2013), utilizando o modelo de substituição nucleotídica de K2P (KIMURA, 1980). O dendrograma do agrupamento de vizinhos foi criado com o objetivo de representar os agrupamentos das espécies identificadas nas amostras. O suporte estatístico para cada ramo foi avaliado por meio 1000 repetições de *bootstrap*

(Felsenstein, 1985). Posteriormente, uma árvore de máxima verossimilhança (ML) foi construída no programa PhyML 3.0 (Guidon, *et al.*, 2010), onde anteriormente, o modelo evolutivo que melhor representa as mutações do banco de dados foi selecionado no jModelTest 2 (Darriba, *et al.*, 2012), tendo o suporte dos ramos apoiados por 1000 pseudoréplicas de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985). Por fim, uma árvore de Inferência Bayesiana (IB) foi construída no programa Mr Bayes 3.2 (Ronquist, *et al.*, 2012), onde estas serão baseadas nas amostragens das Cadeias Markovianas de Monte Carlos (MCMC) as quais foram realizadas em quatro corridas simultâneas, cada uma constituída de quatro cadeias (uma fria e três aquecidas), num total de dez milhões de gerações. As probabilidades bayesianas foram selecionadas baseadas em 95% de consenso, com árvores iniciais selecionadas a cada 100 gerações. 10% destas foram descartadas de cada corrida como *burn-in*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

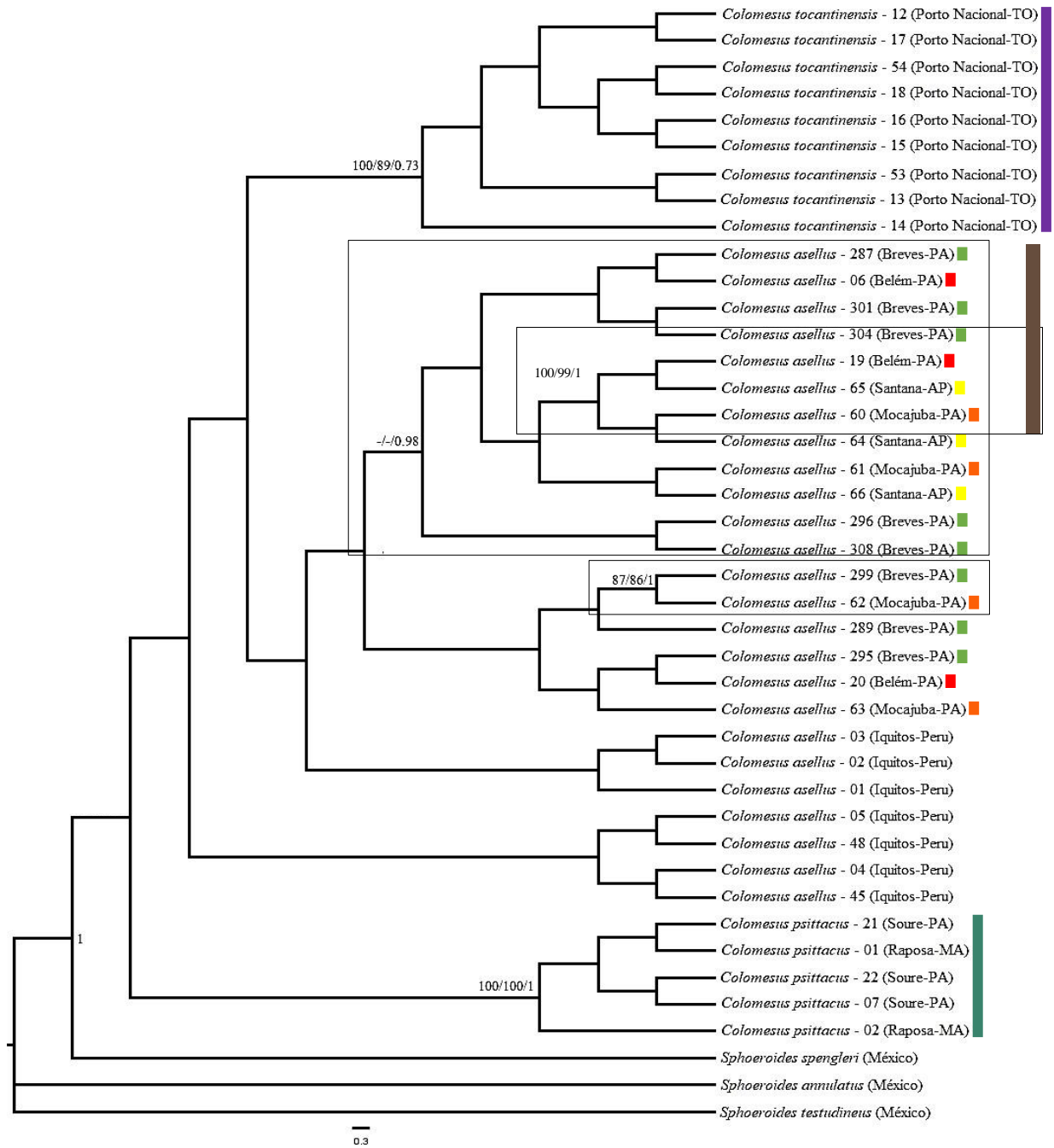
As topologias das três análises filogenéticas utilizadas no presente estudo foram congruentes em recuperar resultados extremamente similares. Desta forma, a topologia de Inferência Bayesiana será demonstrada juntamente com os valores de suporte de agrupamento de vizinhos (NJ) e Máxima Verossimilhança (ML). O modelo evolutivo estimado para as análises de ML e IB foram TPM2uf+G e HKY+I, respectivamente. Com relação a filogenia do gênero *Colomesus*, algumas inferências foram possíveis. O gênero é monofilético em relação aos grupos externos utilizados nas reconstruções, onde a espécie mais derivada foi *C. psittacus* em relação as outras duas espécies com altos valores de suporte (100, 100 e 1 para NJ, ML e IB respectivamente) (Figura 9).

