



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO "MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL"

MARIA HISTELLE SOUSA DO NASCIMENTO

**CÓDIGO DE BARRAS DE DNA (DNA *barcoding*) DA ICTIOFAUNA DA BACIA DO
RIO ITAPECURU, MARANHÃO.**

São Luís
2015

MARIA HISTELLE SOUSA DO NASCIMENTO

**CÓDIGO DE BARRAS DE DNA (DNA *barcoding*) DA ICTIOFAUNA DA BACIA DO
RIO ITAPECURU, MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Estadual do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Conservação e reprodução Animal.

Orientador: Dr. Elmary da Costa Fraga
Co-Orientador: Maria Claudene Barros

São Luís
2015

MARIA HISTELLE SOUSA DO NASCIMENTO

**CÓDIGO DE BARRAS DE DNA (*DNA barcoding*) DA ICTIOFAUNA DA BACIA DO
RIO ITAPECURU, MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Estadual do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Conservação e Reprodução animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga (Orientador)
Doutorado em Genética e Biologia Molecular
Universidade Estadual do Maranhão

Prof. Dr. Luís Fernando Carvalho Costa (Membro)
Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Andréa Martins Cantanhede (Membro)
Doutorado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva
Universidade Federal do Maranhão/Campus de Chapadinha

Profa. Dra. Maria Claudene Barros (Suplente)
Doutorado em Ciências Biológicas
Universidade Estadual do Maranhão

À minha grande família, que acreditou nos meus sonhos e nas oportunidades... papai e mamãe (Sr. Francisco e Sra. Nazaré), aos meus irmãos, minhas irmãs, sobrinhos (as), cunhados (as) e aos meus saudosos avós: Joaquim e Benedita, José e Maria Gonçalves (*in memoriam*)... MUITO OBRIGADA!

AGRADECIMENTO

À DEUS por me permitir vivenciar esse momento;

À Universidade Estadual do Maranhão pela formação acadêmica;

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão, Banco do Nordeste e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior pelos financiamentos incentivando a pesquisa científica no Estado do Maranhão.

Ao Prof. Elmary Fraga por mais uma demonstração de confiança e pela orientação durante todo desenvolvimento do trabalho. Deixo aqui registrado meu respeito, minha imensa admiração, o meu OBRIGADA!

À Prof^a. Claudene Barros pelo incentivo aos estudos e apoio e co-orientação;

À todos os professores do curso de mestrado Ciência Animal pelos ensinamentos durante o curso.

Ao Dr. Claudio Oliveira e Dra. Cristiane por me receber durante o estágio junto com sua equipe de trabalho e todos do laboratório de Biologia de Peixes da UNESP;

Aos colegas da turma 2013 em especial Andreлина Alves, Debroah Gaído, Dayane Nascimento e Eliane Braga por todos os momentos compartilhados dos difíceis (aperreios constantes) aos alegres, desejo a todos um futuro científico brilhante.

À todos do laboratório de Genética e Biologia Molecular, pela parceria, ensinamentos, momentos de alegria (principalmente as sextas-feiras, mas conhecida como dia do lanche rsrs) e tensos: Andreлина, Deborah, Daiane, Esmeralda, Luana e Luciana (as DOUTORAS rsrs), Walna, Priscila, Marcia, Paulo Bryguel, Paulo Sérgio, Marcelo Ventura, Marcelo Almeida, Daniel, Mauriane, Renato, Aryel, Sulamita, Bruno e “Driana”.

Aos amigos do pensionato: D. Maria, Gracilane e D. Julia.

À minha GRAAAANDE família pelo amor, cuidado, atenção, compreensão, financiamento, por tudo e mais um pouco em especial D. Nazaré (mamãe) e Sr. Francisco (papai), OBRIGADA!

“Costumávamos pensar que o nosso futuro estava nas estrelas. Agora sabemos que está nos nossos genes”.
(James Watson)

RESUMO

A identificação em nível de espécie de materiais biológicos é fundamental para diversas áreas das ciências naturais. Assim, o uso da técnica DNA *barcoding* na distinção de táxons constitui uma ferramenta bastante empregada atualmente como apoio a taxonomia tradicional, especialmente na detecção de espécies crípticas. Considerando a utilização do DNA *barcoding* como um sistema global de identificação e descoberta de espécies, o presente estudo objetivou gerar uma biblioteca referência de sequências *barcoding* para os peixes da bacia do Rio Itapecuru, Maranhão. A amostragem foi constituída de espécimes coletados no alto, médio e baixo curso da bacia do rio Itapecuru. Nas análises genéticas, o DNA total foi isolado utilizando-se o protocolo de fenol-clorofórmio e os fragmentos do gene mitocondrial COI amplificados através da técnica de PCR com posterior sequenciamento. As 440 sequências geradas neste estudo corresponderam a 64 espécies, 59 gêneros, 31 famílias e 10 ordens. Das espécies analisadas, 92,19% puderam ser identificadas pela abordagem do DNA *barcoding*, com baixo índice de média divergência genética intraespecífica de 0,80% e agrupamentos coesos para os valores de *bootstrap*. No entanto as espécies *Anableps anableps*, *Gymnotus carapo*, *Sciades couma*, *Pseudaucheipterus nodosus* e *Leporinus piau* apresentaram uma divergência genética média maior que 3% e formaram subclados, com evidência de diferenciação sugerindo uma análise mais apurada para determinar se ocorreu erro de identificação de amostras relativamente semelhantes ou até mesmo existência de diversidade críptica. A utilização do fragmento do gene COI como DNA *barcoding* permitiu o estudo de um grande número de exemplares, bem como possibilitou identificar e discriminar espécies proximalmente relacionadas.

Palavras-chaves: Peixes, Código de barras, Citocromo oxidase I, COI.

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa da Bacia do rio Itapecuru, Maranhão modificado de Barros et al. (2011) por Limeira Filho. Ponto roxo: Itapecuru-Mirim; cinza: Rosário; laranja: Aldeias Altas; verde: Caxias; branca: APA do Inhamum; azul: Governador Eugênio Barros; amarelo: Colinas; vermelho: Mirador. 17
- Figura 2.** Pagina principal do projeto “DNA Barcode of fishes from Itapecuru River Basin” evidenciando as amostras depositas na plataforma BOLSystems. 19
- Figura 3.** Dendrograma colapsado de Neighbor-Joining com 1000 réplicas de *bootstrap* das sequências do gene COI para 21 espécies de Characiformes coletadas na Bacia do Rio Itapecuru, MA. Os números entre parênteses representam a quantidade de espécimes utilizadas por espécie. 26
- Figura 4.** Dendrograma colapsado de Neighbor-Joining com 1000 réplicas de *bootstrap* das sequências do gene para 21 espécies de Siluriformes coletadas na Bacia do Rio Itapecuru, MA. Os números entre parênteses representam a quantidade de espécimes utilizadas por espécie. 27
- Figura 5.** Dendrograma colapsado de Neighbor-Joining com 1000 réplicas de *bootstrap* das sequências do gene COI para 09 espécies de Perciformes coletadas na Bacia do Rio Itapecuru, MA. Os números entre parênteses representam a quantidade de espécimes utilizadas por espécie. 27
- Figura 6.** Dendrograma colapsado de Neighbor-Joining com 1000 réplicas de *bootstrap* das sequências do gene COI para 04 espécies de Gymnotiformes coletadas na Bacia do Rio Itapecuru, MA. Os números entre parênteses representam a quantidade de espécimes utilizadas por espécie. 28
- Figura 7.** Dendrograma colapsado de Neighbor-Joining com 1000 réplicas de *bootstrap* das sequências do gene COI para espécies de Mugiliformes, Synbranchyiformes, Cyprinodontiformes, Clupeiformes, Beloniformes e Pleuronectiformes coletadas na Bacia do Rio Itapecuru, MA. Os números entre parênteses representam a quantidade de espécimes utilizadas por espécie. 28
- Figura 8.** Dendrogramas de Neighbor-Joining com 1000 réplicas de *bootstrap* das sequências de COI de quatro espécies que apresentaram médias de distâncias genéticas intraespecíficas (Kimura 2 parâmetros) superiores a 3% quando comparado sequência par a par. A) Espécie *Anableps anableps*; B) Espécie *Gymnotus carapo*; C) Espécie *Pseudauchenipterus nodosus* e D) Espécie *Hexanematichthys couma*. 30
- Figura 9.** Dendrograma de Neighbor-Joining com 1000 réplicas de *bootstrap* das sequências *Leporinus piau* que mesmo apresentando média distância genética intraespecífica (Kimura 2 Parâmetro) inferior a 2% revelaram um valor alto quando comparado sequência par a par. 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sumário dos peixes coletados na Bacia do Rio Itapecuru utilizadas nesse estudo com o gene COI. 25

Tabela 2. Médias das Distâncias genéticas (Kimura 2 Parâmetros) com desvio padrão dentro de diferentes níveis taxonômicos (excluindo *singletons*) dos peixes analisados da Bacia do Rio Itapecuru, MA. 29

Tabela 3. Distâncias genéticas (Kimura 2 Parâmetros) de amostras que apresentaram medias intraespecíficas superior a 3% em diferentes táxons dos peixes da bacia do Rio Itapecuru, MA. 31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 DNA <i>barcoding</i>	12
1.2 Bacia do Rio Itapecuru	14
2 OBJETIVO GERAL	16
2.1 Objetivos específicos	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Area de coleta	17
3.2 Amostragem	17
3.3 Análise genética	20
3.4 Amplificação via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	21
3.5 Purificação das amostras amplificadas	21
3.6 Reação de Sequenciamento	22
3.7 Precipitação em EDTA/etanol	22
3.8 Sequenciamento	23
3.9 Análise dos dados	23
4 RESULTADOS	24
4.1 ESPÉCIES QUE PASSARAM POR REVISÃO	34
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXOS	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 DNA *barcoding*

A identificação em nível de espécie de materiais biológicos é fundamental para diversas áreas das ciências naturais, assim, os dados morfológicos historicamente foram os primeiros a serem utilizados na identificação de espécies, com o desenvolvimento de novos métodos de estudos, novas metodologias foram se tornando disponíveis para o estudo da biodiversidade e, no fim da década de 70 e início de 80 (AVISE, 1994) as investigações com DNA mitocondrial passaram a ser um dos principais métodos na diferenciação de espécies.

Desde o início do século XXI uma técnica chamada “códigos de barra de DNA” (DNA *barcoding*), que visa uma identificação padronizada e em grande escala de todas as formas de vida, vem ganhando muita atenção dos taxonomistas mundialmente e constituindo uma ferramenta bastante empregada como apoio a taxonomia tradicional, principalmente na detecção de espécies crípticas (MOLBO et al., 2003; HEBERT et al., 2004).

A criação do "Consortium for the Barcode of Life" (CBOL - www.barcoding.si.edu) em 2004 teve como objetivo auxiliar no desenvolvimento de um sistema capaz de identificar as espécies do planeta por meio de um pequeno fragmento de DNA. A estratégia utilizada é conhecida como “DNA *barcoding*” ou “código de barras do DNA” (HEBERT et al., 2003; BLAXTER, 2004) e pode-se afirmar que a função essencial do código de barras baseado no DNA consiste em identificar corretamente um indivíduo dentro de uma espécie, ou indicar que a amostra pertence a uma espécie ainda não descrita.

O DNA *barcoding* consiste em uma região de 648 pares de bases do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (posições 58-705 no final da porção 5') tendo como premissa o fato de que toda espécie deve apresentar um ‘código de barras’ único, onde a variação interespecífica é bem mais elevada que a intraespecífica (HEBERT et al., 2003). É uma sequência curta que pode ser obtida de um modo relativamente rápido e barato. Em animais, esse fragmento tem se mostrado eficaz na identificação de diversas espécies como aves, borboletas, peixes, moscas e muitos outros grupos (HEBERT et al., 2003; IVANOVA et al., 2007; HUBERT et al., 2008; WARD et al., 2008). Neste sentido, a estratégia dos DNA *barcoding* adquiriu proporção cada vez mais globalizada e culminou com o lançamento oficial, em setembro de 2010, do projeto iBOL (International Barcode of Life Project) que

objetiva expandir a geração de dados de códigos de barra de DNA para todos os eucariotos.

Outros segmentos gênicos também foram sugeridos para esse mesmo fim, como os genes mitocondriais rRNA 16S e Citocromo *b* (VENCES et al., 2005), porém, por questões de padronização e por apresentar um melhor desempenho, o fragmento do gene COI foi adotado como sequência padrão pelo CBOL.