Tomando-se como referência, valores de suporte a partir de 85% (0.85), três cladogramas foram formados dentro de *C. asellus*. No presente estudo, novas sequências de *C. asellus* de localidades não amostradas anteriormente (Santana-AP, Breves-PA e Mocajuba-PA) foram incluídas, demonstrando que a espécie é formada atualmente por três linhagens distintas: A linhagem do Peru (Iquitos) com valores de suporte de 100, 99 e 1 (NJ, ML e IB respectivamente), uma segunda linhagem, contendo indivíduos de Santana-AP, Belém-PA, Breves-PA e Mocajuba-PA (86, 86, 0.98) e por fim, outro clado com dois indivíduos, um de Breves e outro de Mocajuba. Este último clado mostrou-se geneticamente distinto do segundo clado, onde em todas as reconstruções filogenéticas do presente estudo, foram recuperados

juntos e com valor de suporte significativo (87, 86, 1) (Figura 9). Também foi possível observar uma politomia entre espécies de Iquitos e do Brasil, provavelmente fruto da baixa amostragem. Um fato a ser levado em consideração, é que o espécime tipo de *C. asellus* é proveniente do Rio Barama, na Guiana, um tributário do rio Waiani muito distante das localidades de onde são as sequências do nosso estudo, bem como as sequências provenientes do rio Tocantins utilizadas por Amaral, *et al.* (2013).

Segundo Avise (2000), no que diz respeito a níveis e padrões de divergência filogeográfica, existe diferença notável entre peixes de água doce e marinhos. A maioria dos peixes de água doce apresenta maior complexidade filogeográfica, em padrões geralmente relacionados com isolações e surgimentos históricos de bacias. Existem várias hipóteses sobre a origem de linhagens de peixes amazônicos e cada uma possui processos evolutivos diferentes. Durante a formação de rios na Amazônia, que levaram cerca de milhões de anos, o fim do Mioceno (11.8- 10.0 Ma) foi conhecido como um período caracterizado por extensas incursões marinhas provenientes do mar do Caribe (Lundberg *et al.* 1998). Há cerca de ~24 milhões de anos atrás bacias andinas sofreram inundações e houve a formação de uma vasta área alagada chamada de sistema de lagos Pebas, onde ao norte era ligado a águas marinhas através da passagem de Llanos (figura 10) (Wesselingh & Hoorn, 2001). De acordo com Lovejoy *et al.* (2006), o mar do Caribe é considerado a fonte mais provável das incursões marinhas durante o Mioceno.

Figura 9: Árvore filogenética com espécies do gênero *Spherooides* e *Colomesus*. Valores de suporte dos clados em NJ, ML e IB, respectivamente. As cores estão de acordo com as marcações do mapa (figura 8)



Fonte: Lovejoy, *et al.* (2006)

Figura 10: Paleogeografia do noroeste da América do Sul durante o período do Mioceno.



Fonte: Wesselingh & Hoorn (2001).

Bloom & Lovejoy (2001) afirmam que, com duração e tempo variantes, todos os continentes experimentaram incursões marinhas, e a América do Sul, especificamente a região Amazônica, possui baixa elevação, o que pode facilitar inundações provenientes de águas marinhas, ocasionadas por elevação do nível dos mares ou subsidência tectônica. O sistema Pebas sofreu influência de incursões marinhas durante o Mioceno e influxo de água doce vinda dos Andes escudos da Guiana e Brasil, isso possibilitou conexões entre lagos, pântanos e estuários com diferentes níveis de salinidade (BLOOM; LOVEJOY, 2001).

A partir de inferências filogenéticas baseadas em tempo de calibração, Bloom & Lovejoy (2017), presumem que a espécie de água doce *C. asellus* pode ser um produto de incursões marinhas durante o Mioceno. Acredita-se que a transição ocorreu primeiro a partir da divisão entre o gênero *Spherooides* e *Colomesus* onde *C. psittacus* ocorre apenas em águas salgadas e regiões estuarinas, que apesar de apresentar fortes similaridades morfológicas com *C. asellus*, divergiram a aproximadamente 10 Ma, de acordo com estudos realizados por Yamonou *et al.*, (2011) em que foram utilizados marcadores nucleares e mitocondriais. Isso também é reflexo da atual posição filogenética das três espécies válidas do gênero. Em todas as reconstruções obtidas no presente estudo, *C. asellus* sempre foi recuperada como linhagem irmã da recém descrita *Colomesus tocantinenses*, sendo mais recentes do que a espécie marinha/estuarina *C. psittacus*.

Tyler (1964), em seu estudo, manteve espécies de *C. asellus* em um ambiente com água doce e outro com água salgada e apesar dos espécimes em ambas situações terem sobrevivido apenas três ou quatro meses, aparentemente não foram afetados pela água salgada, portanto, em circunstâncias naturais pode preferir água doce mas possui a capacidade de suportar longas exposições a água salobra. Essa deve ser uma das explicações de como populações conseguiram se estabelecer durante o Mioceno onde havia corpos de água com diferentes níveis de salinidade.

Não é a primeira vez que diversidade genética é encontrada dentro de gêneros de peixes neotropicais com distribuição em mais de uma bacia. Boni *et al.* (2011) conduziu análises em espécies do gênero *Zungaro*, que revelaram especiação entre populações de duas bacias hidrográficas distintas devido ao isolamento geográfico entre a bacia Paraná-Paraguai e Bacia Amazônica.

Pereira *et al.* (2011), realizaram análises em amostras de *Piabina argentea* provenientes da bacia do alto Paraná e de São Francisco, para testar a hipótese de que esta espécie, com alta distribuição e dispersão limitada, poderia representar mais de uma unidade biológica. Os resultados demonstraram a ausência de fluxo gênico entre as amostras, o que permitiu sugerir que *P. argentea* pode representar ao menos seis unidades biológicas diferentes.

Ochoa *et al.*, (2015), utilizando marcadores moleculares, foi capaz de identificar dois grupos distintos dentro da espécie *Brachyplatystoma platynemum*, com o nome popular de peixe-gato, provenientes de regiões geográficas diferentes, um para o rio Amazonas e Purus, e outro do rio Madeira. Provavelmente resultante de barreiras causadas por química da água e oscilações climáticas no passado.

A provável diversificação do gênero *Colomesus* está associada as incursões marinhas durante o Mioceno (Monsch, 1998; Lovejoy *et al.*, 2006; Bloom & Lovejoy, 2017), mas talvez não tenha sido o único evento que causou a especiação do gênero. Durante o Pleistoceno médio e tardio, a Amazônia central e oriental vivenciou ciclos glaciais que ocasionaram rearranjo do curso de rios, seus tributários mais próximos e alterações em limites de bacias hidrográficas, que pode ter resultado na isolação de populações de peixes ou no aumento de sua distribuição (Wesselingh & Hoorn, 2011). Essa hipótese é sustentada por Oberdorff *et al.*, (2019), onde acredita que este período caracterizado por mudanças climáticas pode ser o responsável pelo presente padrão de distribuição de peixes na bacia Amazônica, em que a região ocidental da Amazônia possui mais diversidade do que a oriental. Outros trabalhos trazem suporte para esta

teoria (Leprieur *et al.*, 2011; Amaral *et al.*, 2013; Santini *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2014; Leroy *et al.*, 2018). Estas mudanças climáticas podem ter interrompido o fluxo gênico entre populações, incluindo as do gênero *Colomesus*.