No entanto, esta abordagem tem sofrido algumas críticas, como em casos de hibridação e divergência muito recente (onde as substituições acumuladas não seriam suficientes para diferenciar as espécies) (DAWNAY et al., 2007; SONG et al., 2008; WARD et al., 2009b). Outro ponto é a presença de "NUMTs" (Nuclear Mitochondrial Pseudogenes), ou seja, a integração do genoma mitocondrial no genoma nuclear por uma duplicação podendo levar a uma possível amplificação de ambas as cópias do gene devido a conservação das regiões flanqueadoras. Neste caso, ambas as cópias do gene COI poderiam ser amplificadas, ou ainda, somente a cópia nuclear.

A amplificação da região nuclear de uma interação com o genoma mitocondrial pode levar a ambiguidade de resultados e alocação errônea da sequência, de forma que a cópia nuclear está sobre outras pressões seletivas, podendo acumular mais substituições do que a cópia original e grupos então poderiam ser formados somente com cópias de pseudogenes levando a uma superestimação de número de espécies. Estas sequências são facilmente visualizadas devido à presença de indels, mutações pontuais e presença de *stop códons* (SONG et al., 2008; WARD et al., 2009b). Para Becker et al. (2011), essas críticas são pormenores, sendo muito mais preocupante a identificação errônea dos espécimes que levariam a complicações posteriores de identificação via DNA *barcoding*. Contudo, até o momento a região escolhida mostrou grande capacidade em discriminar espécies e em revelar diversidade críptica (WAUGH, 2007; FREZAL; LEBLOIS, 2008; BAKER et al., 2009; BECKER et al., 2011).

Em relação aos peixes, a abordagem do DNA *barcoding* tem si mostrado positiva, no entanto, esse grupo, ainda tem muito o que ser conhecido. No que diz respeito a ictiofauna de água doce da América do Sul considerada a mais rica de todo o planeta, compreende cerca de 6.000 espécies conhecidas com uma riqueza estimada em 8.000, sendo para muitas destas espécies difícil compreender os processos que originaram em suas diferenciações devido a reduzida variabilidade

morfológica (SCHAEFER 1998; REIS et al., 2003; TURNER et. al., 2004). Segundo Vari e Malabarba (1998) de 30-40% da fauna piscícola neotropicais ainda não foi descrito, e para Brasil, cerca de 25% das espécies de peixes de água doce estão descritas, com mais de 3.261 espécies conhecidas. (LEWINSOHN; PRADO, 2005). Esta riqueza tem atraído muito atenção da comunidade científica e muitos trabalhos voltados para identificação molecular vêm sendo realizados no Brasil (SANTOS, 2007; CARVALHO et al., 2008; ORTIZ, 2010; HENRIQUES, 2010; CARVALHO et al., 2011; RIBEIRO et al., 2012; PEREIRA et al., 2013).

1.2 Bacia do Rio Itapecuru

Conforme estudos realizados por Feitosa (1983, p.121), no Maranhão encontram-se as seguintes bacias hidrográficas: Gurupi, Itapecuru, Mearim, Munim, Parnaíba, Tocantins e Turiaçu. Sendo a bacia do Rio Itapecuru a segunda maior e genuinamente maranhense com importância histórica para o estado.

A bacia hidrográfica do rio Itapecuru situa-se na parte centro-leste do Estado do Maranhão, entre as coordenadas 2°51' a 6°56' latitude Sul e 43°02' a 43°58' Longitude Oeste, com uma área de 52.972,1 Km², que corresponde à cerca de 16% das terras do estado. Limita-se a sul e leste com a bacia do rio Parnaíba através da serra do Itapecuru, chapada do Azeitão e outras pequenas elevações, a Oeste e Sudoeste com a bacia do Mearim e a Nordeste com a bacia do rio Munim (ALCÂNTARA, 2004).

O rio que define a bacia tem sua nascente nas fronteiras dos municípios do Mirador, Grajaú e São Raimundo das Mangabeiras na encosta setentrional da Serra da Croeira, desaguando 1.450 Km depois no Oceano Atlântico, na Baía de São José, a leste da Ilha de São Luís (FEITOSA, 1983).

Bezerra (1984) o caracteriza como alto, médio e baixo Itapecuru. Alto Itapecuru, compreende o trecho entre a nascente, na serra de Croeiras até a cidade de Colinas, numa extensão de aproximadamente 250 km. Médio Itapecuru, inicia-se no município de Colinas e vai até o município de Caxias, num percurso de aproximadamente 230 km. O baixo curso estende-se de Caxias até a foz do Itapecuru, na Baía do Arraial, corresponde ao baixo curso que tem aproximadamente 360 km.

No rio Itapecuru, como na grande maioria dos rios sul-americanos poucos estudos sobre a fauna de peixes (LOWE-MCCONNELL, 1999), principalmente quanto à sua biodiversidade. No rio Itapecuru, um inventário da ictiofauna do trecho

inferior realizado por Piorski et al. (1998) foram identificados 42 espécies de peixes pertencentes a 13 famílias e 36 gêneros. Em outro levantamento nos três trechos da bacia, Barros et al. (2011) coletaram 1.563 espécimes, representando 69 espécies, 65 gêneros, 29 famílias e 10 ordens. Characiformes, com 24 espécies e Siluriformes com 25, foram as ordens mais ricas em número de espécies. Characidae, com 13 espécies, Loricariidae com sete, Cichlidae, Pimelodidae, e Auchenipteridae, todas representadas com cinco espécies, foram as famílias mais ricas.

Nesta perspectiva, esta abordagem vem auxiliar a identificação de espécimes, sobretudo os crípticos, cujos caracteres morfológicos diagnósticos sejam inexistentes ou de difícil visualização (HEBERT et al. 2003). Portanto, neste estudo sequências do genoma mitocondrial COI foram utilizadas para criação de um banco de dados de referência ligados a coleções científicas, e a metadados biológicos como uma ferramenta poderosa e imprescindível para o conhecimento, monitoramento, fiscalização, identificação, bioprospecção da fauna piscícola da Bacia do Rio Itapecuru, até então pouco estudadas. Assim, os resultados gerados irão certamente dar subsídios para o desenvolvimento de planos de conservação e para o crescimento da atuação da genética forense em crimes contra este ecossistema.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Gerar dados moleculares utilizando fragmento do gene COI (DNA *barcoding*) para espécies de peixes da bacia do rio Itapecuru/MA.

2.2 Específicos

- Gerar sequências de DNA *barcoding* de diferentes espécies de peixes analisados contribuindo para o cumprimento das metas estipuladas para a Rede de DNA *barcoding* da ictiofauna do Brasil;
- Estimar a divergência genética em espécies de peixes a partir de sequências do gene mitocondrial COI e verificar a capacidade da técnica *DNA barcoding* em identificar e discriminar espécies proximamente relacionadas;
- Depositar sequências de DNA *barcoding* e informações associadas (dados de coleta e procedência dos espécimes e imagens) na rede de *DNA barcoding* da ictiofauna do Brasil;
- Analisar os dados de forma integrada e comparativa, caracterizando padrões de variabilidade e conteúdo informativo do gene COI para os diferentes táxons envolvidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Coleta

As coletas ocorreram nos cursos e afluentes da bacia hidrográfica do rio Itapecuru situado na região centro-leste do estado do Maranhão (Figura 1), realizadas mediante a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis de n. 02012.004159/2006.

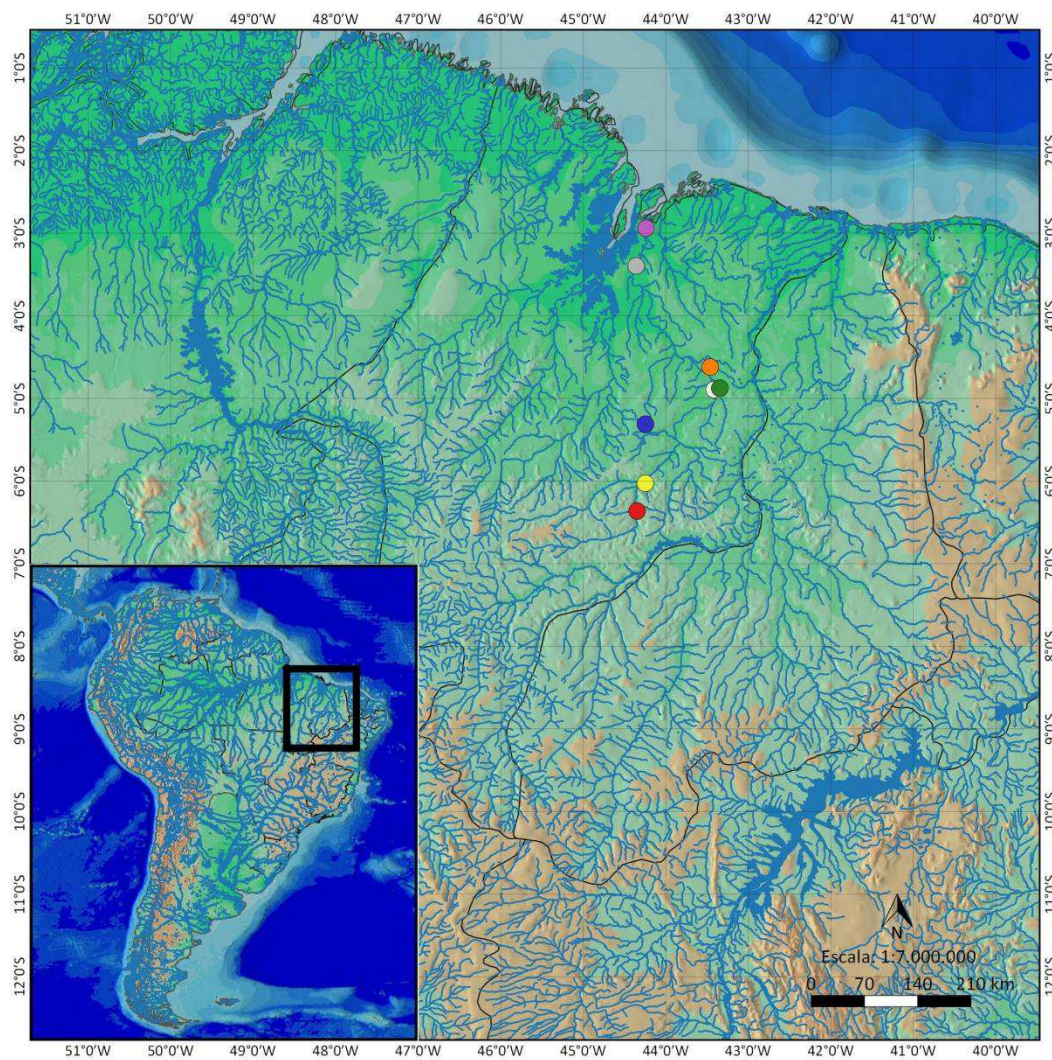


Figura 1. Mapa da Bacia do rio Itapecuru, Maranhão modificado de Barros et al. (2011) por Limeira Filho. Ponto roxo: Itapecuru-Mirim; cinza: Rosário; laranja: Aldeias Altas; verde: Caxias; branca: APA do Inhamum; azul: Governador Eugênio Barros; amarelo: Colinas; vermelho: Mirador.

3.2 Amostragem

Foi amostrado um total de 1969 espécimes. Estes foram coletados no alto, médio e baixo curso da bacia do rio Itapecuru utilizando redes de arrasto, malhadeiras de vários milímetros e tarrafas durante oito expedições (Cada uma com

duração de cinco dias nos trechos situados em Rosário, Caxias, Área de Preservação do Inhamum, Aldeias Altas, Governador Eugênio Barros, Mirador e Colinas). As identificações morfológicas foram realizadas utilizando chaves taxonômicas com posterior confirmação por especialistas.

Os espécimes testemunhos foram depositados na coleção Zoológica do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo/MZUSP (*vouchers* 104552-104603/110825-110829) assim como na coleção do Museu de Zoologia da Universidade Estadual do Londrina/MZUEL (*vouchers* 10534-10451), o restante dos espécimes encontra-se depositado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular.

As sequências consenso de 296 amostras (distribuída em oito ordens) com seus eletroferogramas originais (forward e reverse) já estão depositadas no banco de dados da plataforma BOLDSystems dentro do projeto “DNA Barcode of fishes from Itapecuru River Basin” como os códigos ITAPEITAPE001-14/ITAPE296-15 como informações de *vouchers*, identificador, taxonomia, coletores, data de coleta, instituição de estoque. Este projeto faz parte do The Brazilian Barcode of Life Consortium/projeto 9-DNA Barcoding of Brazilian Ichthyofauna da campanha Fish Barcode of Life (FishBOL) usando o marcador COI-P5 (Figura 2).