Os dados obtidos a partir desta população de *Colomesus*, devido a pequena quantidade de amostras coletadas, bem como marcadores genéticos utilizados, requerem precauções ao serem interpretados, no entanto, são capazes de evidenciar a possível existência de uma nova linhagem dentro do gênero. Deste modo, antes que afirmações possam ser feitas em relação a provável nova linhagem e sua biogeografia, sugerimos a coleta de novos espécimes e realização de novas análises específicas, com novas amostras de Breves (presente estudo) e regiões do entorno.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados do presente estudo demonstraram a eficácia do DNA Barcode, na identificação e apresentando evidências da diversidade genética presente, indicadora de que o status da espécie *Colomesus asellus* em Breves e região deve ser revisado. Considerando o rio Parauaú, assim como outros rios da Amazônia, como portador de valor histórico e comercial para a população local, os achados aqui representam um avanço importante para o conhecimento científico acerca deste gênero, sobre a ictiofauna de Breves e pode servir como base para outras pesquisas de caráter semelhante.

REFERÊNCIAS

ALBERT, J. S. & REIS, R. (Ed.). **Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes**. University of California Press, 2011.

ALBERT, J. S.; REIS, R. E. Introduction to Neotropical freshwaters. **Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes**, v. 1, p. 3-20, 2011.

ALBERT, J. S.; PETRY, P.; REIS, R. E. Major biogeographic and phylogenetic patterns. **Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes**, v. 1, 2011.

ANTONELLI, A., ARIZA, M., ALBERT, J., ANDERMANN, T., AZEVEDO, J., BACON, C., FAURBY, S., GUEDES, T., HOORN, C., LOHMANN, L. G., MATOS-MARAVÍ, P., RITTER, C. D., SANMARTÍN, I., SILVESTRO, D., TEJEDOR, M., TER STEEGE, H., TUOMISTO, H., WERNECK, F. P., ZIZKA, A., EDWARDS, S. V. Conceptual and empirical advances in Neotropical biodiversity research. **PeerJ**, 6: 5644. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.7717/peerj.5644>>. Acesso em: 06 mar. 2020.

ANTONELLI, A., ZIZKA, A., CARVALHO, F. A., SCHARN, R., BACON, C. D., SILVESTRO, D., & CONDAMINE, F. L. Amazonia is the primary source of Neotropical biodiversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 115(23), 6034– 6039. 2018. DOI:10.1073/pnas.1713819115

ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M., SAVASTANO, D., & CARDELIQUIO JORDAO, L. Drift of *Colomesus asellus* (Teleostei: Tetraodontidae) larvae in the Amazon river. **Revue d'hydrobiologie tropicale**, 27(1), 33-38. 1994.

AVISE, John C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard university press, 2000.

BLOOM, D. D., & LOVEJOY, N. R. On the origins of marine-derived freshwater fishes in South America. **Journal of Biogeography**, 44(9), 1927-1938. 2017.

BLOOM, DEVIN D.; LOVEJOY, NATHAN R. The biogeography of marine incursions in South America. **Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes**, p. 137-144, 2011.

BONI, T. A., PADIAL, A. A., PRIOLI, S. M. A. P., LUCIO, L. C., MANIGLIA, T. C., BIGNOTTO, T. S., PRIOLI, A. J. Molecular differentiation of species of the genus *Zungaro* (Siluriformes, Pimelodidae) from the Amazon and Paraná-Paraguay River basins in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, 10(4), 2795-2805. 2011.

BLOCH, M.E., SCHNEIDER, J.G. **Systema Ichthyologiae iconibus cx illustratum. Post obitum auctoris opus inchoatum absolvit, correxit, interpolavit Jo. Gottlob Schneider, Saxo.** Berolini. Sumtibus Auctoris Impressum et Bibliopolio Sanderiano Commissum. M. E. Blochii, Systema Ichthyologiae.: i-lx +1–584, Pls. 1–110. 1801.