O BOLDSystems é uma plataforma de bioinformática que fornece dados para análises de sequências barcoding, sequências parciais de DNA do gene COI, esta plataforma foi criada com a padronização de um fragmento genômico para identificação de espécies. Hoje esta plataforma conta com mais de 230 mil espécies e mais de 3,7 milhões de sequências depositadas (Acesso em FEVEREIRO/2015). Em relação aos peixes, o programa FishBOL (<http://www.fishbol.org>), uma campanha internacional com o intuito de sequenciar todos os peixes, atualmente contém 14,950 espécies com sequências barcoding e 170,487 sequências depositadas (Acesso em FEVEREIRO/2015) de acesso livre à comunidade científica como também a população em geral, em que amostras estudadas podem ser checadas quanto a similaridade com amostras depositadas na plataforma auxiliando estudos que visam a obtenção de uma identificação molecular confirmando a identificação morfológica ou refutando, ou ainda indicando possibilidade de uma nova espécie.

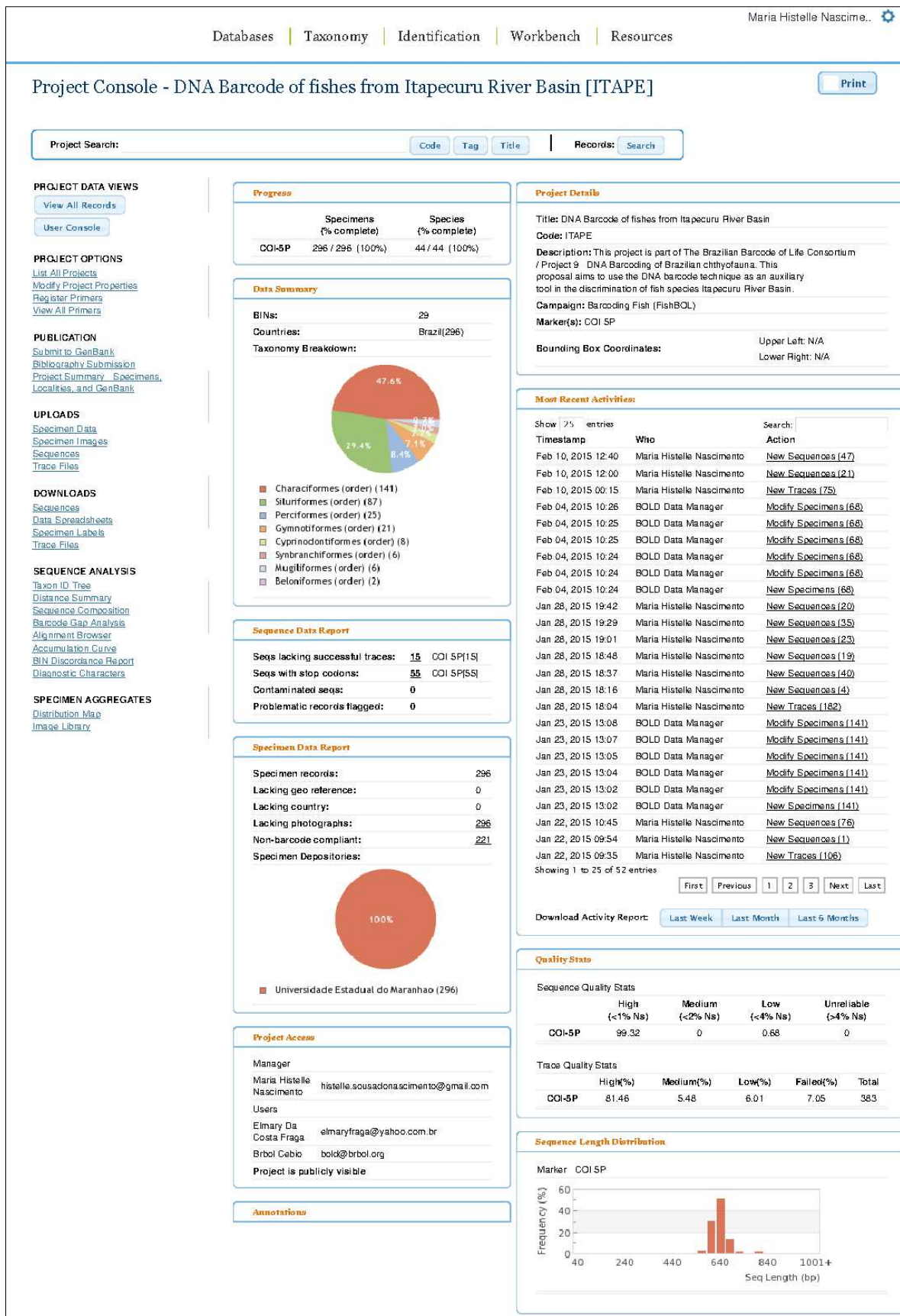


Figura 2. Pagina principal do projeto “DNA Barcode of fishes from Itapecuru River Basin” evidenciando as amostras depositas na plataforma BOLSsystems.

3.3 Análises genética

Para extração de DNA total foi usado protocolo de fenol clorofórmio modificado de Sambrook e Russel (2001) ou aplicando a metodologia com placa de fibra de vidro seguindo as instruções do fabricante (IVANOVA et al.,2006). O protocolo de fenol clorofórmio adaptado para microtubos de 1,5 ml consiste das seguintes etapas:

- Adicionar 20 mg de tecido muscular em um microtubo de 1,5 ml;
- Adicionar 600 µl de tampão de lise 5 µl de RNase. Incubar por 40 minutos a 37° C na estufa;
- Adicionar 15 µl de proteinase K e agitar delicadamente os tubos em um agitador, a uma temperatura de 55° C por 30 minutos; deixar esfriar até a temperatura ambiente;
- Adicionar 700 µl de fenol-clorofórmio-álcool-isoamil a uma concentração de 25:24:1, para precipitação de proteínas. Os tubos serão agitados delicadamente por cerca de 10 minutos;
- Centrifugar a 10.000 rotações por minutos (rpm) por 10 minutos;
- Transferir cuidadosamente a camada superior formada após a centrifugação para um novo tubo de 1,5 ml;
- Adicionar 700 µl de clorofórmio-álcool-isoamílico a uma concentração de 24:1 e agitar delicadamente por 10 minutos;
- Centrifugar a 10.000 rpm por mais 10 minutos;
- Transferir a camada sobrenadante para um novo tubo de 1,5 ml;
- Adicionar 100 µl de acetato de sódio (AcNa) 3M pH 4.8 e 700 µl de isopropanol (100%) para precipitação do DNA. A mistura será agitada gentilmente até a visualização da nuvem de DNA;
- A mistura será congelada a uma temperatura de -20° por no mínimo uma hora;
- Após o congelamento, a mistura será centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm. Descartar o material sobrenadante cuidadosamente para não perder o *pellet* de DNA precipitado;

- Adicionar 200 µl de etanol a 70% e centrifugar por 5 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente para não perder o *pellet* de DNA;
- Colocar o tubo aberto na estufa a 37° C por cerca de 30 minutos, para a completa evaporação do álcool;
- Adicionar 25 µl de água de injeção para hidratar;

O DNA foi visualizado em gel de agarose a 1% (50mg de agarose/50ml de tampão de TBE 1X) em uma proporção de 3µl do tampão (azul de bromofenol e xilenocianol) para 5 µl de DNA.

3.4 Amplificações via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Para a identificação molecular das espécies foi amplificado uma sequência parcial do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) de 650 pares de bases (pb), empregando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando as combinações de *primers*:

COI F1: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGCCAC- 3' (WARD et al., 2005) e

COI R1: 5' - TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA – 3' (WARD et al., 2005).

COI L6252-Asn: 5'- AAGGCGGGGAAAGCCCCGGCAG - 3' (MELO et al., 2011) e

COI H7271-COXI: 5'TCCTATGTAGCCGAATGGTTCTTTT -3' (MELO et al., 2011).

As reações de PCR seguiram o seguinte perfil em um volume final de 25µl: 1µl de DNA (250 ng/µl), 0.25µl de cada um dos *primers* Forward e Reverse (200 ng/µl), 2,5µl tampão (10X); 4µl de DNTPs (1,25 M), 0,5µl MgCl₂ (50 mM), 0,2µl Taq DNA polimerase (5U/µl) e água de injeção para completar o volume final da reação.

As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti 96 Well (Applied Biosystems) seguindo-se para a primeira combinação de *primers*: A amplificação constituiram de 35 ciclos e seguirá os seguintes parâmetros: Inicialmente 5 minutos a 94°C para desnaturação; 30 segundos a 56°C para hibridização; depois 1 minuto a 94°C para desnaturação; 1 minuto a 72°C para extensão. Ao final da reação uma extensão de 7 minutos a 72°C.

Para a segunda combinação de *primers*, a PCR constituiu de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 96°C, 35 ciclos de 96°C por 45 segundos para desnaturação, 45 segundos a 54°C para hibridização, 1 minuto a 72°C para extensão. Ao final uma etapa de extensão de 1 minuto a 72°C.

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à checagem de amplificação em gel de agarose 1% em uma proporção de 3µl do tampão (azul de bromofenol e xilenocianol) para 5 µl de DNA.

3.5 Purificação das amostras amplificadas

Após a amplificação e corrida das amostras em gel de agarose, os produtos da PCR foram purificados com o kit “*ExoSap-IT*” (USB Corporation) conforme recomendações do fabricante.

3.6 Reação de Sequenciamento

Os produtos purificados foram submetidos à reação de sequenciamento de DNA segundo o método de Sanger et al. (1977) realizada com o Kit “*Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction*” (Applied Biosystems). A reação consistiu de um volume final de 10µl: 1,5µl do produto amplificado, 2µl de *primer* (Forward ou Reverse, 0,8 pmol/µl), 1µl de Big Dye, 1,5µl de Tampão 5X para sequenciamento (kit Big Dye) e 4µl de água de injeção para completar o volume da reação.

As reações de sequenciamento foram realizadas em uma placa com 96 poços, utilizando-se um termociclador e um programa com os seguintes ciclos: 35 ciclos de 96°C por 60 segundos, 96°C por 15 segundos, 60°C por quatro minutos. Os *primers* utilizados na reação de sequenciamento foram os mesmos utilizados na reação de PCR para amplificação dos produtos e presentes na tabela 2. Ambas as direções (5' e 3') foram sequenciadas conforme exigência para o depósito de sequências *barcoding* na plataforma BoldSystems.

3.7 Precipitação em EDTA/etanol

Após a reação de sequência, as amostras foram precipitadas para a retirar do excesso de reagentes não incorporados. O protocolo para precipitação da reação de sequência constitui das seguintes etapas:

- Submeter a placa a um spin (centrífuga de placa);
- Adicionar 2,5µl de EDTA (125 mM);
- Vedar a placa e submeter a um spin;
- Adicionar 30µl de Etanol 100%;
- Vedar a placa e misturar invertendo 4-5x;
- Envolver a placa em papel alumínio e deixar em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos (centrífuga refrigerada 4° C);

- Centrifugar a 4.000 rpm por 30 minutos;
- Inverter bruscamente a placa para descartar o álcool e secar sobre o papel absorvente;
- Centrifugar a placa invertida por 15 segundos a 1.150 rpm;
- Adicionar 30µl de Etanol a 70%;
- Vedar a placa;
- Centrifugar a 3.440 rpm por 15 segundos (centrífuga refrigerada 4° C);
- Inverter bruscamente para descartar o álcool e secar sobre o papel absorvente;
- Centrifugar a placa invertida por 1 minuto a 1.150 rpm;
- Deixar a placa na estufa a 37° C por aproximadamente 10 minutos para evaporar o excesso de álcool;

3.8 Sequenciamento

Após a precipitação em cada amostra foi adicionado 10µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), seguindo de uma etapa de desnaturação das amostras a 95°C por dois minutos. Em seguida as amostras foram analisadas em sequenciador de DNA automático, modelo ABI 3500/ Life Technologies.

3.9 Análises dos dados

As sequências geradas nas direções forward e reverse foram editadas e alinhadas através do programa BIOEDIT, versão 7.0.5.2, (HALL, 1999). O alinhamento foi inspecionado visualmente para identificação de qualquer erro, que foi corrigido. O programa GENEIOUS versão 4.8.5 (Biomatters) foi utilizado na obtenção de sequências consenso e verificação de presença de *stop códons* conforme exigência para validação da sequência *barcoding* junto ao BoldSystems.

Os valores de distâncias genéticas intra e interespecíficas foram calculados, utilizando-se o modelo de substituição Kimura-2-parameter (K2P) (KIMURA, 1980). Os dendrogramas foram analisados pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU e NEI, 1987) usando o programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). A significância dos agrupamentos foi estimada pela análise de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985). As plataformas informáticas BoldSystems e Blast foram utilizadas para verificar o percentual de similaridade das amostras usadas neste estudos com as que se encontram depositadas, como mostra o anexo A.

4 RESULTADOS

Para os processos moleculares (isolamento do DNA, amplificação e/ou sequenciamento) 440 das 1969 espécimes amostradas foram bem sucedidas nas etapas laboratoriais resultando em biblioteca de dados correspondendo a 64 espécies pertencentes a 59 gêneros, 31 famílias e 10 ordens (Tabela 1), cujas sequências não revelaram a presença de *stop códons* sugerindo a ausência de pseudogenes nuclear mitocondrial (NUMTs) apontando que todos os fragmentos correspondem a região funcional do gene COI. As ordens Characiformes e Siluriformes apresentaram um maior numero de espécies e ordens Mugiliformes, Beloniformes e Pleuronectiformes foram representadas por uma espécie cada. Os dendrogramas obtidos podem ser visto nas figuras de 3 a 7 mostrando que as espécies formaram clados apoiados com valores de bootstrap superiores a 95%.

Os fragmentos sequenciados possuem 628 pares de bases (pb), dos quais 212 eram sítios conservados e 416 pb mostraram-se variáveis. O conteúdo de GC observado para o fragmento apresentou uma média de 46,1%.

Das 64 espécies analisadas, 40 foram representadas por um numero de espécimes igual ou maior que cinco, as demais espécies (24) tiveram uma representatividade inferior a cinco espécimes por táxon. No entanto, todas as amostras foram incorporadas na análise como principio da compreensão de suas identidades a partir de dados genéticos.

Aplicando o corte de 2 e 3% como é inferido em literatura para peixes neotropicais, foram identificadas 59 espécies pela abordagem do DNA *barcoding*, dos quais seis são representadas por um espécime (*singletons*) e representando 9,37% das espécies identificadas. Cinco espécies (7,81%) revelaram valores de distâncias entre seus espécimes com variação acima do percentual de delimitação de espécie, com médias superiores a 3% (Anexo B, C e D). Este resultado confirma a identificação atribuída por caracteres morfológicos em 92,19% das espécies, com baixos índices de divergência genética intraespecífica.

Tabela 1. Sumário dos táxons coletados na Bacia do Rio Itapecuru utilizadas nesse estudo com o gene COI.

Táxons			
Ordem	Família	Numero de gêneros	Numero de espécies
Siluriformes	Heptapteridae	2	3
	Ariidae	2	2
	Auchenipteridae	4	5
	Doradidae	2	2
	Pimelodidae	4	5
	Trychomycteridae	1	1
	Loricariidae	3	3
Characiformes	Prochilodontidae	1	1
	Cynodontidae	1	1
	Characidae	6	6
	Lebiasinidae	1	1
	Serrasalminidae	4	4
	Curimatidae	3	3
	Acestrorhynchidae	1	1
	Erythrinidae	1	1
	Anostomidae	2	2
	Hemiodontidae	1	1
	Gymnotiformes	Sternopygidae	1
	Gymnotidae	1	1
	Apteronotidae	1	1
	Rhamphichthyidae	1	1
	Perciformes	Scianidae	2
	Centropomidae	1	1
	Cichlidae	6	6
Mugiliformes	Mugilidae	1	1
Clupeiformes	Engraulidae	1	2
Cyprinodontiformes	Rivulidae	1	1
	Anablepidae	1	1
Synbranchiformes	Synbranchidae	1	2
Beloniformes	Belonidae	1	1
Pleuronectiformes	Anchiridae	1	1
Total		59	64

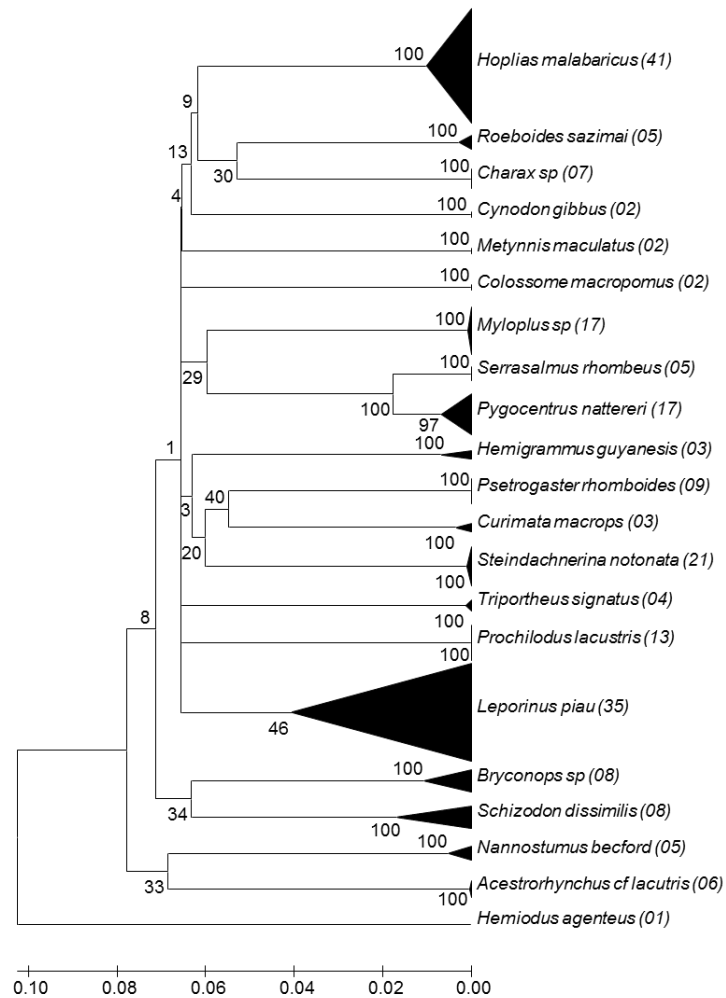


Figura 3. Dendrograma colapsado de Neighbor-Joining com 1000 réplicas de *bootstrap* das sequências do gene COI para 21 espécies de Characiformes coletadas na Bacia do Rio Itapecuru, MA. Os números entre parênteses representam a quantidade de espécimes utilizadas por espécie.

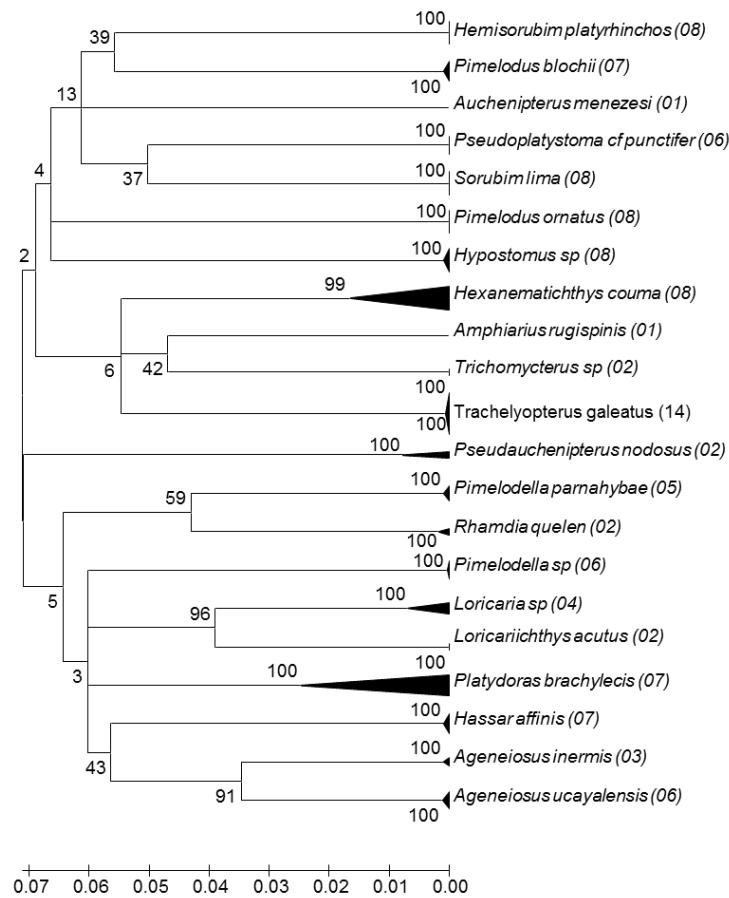


Figura 4. Dendrograma colapsado de Neighbor-Joining com 1000 réplicas de *bootstrap* das sequências do gene para 21 espécies de Siluriformes coletadas na Bacia do Rio Itapecuru, MA. Os números entre parênteses representam a quantidade de espécimes utilizadas por espécie.

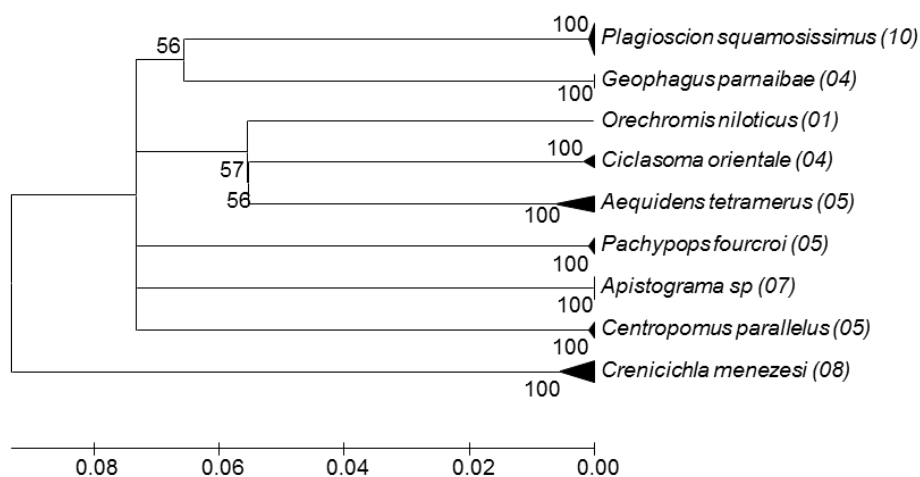


Figura 5. Dendrograma colapsado de Neighbor-Joining com 1000 réplicas de *bootstrap* das sequências do gene COI para 9 espécies de Perciformes coletadas na Bacia do Rio Itapecuru, MA. Os números entre parênteses representam a quantidade de espécimes utilizadas por espécie.

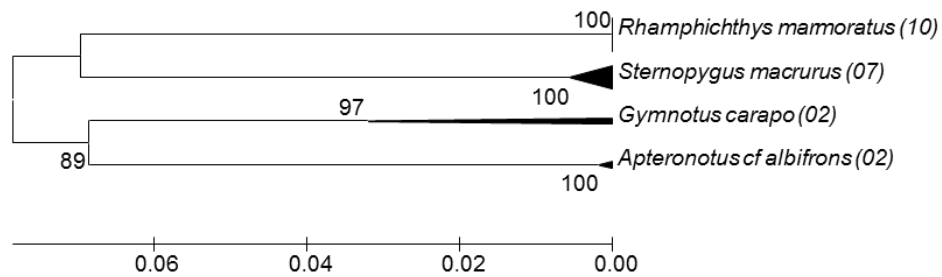


Figura 6. Dendrograma colapsado de Neighbor-Joining com 1000 réplicas de *bootstrap* de sequências do gene COI para 4 espécies de Gymnotiformes coletadas na Bacia do Rio Itapecuru, MA. Os números entre parênteses representam a quantidade de espécimes utilizadas por espécie.