CARVALHO, M. L., COSTA SILVA, G. J. D., MELO, S., ASHIKAGA, F. Y., SHIMABUKURO-DIAS, C. K., SCACCHETTI, P. C. & OLIVEIRA, C. The non-monotypic status of the neotropical fish genus *Hemiodontichthys* (Siluriformes, Loricariidae) evidenced by genetic approaches. **Mitochondrial Dna**, Part A, 29(8), 1224-1230. 2018.

CARVALHO, D. C., OLIVEIRA, D. A., POMPEU, P. S., LEAL, C. G., OLIVEIRA, C., & HANNER, R. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: The case of the São Francisco River basin. **Mitochondrial DNA**. 22 Suppl 1. 80-86. DOI: 10.3109/19401736.2011.588214. 2011.

CERUTTI-PEREYRA, F., MEEKAN, M. G., WEI, N. W. V., O'SHEA, O., BRADSHAW, C. J., & AUSTIN, C. M. Identification of rays through DNA barcoding: an application for ecologists. **PloS one**, 7(6). 2012.

COOKE, G. M., CHAO, N. L., & BEHEREGARAY, L. B. Natural selection in the water: freshwater invasion and adaptation by water colour in the Amazonian pufferfish. **Journal of evolutionary biology**, 25(7), 1305-1320. 2012.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.

DARWIN, C. **On the origin of species**. 1859. Routledge. 2004.

DIAS, M. S., OBERDORFF, T., HUGUENY, B., LEPRIEUR, F., JÉZÉQUEL, C., CORNU, J. F., & TEDESCO, P. A. Global imprint of historical connectivity on freshwater fish biodiversity. **Ecology Letters**, 17(9), 1130-1140. 2014.

FELSENSTEIN, J. Phylogenies and the Comparative Method. **The American Naturalist.**, 125, 1-15. 1985.

FIELD, J. Puffer fish poisoning. **Journal of accident & emergency medicine**, 15(5), 334–336. 1998. DOI:10.1136/emj.15.5.334

GILL, T. Synopsis of the plectognath fishes. **Proceedings of the United States National Museum**. 1884.

GUIDON, S.; DUFAYARD, J. F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDJIK, W.; GASCUEL, O. "New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0". **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p. 307, 2010.

GUIMARÃES, K. L. A., DE SOUSA, M. P. A., RIBEIRO, F. R. V., PORTO, J. I. R., & RODRIGUES, L. R. R. DNA barcoding of fish fauna from low order streams of Tapajós River basin. **PloS one**, 13(12). (2018). Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209430>>. Acesso em: 14 abr. 2020.

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.

HASSAN A. I. R. & NABIH A. B. Biological Identifications Through DNA Barcodes. In: Gbolagade Akeem Lameed. **Biodiversity Conservation and Utilization in a Diverse World**. IntechOpen, 2012. DOI: 10.5772/49967.

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

HELFMAN, G., COLLETTE, B. B., FACEY, D. E., & BOWEN, B. W. **The Diversity of Fishes: Biology, Evolution, and Ecology**. Wiley, 2009. 738 p.

KIMURA, M. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. **Journal of Molecular Evolution**, 16, 111-120. 1980.

KRESS, W. J., & ERICKSON, D. L. DNA Barcodes: Methods and Protocols. **Methods in Molecular Biology**TM, 3–8. 2012. DOI:10.1007/978-1-61779-591-6_1

LEPRIEUR, F., TEDESCO, P. A., HUGUENY, B., BEAUCHARD, O., DÜRR, H. H., BROSSE, S., & OBERDORFF, T. Partitioning global patterns of freshwater fish beta diversity reveals contrasting signatures of past climate changes. **Ecology letters**, 14(4), 325-334. 2011.

LEROY, B., DIAS, M. S., GIRAUD, E., HUGUENY, B., JÉZÉQUEL, C., LEPRIEUR, F. & TEDESCO, P. A. Global biogeographical regions of freshwater fish species. **Journal of Biogeography**, 46(11), 2407-2419. 2019.

LOVEJOY, N. R.; ALBERT, J. S.; CRAMPTON, W. G. R. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from Neotropical fishes. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 21, n. 1-2, p. 5-13, 2006.