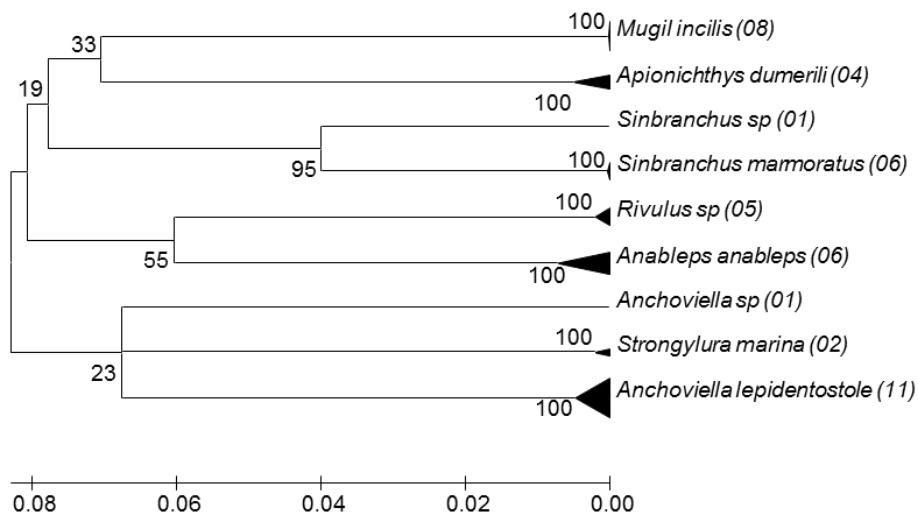


Figura 7. Dendrograma colapsado de Neighbor-Joining com 1000 réplicas *bootstrap* de sequências do gene COI para espécies de Mugiliformes, Synbranchyformes, Cyprinodontiformes, Clupeiformes, Beloniformes e Pleuronectiformes coletadas na Bacia do Rio Itapecuru, MA. Os números entre parênteses representam a quantidade de espécimes utilizadas por espécie.

O valor médio de distância genética intraespecífica revelado para todas as espécies foi de 0,80% com uma variação de 0 a 8,09% (excluindo *singletons*) como mostra a tabela 2, esse valor é inferior 30X que a média interespecífica (25,63%). Observou-se ainda uma elevação das distâncias genéticas a medida que aumenta as categorias taxonômicas.

Tabela 2. Médias das Distâncias genéticas (Kimura 2 Parâmetros) com desvio padrão dentro de diferentes níveis taxonômicos (excluindo *singletons*) dos peixes analisados da Bacia do Rio Itapecuru, MA.

Médias de Distancias Genéticas					
Comparação	Nº	Mínima	Média	Máxima	Desvio Padrão
Intraespecie	58	0	0,80	8,09	0,002
Interespécie	64	4,47	25,63	45,58	0,023
Intragênero	4	2,65	5,13	8,70	0,006
Intergênero	59	4,47	25,75	45,58	0,023
Intrafamília	12	5,29	11,69	21,94	0,010
Interfamília	31	8,14	21,18	41,44	0,022
Intraordem	7	3,02	10,65	23,74	0,011
Interordem	10	19,01	26,77	29,94	0,019

Espécies identificadas como *Anableps anableps* (LINNAEUS, 1758), *Gymnotus carapo* (LINNAEUS, 1758), *Pseudauchenipterus nodosus* (BLOCH, 1794), *Hexanematichthys couma* (VALENCIENNES, 1840) e *Leporinus piau* (FOWLER, 1941) revelaram entre seus espécimes distâncias genéticas superiores a 3% (Tabela 3). Para esses casos foram observados agrupamentos dos espécimes com formação de subclados, sugerindo a existência de diversidade na Bacia do rio Itapecuru, onde caracteres morfológicos sozinhos não foram capazes de elucidar o *status* taxonômico de alguns grupos, levando em muitos casos a erros de identificação (Figuras 8 e 9).

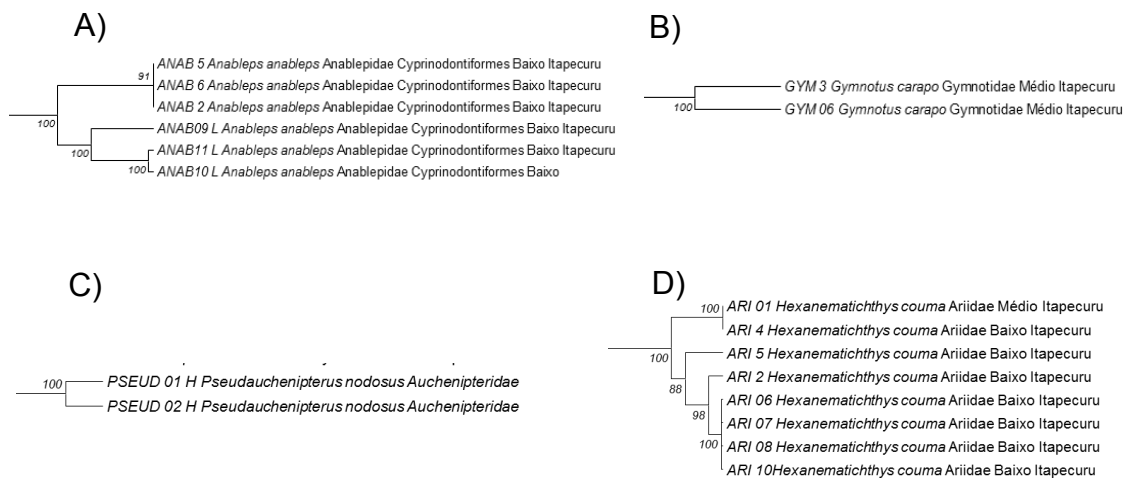


Figura 8. Dendrogramas de Neighbor-Joining com 1000 réplicas de *bootstrap* das sequências de COI de quatro espécies que apresentaram médias de distâncias genéticas intraespecíficas (Kimura 2 parâmetros) superiores a 3%. A) Espécie *Anableps anableps*; B) Espécie *Gymnotus carapo*; C) Espécie *Pseudauchenipterus nodosus* e D) Espécie *Hexanematchthys couma*.

Anableps anableps, conhecida como tralhoto, apresentou elevado valor de divergência entre seus espécimes, com variação de 0 a 11,61% (Tabela 3) formando dois clados (Figura 8A). Para este táxon evidenciou-se valor superior ao citado como limite de delimitação de espécie, apontando para ocorrência de mais de uma espécie identificadas como *A. anableps* para o baixo Itapecuru.

As duas de amostras *Gymnotus carapo* (Figura 8B) agruparam com 100% de *bootstrap* e com distância genética de 8,09% (Tabela 3) quando submetidas a análise de identificação por índice de similaridade no BLAST e BOLDSystems. Uma mostrou 97,91% similar a *Gymnotus chaviro* e 97,87% com *Gymnotus pantanal*, enquanto que a outra amostra mostrou-se similar com *G. carapo* com índices que variaram de 98,55 a 99,19%. Estes dados reforçam a necessidade de incorporação de mais exemplares na análise para essa espécie, assim como nova checagem por especialistas levando em consideração não apenas caracteres externos como também a informação genética o que também se aplica as amostras identificadas como *Pseudauchenipterus nodosus* representada por dois espécimes em que mostrou divergência de 3,67% (Figura 8C e Tabela 3) estas não apresentaram similaridades significativas quando analisadas nas plataformas BLAST e BOLDSystems.

Tabela 3. Distâncias genéticas (Kimura 2 Parâmetros) de amostras que apresentaram medias intraespecíficas superior a 3% em diferentes táxons dos peixes da bacia do Rio Itapecuru, MA.

Espécie	Distância intraespecífica (%)			Número de subclados	Distância inter-subclados (%)	Distância intra-subclados (%)
	Mínima	Média	Máxima			
<i>Anableps anableps</i>	0	6,56	11,61	2	5,89 a 11,61	0 a 6,30
<i>Gymnotus carapo</i>	-	8,09	-	2	8,09	-
<i>Pseudauchenipterus nodosus</i>	-	3,67	-	2	3,67	-
<i>Hexanematichthys couma</i>	0	3,23	5,96	2	4,12 a 5,96	0 a 4,50
<i>Leporinus piau*</i>	0	3,68	4,00	2	3,51 a 4,00	0 a 0,11

*= os valores correspondem ao subclado constituído pela maioria das amostras de *Leporinus piau*, excluindo o espécime que ficou fora do agrupamento.

As amostras de *Hexanematchthys couma* agruparam com 100% de *bootstrap* com a formação de dois subclados com distância genética variando de 0 a 5,96% (Figura 8D e Tabela 3) com média de 3,23%. Quando analisadas as amostras por constituição de clado, as amostras que constituíram o primeiro clado apresentaram distância genética de 0%, enquanto que as amostras do segundo clado revelaram distância genética de 0 a 4,50% com média de 1,76%. Essa elevada divergência reflete a necessidade de concatenação de informações morfológicas e genéticas na determinação do *status* específico para minimizar as constantes revisões taxonômicas.

Leporinus piau revelou um padrão de diferenciação genética com uma média de distância genética de 1,67% (Anexo B), uma vez que as que a maioria das amostras constituíram um clado subdivido em dois subclados, a distância entre eles variou de 0 a 4% e média de 3,68%. Uma amostra não mostrou similaridade com nenhuma outra ficando de fora do agrupamento (Figura 9) divergindo das demais em 11,53 a 12,98% com média de 11,33%. Quando analisadas médias dentro de cada subclado, o primeiro subclado mostrou uma divergência intra-subclado de 0%, para o segundo subclado foi evidenciado uma divergência variando de 0 a 0,48 (dado não mostrado) com média de 0,11% (Tabela 3).

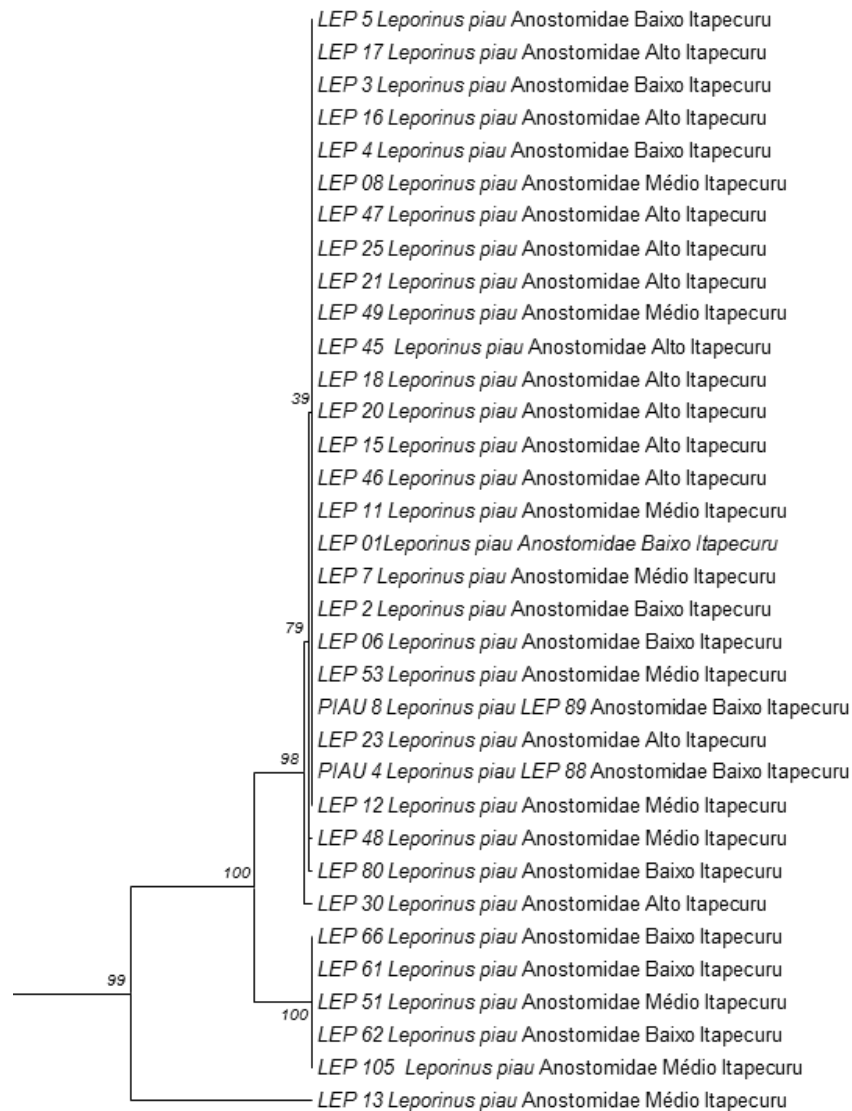


Figura 9. Dendrograma de Neighbor-Joining com 1000 réplicas de *bootstrap* das sequências *Leporinus piau* que mesmo apresentando média de distância genética intraespecífica (Kimura 2 Parâmetro) inferior a 2% revelaram um valor alto quando comparado sequência par a par.