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 American rivers. **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**, 27, 13-48. 1998.

MATSUURA, K. Taxonomy and systematics of tetraodontiform fishes: a review focusing primarily on progress in the period from 1980 to 2014. **Ichthyological Research**, 62(1), 72–113. (2014). DOI:10.1007/s10228-014-0444-5

MELO, B. F., OCHOA, L. E., VARI, R. P., & OLIVEIRA, C. Cryptic species in the Neotropical fish genus *Curimatopsis* (Teleostei, Characiformes). **Zoologica Scripta**. 2016. DOI: 10.1111/zsc.12178.

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 Neotropica**, 9(3), 241-253. 2009.

MONSCH, K. A. Miocene fish faunas from the northwestern Amazonia basin (Colombia, Peru, Brazil) with evidence of marine incursions. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, 143(1-3), 31–50. 1998. DOI:10.1016/s0031-0182(98)00064-9

MORRONE, JUAN J. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. **Zootaxa**, v. 3782, n. 1, p. 1-110. 2014.

MÜLLER, J., TROSCHER, F.H. Fische. In: **Reisen in Britisch-Guiana in den Jahren, 1840–1844**. Im Auftrag Sr. Majestät des Königs von Preussen ausgeführt von Richard Schomburgk. [Versuch einer Fauna und Flora von Britisch-Guiana.] v.3. Berlin. 1849.

NASCIMENTO, M. H. S., ALMEIDA, M. S., VEIRA, M. N. S., LIMEIRA FILHO, D., LIMA, R. C., BARROS, M. C., & FRAGA, E. C. DNA barcoding reveals high levels of genetic diversity in the fishes of the Itapecuru Basin in Maranhão, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, p. 1-11, 2016. 15. DOI:10.4238/gmr.15038476.

NELSON, J. S.; GRANDE, T.; WILSON, M. **Fishes of the World**, Fifth Edition. 2016. DOI: 10.1002/9781119174844.

OBERDORFF, T., DIAS, M. S., JÉZÉQUEL, C., ALBERT, J. S., ARANTES, C. C., BIGORNE, R. & HUGUENY, B. Unexpected fish diversity gradients in the Amazon basin. **Science advances**, 5(9), 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/sciadv.aav8681>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

OCHOA, L. E.; PEREIRA, L. H. G.; COSTA-SILVA, G. J.; ROXO, F. F.; BATISTA, J. S.; FORMIGA, K.; OLIVEIRA, C. Genetic structure and historical diversification of catfish *Brachyplatystoma platynemum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Amazon basin with implications for its conservation. **Ecology and evolution**5(10):2005-20. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ece3.1486>>. Acesso em: 03 out. 2019

OLIVEIRA, J. S.; FERNANDES, S. C. R.; SCHWARTZ, C. A.; BLOCH JUNIOR, C.; MELO, J. A. T.; PIRES JUNIOR, O. R.; FREITAS, J. C. de. Toxicity and toxin identification in *Colomesus asellus*, an Amazonian (Brazil) freshwater puffer fish. **Toxicon**, 48: 55-63. 2006.

PEREIRA, L. H., 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.

PEREIRA, L. H., HANNER, R., FORESTI, F., & OLIVEIRA, C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics**, 14: 20– 34. 2013.

PIAH, R.M. **Aspects of the ecology of small estuarine pufferfish relevant to their value as biomonitors of pollution**. Tese de Phd. Nova Gales do Sul. Southern Cross University. 2011. 235 p.

PUGEDO, M. L., DE ANDRADE NETO, F. R., PESSALI, T. C., BIRINDELLI, J. L. O., & CARVALHO, D. C. Integrative taxonomy supports new candidate fish species in a poorly studied neotropical region: the Jequitinhonha River Basin. **Genetica**, 144(3), 341–349. 2016. DOI:10.1007/s10709-016-9903-4

RAMIREZ, J. L., BIRINDELLI, J. L., CARVALHO, D. C., AFFONSO, P. R. A. M., VENERE, P. C., ORTEGA, H., GALETTI, P. M. Revealing Hidden Diversity of the Underestimated Neotropical Ichthyofauna: DNA Barcoding in the Recently Described Genus *Megaleporinus* (Characiformes: Anostomidae). **Frontiers in Genetics**, v.8. 2017. DOI: 10.3389/fgene.2017.00149

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; van der MARK, P.; AYRES, D.; DARLING, A.; HOHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 22, p. 539-542, 2012.

SAITOU, N. & NEI, M. The Neighbor-joining Method: A new Method for reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4, 406-425. 1987.

- SANTINI, F. & TYLER, J. A phylogeny of the families of fossil and extant tetraodontiform fishes (Acanthomorpha, Tetraodontiformes), Upper Cretaceous to Recent. **Zoological Journal of the Linnean Society**. 139. 565 - 617. 2003. DOI: 10.1111/j.1096-3642.2003.00088.x.
- SANTINI, F., NGUYEN, M. T. T., SORENSON, L., WALTZEK, T. B., LYNCH ALFARO, J. W., EASTMAN, J. M., & ALFARO, M. E. Do habitat shifts drive diversification in teleost fishes? An example from the pufferfishes (Tetraodontidae). **Journal of evolutionary biology**, 26(5), 1003-1018. 2013.
- SCLATER, P. L. On the general Geographical Distribution of the Members of the Class Aves. (Continued.). *Journal of the Proceedings of the Linnean Society of London*. **Zoology**, 2(8), 137-145. 1858.
- SHIMABUKURO-DIAS, C. K., COSTA SILVA, G. J. D., ASHIKAGA, F. Y., FORESTI, F., & OLIVEIRA, C. Molecular identification of the fish fauna from the pantanal flood plain area in Brazil. **Mitochondrial DNA Part A**, 28(4), 588–592. 2016. DOI: 10.3109/24701394.2016.1149826
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, 30, 2725–2729. 2013.
- TEDESCO, P. A., OBERDORFF, T., LASSO, C. A., ZAPATA, M., & HUGUENY, B. Evidence of history in explaining diversity patterns in tropical riverine fish. **Journal of Biogeography**, 32(11), 1899-1907. 2005.
- 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 research**, 25 (24), 4876-4882. 1997.
- TREBACH, R. H., CERQUEIRA, N. M., MEDEIROS, S. R., GUTIERREZ, H. J. P., HERNÁNDEZ, N. O., & RODRIGUES, M. D. N. DNA Barcoding: Uma Ferramenta de Apoio Molecular para Identificação de Espécies de Peixes. **Scientia Agraria Paranaensis**. 14. 77-81. 2015. DOI: 10.18188/1983-1471/sap.v14n2p77-81.
- TURAN, C., GÜRLEK, M., ERGÜDEN, D., UYAN, A., KARAN, S., & DOĞDU, S. A. Assessing DNA Barcodes for Identification of Pufferfish Species (Tetraodontidae) in Turkish Marine Waters. **Natural and Engineering Sciences**. 2. 55-66. 2017. DOI: 10.28978/nesciences.369538.
- TYLER, J. C. A diagnosis of the two species of South American puffer fishes (Tetraodontidae, Plectognathi) of the genus *Colomesus*. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, 119-148. 1964.

- VARI, R.P. & MALABARBA, L. R. Neotropical Ichthyology: An Overview. *In*: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S. & LUCENA, C. A. S. eds. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, Edipucrs. p.1-11, 1998
- VIANA, P. F., EZAZ, T., MARAJÓ, L., FERREIRA, M., ZUANON, J., CIOFFI, M. B. & FELDBERG, E. Genomic Organization of Repetitive DNAs and Differentiation of an XX/XY Sex Chromosome System in the Amazonian Puffer Fish, *Colomesus asellus* (Tetraodontiformes). **Cytogenetic and genome research**, 153(2), 96-104. 2017.
- WALLACE, A. R. **The geographical distribution of animals; with a study of the relations of living and extinct faunas as elucidating the past changes of the Earth's surface**. New York: Harper & Brothers, 1876.
- WESSELINGH, F. P., & HOORN, C. Geological development of Amazon and Orinoco basins. **Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes**, p. 60-68, 2011.
- WING, S. L., HERRERA, F., JARAMILLO, C. A., GÓMEZ-NAVARRO, C., WILF, P., & LABANDEIRA, C. C. Late Paleocene fossils from the Cerrejón Formation, Colombia, are the earliest record of Neotropical rainforest. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106(44), 18627-18632. 2009.
- YAMANOUE, Y., MIYA, M., DOI, H., MABUCHI, K., SAKAI, H., & NISHIDA, M. Multiple Invasions into Freshwater by Pufferfishes (Teleostei: Tetraodontidae): A Mitogenomic Perspective. **PLoS ONE**, 6(2): 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017410>>. Acesso em: 14 nov. 2019.
- YAMANOUE, Y., MIYA, M., MATSUURA, K., KATOH, M., SAKAI, H., & NISHIDA, M. A new perspective on phylogeny and evolution of tetraodontiform fishes (Pisces: Acanthopterygii) based on whole mitochondrial genome sequences: Basal ecological diversification?. **BMC Evol Biol** 8, 212. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-212>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