4.1 ESPÉCIES QUE PASSARAM POR REVISÃO

A espécie *H. couma* além de mostrar distâncias entre seus espécimes, neste estudo foi adotado a nova nomenclatura. Em 2003, Marceniuk e Ferraris reconheceram o gênero *Sciades* validado por Castro-Aguirre et al. (1999) e o consideraram como sinônimo sênior do gênero *Hexanemathichthys*. No ano seguinte Kailola (2004) baseado em exames de espécies-tipo, reconheceu o gênero *Sciades* e acrescenta ao gênero sete espécies dentre elas *Hexanemathichthys couma*. Logo a nomenclatura válida para a espécie referida por Barros et al. (2011) para Bacia do Rio Itapecuru é *Sciades couma* e não *H. couma*.

A. rugispinis foi incluída no gênero *Arius* por Taylor e Menezes (1977) permanecendo por anos, em 2004 foi removida para o gênero *Notarius* por Betancur e Acero. No entanto, características como ausência de bifurcação na região caudal da linha lateral, ausência de dentes associados com processo vômer, entre outros caracteres levaram Marceniuk e Menezes (2007) à criação do gênero *Amphiarus* e adição de *A. rugispinis* neste gênero. O *Parauchenipterus* é considerado por Ferraris (2003) como um gênero sinônimo de *Trachelyopterus* e relaciona as espécies do gênero *Parauchenipterus* dentro desde ultimo. Com isso adotamos as novas nomenclaturas para espécies como sugerido pelos autores, uma vez que estas já se encontram atualizadas no FishBase (www.fishbase.com).

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento da estratégia DNA *barcoding* tem como função essencial a identificação correta de um indivíduo dentro de uma espécie. Contudo, o gene COI também vem sendo usado com bastante frequência em estudos filogenéticos e filogeográficos por apresentar regiões variáveis suficientes para análises de grupos taxonomicamente relacionados (SAHLS; NYBLOM, 2000; HEBERT et al., 2003; BLAXTER, 2004), principalmente para crustáceos e moluscos (COX, 2001; HEBERT, 2003; HARRISSON, 2004, TESKE et al., 2007), assim como em trabalhos filogeográficos de peixes (BRYKOV et al., 2003).

Após passar mais de uma década da hipótese de Hebert et al. (2003) de que um fragmento de DNA (COI) seria capaz de identificar uma espécie, diversos valores de corte baseados em distâncias intraespecíficas foram propostos para delimitação do nível de espécie, como por exemplo, de 1% (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007), valores 10x da média intraespecífica (HEBERT et al., 2004), *barcoding gap* (MEYER; PAULAY, 2005). No entanto, os valores de limite do nível de espécie, 2% e 3% são comumente adotados em estudos de peixes neotropicais (LARA et al., 2010; CARVALHO et al., 2011; MABRAGAÑA et al., 2011; PEREIRA et al., 2011a; PEREIRA et al., 2011b; PEREIRA et al., 2013; HUBERT et al., 2015), com isso também foram adotados neste estudo evidenciando 59 espécies confirmação a identificação morfológica.

Em nossos resultados, a média de distância genética intraespecífica foi significativamente inferior à interespecífica, o que ressalta a precisão da técnica, uma vez que seu sucesso baseia-se nessa diferença, caracterizando o *barcoding gap*.

Para *A. anableps*, uma espécie estuarina-residente, em estudos sobre estruturação genética de suas populações na costa norte e nordeste amazônica do Brasil mostrou uma alta divergência genética entre suas populações apontando quatro linhagens mitocondriais distintas relacionadas a quatro regiões biogeográficas também distintas. Segundo os autores a estruturação das populações se deve a acontecimentos do Holoceno que representaram um forte impacto sobre os habitats costeiros, limitando conectividade e promovendo a divergência genética de várias espécies fazendo dos estuários uma barreira para fluxo genético entre populações de muitas espécies como *A. anableps* (WATANABE et al., 2014).

No estudo de Watanabe et al. (2014), a população da baía de São Marcos (Maranhão) constituiu a linhagem Caeté-Parnaíba com significativo fluxo gênico entre

as populações. Neste cenário, a elucidação da alta distância genética em *A. anableps* do baixo Itapecuru depende o aumento do número amostral bem como a utilização de mais marcadores genéticos que confirmem que de fato se trata de uma espécie (em diferenciação) ou trata-se de espécies distintas que foram identificadas como sendo uma só.

Em *G. carapo*, além de mostrar uma alta divergência entre as duas amostras, um espécime revelou similaridade com *G. pantanal* quando analisadas no BLAST e BOLD o que torna ainda mais difícil inferir qualquer resposta, tendo em vista que são espécies de identificação complexa e pela pequena quantidade de amostras usadas em nosso trabalho. Henriques (2010) observou que, de quatro espécies do gênero (*Gymnotus pantherinus*, *Gymnotus sylvius*, *Gymnotus carapo* e *Gymnotus inaequilabiatus*) somente *G. pantherinus* constitui um clado definido, as demais espécies evidenciaram uma sobreposição. Vale ressaltar que as espécies do gênero *Gymnotus* são de difícil identificação por conta da grande similaridade morfológica levando a inferências taxonômicas errôneas, o que pode ser a razão da sobreposição observada.

A separação de espécimes de *A. couma* em subclados com altos valores de *bootstrap* e distâncias superiores a 3%, assim como *A. anableps*, reflete a necessidade de uma adequação nos processos de identificação reunindo informações morfológicas e moleculares na determinação do *status* específico para minimizar esta problemática.

Altas distâncias reveladas entre espécimes identificados como *L. piau* separando-os em dois grupos também foram reveladas no estudo de Fraga et al. (2014) usando um fragmento do gene mitocondrial rRNA 16S. Estes autores analisando amostras de *L. piau* da Bacia do Rio Itapecuru encontraram 10 haplótipos com uma variação de 0,2 a 1,9% de divergência genética, sugerindo que esta espécie esteja passando por um processo de diferenciação genética, porém, ainda sem estruturação populacional. Chiari e Sodré (1999) estudando a variabilidade genética de cinco espécies da família Anostomidae (*Schizodon intermedius*, *Schizodon nasutus*, *Leporinus friderici*, *Leporinus elongatus* e *Leporinus obtusidens*) do Rio Tibagi com uso de sete sistemas de proteínas (isoenzimas) verificou alta taxa de polimorfismo variando de 16,7% (*S. intermedius*) a 36,9% (*L. friderici*) indicando um elevado índice de diferenciação. Olivatti et al. (2011) fazendo caracterização de *L. friderici* com marcadores microssatélites revelou altos valores de heterozigosidade

(0,54) e diversidade genética (0,750) corroborando a hipótese de diferenciação em peixes do gênero *Leporinus*.

Leporinus é um dos gêneros da família Anostomidae com maior número de espécies válidas (GARAVELLO; BRITSKI, 2003). Por outro lado, as espécies deste gênero constantemente tem passado por revisões decorrentes das relações ecológicas e taxonômicas pouco esclarecidas, provavelmente havendo um número incerto de espécies descritas (KRINSKI; MIYAZAWA, 2013). Portanto, inferências de dados moleculares podem auxiliar a taxonomia tradicional na resolução de incertezas taxonômicas dentro deste grupo.

Em todos os casos destacam-se a necessidade de uma interação de abordagens de diferentes caracteres, moleculares, morfológicos e/ou dados de isolamento reprodutivo, com intuito de obter respostas mais consistentes da existência de possíveis linhagens coespecífica ou tratar-se de novas espécies até então não confirmadas (DAYRAT, 2005).

A identificação das espécies de peixes para a Bacia do Rio Itapecuru através da ferramenta de DNA *barcoding* é imperativa não somente pela importância referente ao conhecimento científico, mas também na quantificação da exploração de populações naturais, fiscalização do comércio, podendo minimizar fraudes e substituição de espécies em transações comerciais, principalmente as protegidas, bem como na certificação de produtos processados que venham ser comercializados (CARVALHO et al., 2008; SMITH et al., 2008). O sucesso dessa ferramenta baseia-se na diferença entre as divergências genéticas intra e interespecíficas (HEBERT et al., 2003; HEBERT et al., 2004; MEYER e PAULAY, 2005).

Neste estudo, foi confirmada a eficiência do gene COI como código de barras de DNA, pois em análises de um grande número de exemplares estudados foi possível à identificação e discriminação de mais 90% das espécies estudadas para a Bacia do Rio Itapecuru, assim como em outros trabalhos em que peixes de água doce puderam ser identificados pela abordagem do DNA *barcoding* (HUBERT et al., 2008; CARVALHO et al., 2012; RIBEIRO et al., 2013; BELLAFRONTE et al., 2013;). Vale ressaltar que para cinco espécies analisadas neste estudos não foram inferidos dados de sua ocorrência para Bacia do Rio Itapecuru no levantamento de Barros et al. (2011).

Considerando que esta bacia, a exemplo das demais bacias hidrográficas brasileiras apresenta um alto grau de endemismo ictiofaunístico, sendo importante o

conhecimento sobre a ocorrência das espécies antes mesmo que estas venham desaparecer, uma vez que os rios do Maranhão estão sob fortes ações antrópicas que acarretam inúmeras alterações/destruição dos ecossistemas aquáticos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados confirmam que um grande número de espécies pode ser separado pelas análises de DNA *barcoding*, como foi proposto por Hebert et al. (2003), uma vez que:

- Identificaram e discriminaram sem ambiguidade a maioria das espécies de peixes estudadas;
- Mais de 90% das espécies, as distâncias genéticas intraespecíficas confirmaram a identificação de espécies reconhecidas por características morfológicas com valores de inferiores a 3%. No entanto, para as espécies *Sciades couma*, *Gymnotus carapo*, *Anableps anableps*, *Pseudauchenipterus nodosus* e *Leporinus piau* torna-se necessário a utilização de outros marcadores e aumento do número amostral para inferências sobre suas taxonomias;
- A geração da biblioteca de dados de DNA *barcoding* de espécies da Bacia do Rio Itapecuru evidencia a ocorrência de pelo menos 59 espécies identificadas tanto pela taxonomia morfológica como pela molecular.
- As sequências *barcoding* geradas e depositadas no BOLD são importantes para consolidação da técnica como um sistema global de identificação da biodiversidade, servindo como apoio para estudos futuros.

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, E. H. **Caracterização da bacia hidrográfica do Rio Itapecuru, Maranhão**. Caminhos de Geografia, vol. 7, n. 11, p. 97-113. 2004.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman & Hall. 1994.
- BAKER, A. J.; TAVARES, E. S.; ELBOURNE, R. F. Countering criticisms of single mitochondrial DNA gene barcoding in birds. **Molecular Ecology Resources**, v. 9 Suppl s1, p. 257-68. 2009.
- BARROS, M. C.; FRAGA, E. C.; BIRINDELLI, J. L. Fishes from the itapecuru river basin, state of Maranhão, Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Biology** (Impresso). , v.71, p.In Press - . 2011.
- BECKER, S.; HANNER, R.; STEINKE, D. Five years of FISH-BOL: brief status report. **Mitochondrial DNA**, v. 22 Suppl 1, p. 3-9. 2011.
- BELLAFRONTE, E.; MARIGUELA, T.C.; PEREIRA, L.H.G.; OLIVEIRA, C.; MOREIRA-FILHO, C. Dna barcode of Parodontidae species from the La Plata river basin-applying new data to clarify taxonomic problems. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 3, p. 497-506. 2013.
- BETANCUR-R., R.; ACERO, P.A. Description of *Notarius biffi* n. sp. and redescription of *N. insculptus* (Jordan and Gilbert) (Siluriformes: Ariidae) from the eastern Pacific, with evidence of monophyly and limits of *Notarius*. **Zootaxa**, v.703, p.1–20. 2004.
- BEZERRA, A. S. **Contribuição à geomorfologia da bacia do Itapecuru, Maranhão**. Tese de Mestrado. Unesp. Rio Claro, SP, 1984.
- BLAXTER, M.L. The promise of a DNA taxonomy (one contribution of 19 to a theme issue entitled 'Taxonomy for the twenty-first century'). **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v.359, p. 669-679. 2004.
- BRYKOV, V. A.; POLYAKOVA, N. E.; PROKHOROVA, A. V. Phylogeographic analysis of chum salmon *Oncorhynchus keta* Walbaum in Asian populations based on mtDNA variation. **Russian Journal of Genetics**, v. 39, n. 1, p. 61-67.2003.
- CARVALHO, D. C.; OLIVEIRA, D. A. 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**, v. 22, p. 80–86, 2011.
- CARVALHO, D. C.; SEERIG, A.; MELO, D. C.; SOUSA, A. B.; PIMENTA, D.; OLIVEIRA, D. A. A. Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma* spp). **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.32, n.4, p.215-219.2008.
- CASTELLANA, S.; VICARIO, S.; SACCONI, C. Evolutionary Patterns of the

Mitochondrial Genome in Metazoa: Exploring the Role of Mutation and Selection in Mitochondrial Protein-Coding Genes. **Genome Biology and Evolution**. n. 3, p.1067–1079. 2011.

CASTRO-AGUIRRE, J.L., ESPINOSA, P. H.S. & SCHMITTER-SOTO, J.J. Ictiofauna estuarino-lagunar y vicaria de México. Colección Textos Politécnicos. **IPN. y Limusa Noriega**, 711pp. 1999.

CHIARI, L.; SODRÉ, L.M.K. Genetic Variability in five species of Anostomidae (Ostariophysi-Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, v.22, n.4, p.517-523. 1999.

COX, A. J.; HEBERT, P. D. N. Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 371-386. 2001.

DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, p. 407-415, 2005.

DAWNAY, N.; OGDEN, R.; MCEWING, R.; CARVALHO, GR. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. **Forensic Science International**. n. 173, p. 1-6. 2007.

FEITOSA, A. L. **O Maranhão primitivo: uma tentativa de reconstrução**. Editora Augusta, São Luís, Maranhão, 1983.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791.1985.

FERRARIS, C.J. J. Auchenipteridae (Driftwood catfishes). In R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris, Jr. (eds.) **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 470-482.

FRAGA, E.; SILVA, L.M.M.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; BARROS, M.C. Variabilidade genética em populações naturais de *Leporinus piau* (Anostomidae, Characiformes) da bacia do Rio Itapecuru. **Revista Trópica**, p.28-40, v.8, n. 2, 2014.

FREZAL, L.; LEBLOIS, R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 5, p. 727-736. 2008.

GARAVELLO, J.C.; BRITSKI, H. A. Anostomidae (Headstanders). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, JR. (eds.) **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 71-84.

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

HARRISON, J. S. Evolution, biogeography, and the utility of mitochondrial 16s and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austinixa* (Decapoda: Pinnotheridae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 30, p. 743–754. 2004.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; de WAARD, J.R.; Biological identification through DNA barcoding. **Proceedings of the Royal Society of London**, Biological sciences, n.279, p. 313-322, 2003.

HEBERT, P.D.N.; PENTON, E.H.; BURNS, J.M.; JANZEN D.H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA batcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, n.41, 14812-14817, 2004.

HENRIQUES, J. M. **Identificação molecular (DNA barcoding) dos peixes da bacia do rio ribeira de Iguape e dos rios costeiros do estado de São Paulo**. 2010. 117f. Tese (Ciências Biológicas Zoologia) – Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, São Paulo, 2010.

HUBERT, N.; ESPIAU, B.; MEYER, C.; PLANES, S. Identifying the ichthyoplankton of a coral reef using DNA Barcodes. **Molecular Ecology Resources**. n. 15, p. 57–67. 2015.

HUBERT, N.; HANNER, R.; HOLM, E.; MANDRAK, N.E.; TAYLOR, E.; BURRIDGE, M.; WATKINSON, D.; DUMONT, P.; CURRY, A.; BENTZEN, P.; ZHANG, J.; APRIL, J.; BERNATCHEZ, L. Identifying canadian freshwater fishes trough DNA barcodings. **Plos one**. v. 3, e2490, 2008.

IVANOVA, N.V.; ZEMLAK, T. S.; HANNER, R. H.; HEBERT, P.D. N. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. **Molecular Ecology Notes**. v.7, p. 544–548. 2007.

IVANOVA, N. V.; DEWAARD, J. R.; HEBERT, P. D. N. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 4, p. 998-1002, 2006.

KAILOLA, P.J. A phylogenetic exploration of the catfish family Ariidae (Otophysi: Siluriformes). *The Beagle, Records of Museum Art Galleries of North Territory*, v. 20, p. 87–166. 2004.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120.1980.

KRINSKI, D.;MIYAZAWA, C.S. Karyotypic analysis in *Leporellus vittatus* and *Leporinus striatus* (Teleostei, Characiformes, Anostomidae) from Upper Paraguay Basin, Mato Grosso State, Brazil. **Estudos de Biologia**. v. 35, n. 85, p. 113-120. 2013.

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

LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. Quantas espécies há no Brasil?. **Megadiversidade**. v. 1, n. 1, p. 36-42. 2005.

LOWE-MCCONNELL, R.H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo, EDUSP. 535pp, 1999.

MABRAGAÑA E, ASTARLOA JMD, HANNER R, ZHANG J, CASTRO MG. DNA Barcoding Identifies Argentine Fishes from Marine and Brackish Waters. **PLoS One**, 6:e28655. 2011.

MARANHÃO. Governo do estado do Maranhão. **Programa de revitalização da bacia hidrográfica do rio Itapecuru**: Linhas de ação e componentes. São Luis, 2008.

MARCENIUK, A.P.; MENEZES, N.A. Systematics of the family Ariidae (Ostariophysi, Siluriformes), with a redefinition of the genera. **Zootaxa**, v. 1416, p. 1-126, 2007.

MARCENIUK, A.P.; C.J. FERRARIS JR. Ariidae (Sea catfishes). In R.E. REIS, S.O. KULLANDER AND C.J. FERRARIS, Jr. (eds.) **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p.447-455.

MEDEIROS, R. **Itapecuru**: águas que correm entre pedras. São Luís, 2001.

MELO, B.F.; BENINE, R.C.; MARIGUELA, T.C.; OLIVEIRA, C. A new species of *Tetragonopterus* Cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae: Tetragonopterinae) from the rio Jari, Amapá, northern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 9(1):49-56. 2011.

MEYER, C. P.; PAULAY, G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. **PLoS Biology**, v. 3, n. 12, p. e422, 2005.

MOLBO, D.; MACHADO, C.A.; SEVENSTER, J.G.; KELLER, L.; HERRE, E.A. ROZAS J, SÁNCHEZ-DEL BARRIO J. C. MESSEGUER X, ROZAS R. Cryptic species of fig-pollinating wasps: Implications for the evolution of the figwasps mutualism, sex allocation, and precision of adaptation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 100, n. 10, p. 5867-2872, 2003.

OLIVATTI, A. M.; T.A. BONI, T. A.; SILVA-JÚNIOR, N. J.; L.V. RESENDE, L. V.; F.O. GOUVEIA, F. O.; TELLES, M. P.C. Heterologous amplification and characterization of microsatellite markers in the Neotropical fish *Leporinus friderici*. **Genetics Molecular and Research**. v. 10, n. 3: 1403-1408. 2011.

ORTIZ, M. F. **Validação do DNA Barcode como identificador de espécies: um estudo de ampla amostragem com o gênero *Pseudoplatystoma* (Siluriformes, Pimelodidae) na Amazônia**. 2010. 73f. Dissertação (mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2010.

PEREIRA LHG, HANNER R, FORESTI F, OLIVEIRA C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics**, v. 14, n. 20. 2013.

PEREIRA LHG, PAZIAN MF, 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**, v. 22, n. 1:p. 87–96. 2011b.

PEREIRA, L.H.G. **Identificação molecular dos peixes da Bacia do alto Rio Paraná**.179f. Tese. (Doutorado em Ciências Biológicas -Zoologia) - UNESP, Botucatu, São Paulo. 2011a.

PIORSKI, N. M.; CASTRO, A. C. L.; PEREIRA, L. G.; MUNIZ, M. E. L. Ictiofauna do trecho inferior do Rio Itapecuru, Nordeste do Brasil. **Bol. Lab. Hidrobiol.**, v. 11, p. 15-24, 1998.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P.D.N. BOLD: The barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes**, 7:355–364. 2007.

REIS, R.E., KULLANDER, S.O., FERRARIS, C. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA), EDIPUCRS, Porto Alegre, 729 pp. 2003.

RIBEIRO, A. O.; CAIRES, R. A.; MARIGUELA, T.C.; PEREIRA, L. H. G.; HANNER, R.; OLIVEIRA, C. DNA barcodings identify marine fishes of São Paulo State, Brazil. **Molecular Ecology Resources**, v.12, p. 1012–1020, 2012.

SACCONI, C.; DE GIORGI, C.; GISSI, C.; PESOLE, G.; REYES, A. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. **Gene**, v. 238, p.195–209. 1999.

SAHLS, G.; NYBLUM, K. Phylogenetic analysis of the genus *Cheilosia* (Diptera, Syrphidae) using mitochondrial COI sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 15, p. 235-241. 2000.

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

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SANGER, F.; NICHLEN, S.; COULSON, A. R DNA sequencing with chain-termination inhibitors. **National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5463-5468. 1977.

SANTOS, G.S.A. **Análise filogenética das espécies de Leporinus (Ostariophysi: Characiformes: Anostomidae) das Bacias da Prata e São Francisco**. 2007. 98f. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas: Zoologia) – Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu. 2007.

SCHAEFER, S.A. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). 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. 375-400. 1998.

SMITH, P.J.; MCVEAGH, S.M.; STEINKE, D. DNA barcoding for the identification of

smoked fish products. **Journal of Fish Biology**, v.72, p.464-471, 2008.

SONG, H.; BUHAY, J.E.; WHITING, M.F.; CRANDALL, K.A. Many species in one: DNA barcoding overestimates the numbers of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 36: 13486–13491. 2008.

TAMURA K.; STECHER G.; PETERSON D.; FILIPSKI A.; KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729. 2013.

TAYLOR, W.R.; MENEZES, N.A. Ariidae: Sea Catfishes. In: Fischer, W. (Ed.). FAO Species Identification Sheets for Fishery Purposes. Western Central Atlantic (Fishing Area 31). Food and Agriculture Organisation, Rome. 1–37. 1977.

TESKE, P. R.; OOSTHUIZEN, A.; PAPADOPOULOS, I.; BARKER, N. P. Phylogeographic structure of *Octopus vulgaris* in South Africa revisited: identification of a second lineage near Durban harbour. **Marine Biology**, v. 151, n. 6, p. 2119-2122. 2007.

TURNER, T.F.; PHEE, M.V., CAMPBELL, P.; WINEMILLER, K.O. Phylogeography and interspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers in North South America. **Journal of Fish Biology**, n. 64, p. 186-201, 2004.

VARI, R.P.; MALABARBA, L.R.. Neotropical ichthyology: an overview. In: L.R. MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z M.S.; LUCENA, C.A.S. (eds.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. pp. 1-11. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil. 1998.

VENCES, M., THOMAS, M., VAN DER MEIJDEN, A., CHIARI, Y., VIEITES, D. R. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. **Frontiers in Zoology**, v. 2, p. 1-12. 2005.

WARD, R. D. DNA barcoding divergence among species and genera of birds and fishes. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 4, p. 1077-85, 2009b.

WARD, R. D.; COSTA, F. O.; HOLMES, B. H.; STEINKE, D. DNA barcoding of shared fish species from the North Atlantic and Australasia: minimal divergence for most taxa, but *Zeus faber* and *Lepidopus caudatus* each probably constitute two species. **Aquatic Biology**, v. 3, p. 71–78, 2008.

WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H., LAST, P. R.; HEBERT, P. D. N. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 359, p.1847-1857, 2005.

WATANABE, L. A.; VALINOTO, M. NETO, N. A.; MURIEL-CUNHA, J.; SAINT-PAUL, U. The Past and Present of an Estuarine-Resident Fish, the “Four-Eyed Fish” *Anableps anableps* (Cyprinodontiformes, Anablepidae), Revealed by mtDNA Sequences. **Plos one**. v. 9, n. 7. 2014.

WAUGH, J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. **Bioessays**, v. 29, n. 2, p. 188-97,2007.

ANEXOS

Anexo A. Percentual de Similaridade das espécies da bacia do Rio Itapecuru, MA com espécies presentes no BoldSystems e Blast.