ANEXO A – CÓDIGOS DAS ESPÉCIES, ORIGENS E REFERÊNCIAS

Código	Espécie	Origem	Referência
C.psi07	<i>C. psittacus</i>	Soure-PA	KC959923
C.psi22	<i>C. psittacus</i>	Soure-PA	KC959924
C.psi21	<i>C. psittacus</i>	Soure-PA	KC959925
C.psi01	<i>C. psittacus</i>	Raposa-MA	KT832971
C.psi02	<i>C. psittacus</i>	Raposa-MA	KT832972
C.toc53	<i>C. tocantinensis</i>	Porto Nacional-TO	KC959905
C.toc12	<i>C. tocantinensis</i>	Porto Nacional-TO	KC959906
C.toc54	<i>C. tocantinensis</i>	Porto Nacional-TO	KC959912
C.toc18	<i>C. tocantinensis</i>	Porto Nacional-TO	KC959917
C.toc17	<i>C. tocantinensis</i>	Porto Nacional-TO	KC959918
C.toc16	<i>C. tocantinensis</i>	Porto Nacional-TO	KC959919
C.toc15	<i>C. tocantinensis</i>	Porto Nacional-TO	KC959920
C.toc14	<i>C. tocantinensis</i>	Porto Nacional-TO	KC959921
C.toc13	<i>C. tocantinensis</i>	Porto Nacional-TO	KC959922
C.asel05	<i>C. asellus</i>	Iquitos-Peru	KC959908
C.asel09	<i>C. asellus</i>	Iquitos-Peru	KC959909
C.asel48	<i>C. asellus</i>	Iquitos-Peru	KC959913
C.asel45	<i>C. asellus</i>	Iquitos-Peru	KC959914
C.asel01	<i>C. asellus</i>	Iquitos-Peru	KC959904
C.asel02	<i>C. asellus</i>	Iquitos-Peru	KC959910
C.asel03	<i>C. asellus</i>	Iquitos-Peru	KC959911
C.asel04	<i>C. asellus</i>	Iquitos-Peru	KC959912
C.asel19	<i>C. asellus</i>	Iquitos-Peru	KC959916
C.asel06	<i>C. asellus</i>	Belem-PA	KC959907
C.asel20	<i>C. asellus</i>	Belem-PA	KC959915
C.asel19	<i>C. asellus</i>	Belem-PA	KC959916
Casel287	<i>C. asellus</i>	Breves-PA	Presente estudo
Casel289	<i>C. asellus</i>	Breves-PA	Presente estudo
Casel295	<i>C. asellus</i>	Breves-PA	Presente estudo
Casel296	<i>C. asellus</i>	Breves-PA	Presente estudo
Casel299	<i>C. asellus</i>	Breves-PA	Presente estudo
Casel301	<i>C. asellus</i>	Breves-PA	Presente estudo
Casel304	<i>C. asellus</i>	Breves-PA	Presente estudo
Casel308	<i>C. asellus</i>	Breves-PA	Presente estudo
Casel60	<i>C. asellus</i>	Mocajuba-PA	KT832905
Casel61	<i>C. asellus</i>	Mocajuba-PA	KT832906
Casel62	<i>C. asellus</i>	Mocajuba-PA	KT832907
Casel63	<i>C. asellus</i>	Mocajuba-PA	KT832908
Casel64	<i>C. asellus</i>	Santana-AP	KT832929
Casel65	<i>C. asellus</i>	Santana-AP	KT832930
Casel66	<i>C. asellus</i>	Santana-AP	KT832931
Stest	<i>Sphoeroides testudineus</i>	Mexico	HQ575752
Sann	<i>Sphoeroides annulatus</i>	Mexico	HQ575753
Spe	<i>Sphoeroides spengleri</i>	Mexico	JN313813