Ordem	Código	Taxonômica	Identificação	
				Molecular: BOLD/BLAST
Characiformes	ACES	<i>Acestrorhynchus cf lacustris</i>		<i>Acestrorhynchus sp</i> (99.82)
				<i>Acestrorhynchus cf. falcatus</i> (99.62)
	SARD	<i>Triportheus signatus</i>		<i>Triportheus signatus</i> (98.76)
				<i>Triportheus nematurus</i> (98.76)
	COR	<i>Charax sp</i>		<i>Charax gibbosus</i> (98.84)
	PIAB	<i>Bryconops sp</i>		<i>Bryconops affinis</i> (99.2)
	CUT	<i>Prochilodus lacustris</i>		<i>Prochilodus nigricans</i> (99.67)
				<i>Prochilodus rubrotaeniatus</i> (99.5)
				<i>Prochilodus lineatus</i> (98.84)
				<i>Prochilodus costatus</i> (98.48)
	PIB	<i>Serrasalmus rhombeus</i>		<i>Serrasalmus rhombeus</i> (99.35)
	PIR	<i>Pygocentrus nattereri</i>		<i>Pygocentrus nattereri</i> (99.11)
	TAMB	<i>Colossoma macropomum</i>		<i>Colossoma macropomum</i> (100)
	PACU	<i>Metynnis maculatus</i>		<i>Metynnis maculatus</i> (99.68)
	TRA	<i>Hoplias malabaricus</i>		<i>Hoplias malabaricus</i> (97.44)
	LEP	<i>Leporinus piau</i>		<i>Leporinus sp04</i> (99.49)
				<i>Leporinus venerei</i> (99.15)
				<i>Leporinus sp15</i> (99.15)
				<i>Leporinus sp06</i> (100)
				<i>Leporinus friderici</i> (99.52)
				<i>Leporinus sp10</i> (99.2)
			<i>Leporinus elongatus</i> (98.83)	
	SCH	<i>Schizodon dissimilis</i>		<i>Schizodon sp03</i> (99.15)
	BRAN	<i>Psectrogaster rhomboides</i>		<i>Psectrogaster rutiloides</i> (97.4)
		<i>Curimata macrops</i>		<i>Curimata cyprinoides</i> (98.33)
Siluriformes	MANDI	<i>Pimelodella sp</i>		<i>Pimelodella vittata</i> (99.49)
	RHA	<i>Rhamdia quelen</i>		<i>Rhamdia quelen</i> (97.81)
	ARU	<i>Arius rugispinis</i>		<i>Notarius rugispinnis</i> (99.69)
	AUCH	<i>Auchenipterus menezesi</i>		<i>Auchenipterus osteomystax</i> (99)
	AUCH/AGEN	<i>Ageneiosus ucayalensis</i>		<i>Ageneiosus ucayalensis</i> (99.83)
	AUCH/AGEN	<i>Ageneiosus inermis</i>		<i>Ageneiosus inermis</i> (98.8)
	AUCH/PAR	<i>Trachelyopterus galeatus</i>		<i>Trachelyopterus galeatus</i> (99.18)
	CORRO	<i>Platydoras brachylecis</i>		<i>Platydoras costatus</i> (97.12)
	MDOU	<i>Pimelodus blochii</i>		<i>Pimelodus blochii</i> (97.63)
	FASC	<i>Pseudoplatystoma cf punctifer</i>		<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i> (98.71)
	PATO	<i>Sorubim lima</i>		<i>Sorubim lima</i> (97.78)
	BODO	<i>Hypostomus sp</i>		<i>Hypostomus boulengeri</i> (97)
	Perciformes	CORV	<i>Plagioscion squamosissimus</i>	
CENT		<i>Centropomus parallelus</i>		<i>Centropomus parallelus</i> (100)
CREN		<i>Crenicichla menezesi</i>		<i>Crenicichla menezesi</i> (98.96)
CICH		<i>Oreochromis niloticus</i>		<i>Oreochromis niloticus</i> (100)
CARA		<i>Geophagus parnaibe</i>		<i>Prochilodus nigricans</i> (99.6)
		<i>Aequidens tetramerus</i>		<i>Cichlasoma bimaculatum</i> (98.42)
		<i>Cichlasoma orientale</i>		<i>Aequidens tetramerus</i> (98.1)
			<i>Cichlasoma orientale</i> (99.83)	
Gymnotiformes	STER	<i>Sternopygus macrurus</i>		<i>Sternopygus sp</i> (97.7)
				<i>Sternopygus macrurus</i> (97.22)
	GYM	<i>Gymnotus carapo</i>		<i>Gymnotus carapo</i> (99.19)
				<i>Gymnotus chaviro</i> (97.89)
				<i>Gymnotus pantanal</i> (97.85)
	APTE	<i>Apteronotus cf albifrons</i>		<i>Apteronotus cf. albifrons</i> (99.29)
				<i>Apteronotus albifrons</i> (99.22)
Clupeiformes	TUBI	<i>Rhamphichthys marmoratus</i>		<i>Rhamphichthys rostratus</i> (98)
	ANCH	<i>Anchoviella sp</i>		<i>Prochilodus nigricans</i> (99.03)
		<i>Anchoviella lepidentostole</i>		<i>Anchoviella lepidentostole</i> (99.67)
Beloniformes	BEL	<i>Strongyrula marina</i>		<i>Hoplias malabaricus</i> (98.13)

Anexo B. Médias de distâncias genéticas (Kimura 2 Parâmetro) interespecífico (abaixo da diagonal) e intraespecífica (diagonal) da ordem Siluriformes da bacia do Rio Itapecuru, MA.

Espécies	Médias Distâncias genética (%)																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1. <i>Pimelodella</i> sp	0,06																				
2. <i>Amphiarius ruspispinis</i>	18,56	-																			
3. <i>Sciades couma</i>	21,54	12,27	03,23																		
4. <i>Achenipterus menezesi</i>	22,19	19,26	18,83	-																	
5. <i>Ageneiosus ucayalensis</i>	20,71	18,33	21,06	17,13	0,67																
6. <i>Ageneiosus inermis</i>	18,43	17,24	20,07	19,63	08,20	0,13															
7. <i>Trachelyopterus galeatus</i>	18,80	17,57	16,10	17,73	18,40	16,00	0,18														
8. <i>Pseudauchenipterus nodosus</i>	21,57	22,33	23,02	23,23	25,71	23,25	21,66	03,67													
9. <i>Hassar affinis</i>	20,07	18,70	21,71	21,47	18,74	16,74	21,24	26,11	0,05												
10. <i>Platydoras brachylecis</i>	21,35	19,44	21,67	21,79	18,84	19,32	21,92	24,82	16,39	01,09											
11. <i>Pimedodus blochii</i>	20,11	20,45	22,31	18,07	18,35	18,63	18,27	27,45	20,46	21,00	0,11										
12. <i>Pimelodus ornatus</i>	22,39	21,72	23,56	22,69	22,01	20,44	19,95	26,33	22,06	23,59	16,22	0									
13. <i>Pseudoplatystoma cf punctifer</i>	19,50	20,72	18,86	19,68	20,71	18,89	19,22	24,18	18,30	20,35	14,32	18,03	0,13								
14. <i>Sorubim lima</i>	19,12	20,03	20,02	22,08	21,42	20,70	18,26	28,27	22,08	24,40	15,57	20,26	12,66	0							
15. <i>Hemisorubim platyrhynchos</i>	22,47	20,96	20,75	21,93	23,35	21,51	21,45	26,91	20,88	23,37	15,63	19,97	15,77	18,50	0						
16. <i>Rhamdia quelen</i>	14,82	19,23	20,72	20,15	20,12	18,22	18,35	23,44	21,67	21,13	18,83	21,39	17,78	18,50	19,02	0,76					
17. <i>Pimelodella parnahybae</i>	11,55	20,64	22,27	20,66	21,18	19,65	19,35	23,20	22,15	23,72	20,68	23,71	17,51	19,33	21,08	13,26	0,08				
18. <i>Trichomycterus</i> sp	21,94	19,06	20,95	22,00	21,76	20,36	19,44	23,97	20,82	22,09	20,95	23,18	21,11	21,61	22,23	23,22	23,30	0,19			
19. <i>Hypostomus</i> sp	20,69	22,42	21,94	23,70	25,79	22,65	21,23	27,04	22,13	27,64	20,15	22,34	21,29	22,16	21,11	22,44	24,23	24,07	0,05		
20. <i>Loricaria</i> sp	19,94	20,75	22,38	24,94	24,19	22,30	23,91	26,06	24,05	25,92	22,40	22,64	21,86	23,39	24,39	21,40	20,82	22,89	20,45	01,35	
21. <i>Loricariichthys acutus</i>	18,33	20,09	18,73	22,27	21,58	19,45	21,09	24,04	20,62	21,27	20,95	21,45	17,94	22,27	22,37	20,59	19,69	22,06	16,50	10,87	0,19

Anexo C. Médias de distâncias genéticas (Kimura 2 Parâmetro) interespecífico (abaixo da diagonal) e intraespecífica (diagonal) da ordem Characiformes da bacia do Rio Itapecuru, MA.

Espécies	Média de Distância genética (%)																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1. <i>Prochilodus lacustris</i>	0																				
2. <i>Cynodon gibbus</i>	19,52	0																			
3. <i>Triportheus signatus</i>	21,50	23,83	01,18																		
4. <i>Serralmus rhombeus</i>	20,32	20,87	23,86	0																	
5. <i>Pygocentrus nattereri</i>	19,76	21,11	22,89	04,25	0,59																
6. <i>Colossome macropomus</i>	21,04	21,72	25,25	18,20	18,57	0															
7. <i>Psetrogaster rhomboides</i>	19,78	23,53	26,41	23,64	23,59	20,38	0														
8. <i>Curimata macrops</i>	19,54	23,52	25,61	23,71	23,76	21,56	14,95	0,51													
9. <i>Myloplus sp</i>	19,32	20,04	25,17	16,26	14,68	17,74	21,24	21,19	0,15												
10. <i>Metynnis maculatus</i>	17,52	20,40	22,26	14,39	15,12	16,84	21,09	24,18	17,86	0											
11. <i>Charax sp</i>	20,29	24,08	22,10	22,28	22,24	22,13	23,80	25,97	23,39	22,85	0										
12. <i>Roebooides sazimai</i>	20,44	18,72	21,63	22,53	21,66	24,83	23,04	23,82	24,38	22,85	11,89	0,65									
13. <i>Bryconops sp</i>	23,36	25,55	23,91	23,32	23,24	22,49	24,15	27,12	23,55	25,05	24,54	24,24	0,62								
14. <i>Nonnostumus becford</i>	23,15	24,30	25,05	23,25	23,34	25,95	23,74	28,38	24,46	25,91	22,76	21,27	23,23	02,08							
15. <i>Steindacherina notonota</i>	21,20	27,04	24,12	21,09	20,71	22,02	14,25	18,95	23,10	20,52	24,19	27,32	25,67	23,72	0,14						
16. <i>Hemigrammus guyanesis</i>	18,66	21,50	23,33	20,64	22,27	23,37	18,34	19,83	21,62	21,18	21,27	20,06	22,41	24,20	19,98	01,54					
17. <i>Acestrorhynchus cf lacutris</i>	23,80	29,33	26,59	26,14	25,43	25,52	26,21	29,55	24,51	28,27	25,04	26,31	25,71	24,84	26,23	25,63	0,7				
18. <i>Hoplias malabaricus</i>	21,01	19,79	24,25	22,35	22,63	21,74	20,92	24,41	21,50	19,64	21,05	19,20	23,80	25,30	22,70	21,02	25,95	0,43			
19. <i>Hemiodus agenteus</i>	35,73	41,27	39,94	37,06	35,80	41,27	38,45	37,91	36,60	37,95	39,36	38,75	39,29	39,66	38,97	35,63	39,19	36,73	-		
20. <i>Leporinus piau</i>	16,21	20,60	22,17	18,29	17,78	20,87	18,35	18,74	18,91	18,59	21,70	21,08	22,91	22,90	19,89	18,35	24,72	21,50	32,36	01,67	
21. <i>Schizodon dissimilis</i>	20,44	23,05	24,33	20,70	20,68	22,72	20,67	22,82	20,21	20,48	24,37	23,84	23,05	24,21	22,03	21,24	26,07	24,15	36,74	14,90	01,27

Anexo D. Médias de distâncias genéticas (Kimura 2 Parâmetro) interespecífico (abaixo da diagonal) e intraespecífica (diagonal) das ordens Gymnotiformes, Perciformes, Mugiliformes, Clupeiformes, Cyprinodontiformes, Synbranchiformes e Pleuronechitiformes da bacia do Rio Itapecuru, MA.

Espécies	Média de Distância genética																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1. <i>Sternopygus macrurus</i>	0,6																					
2. <i>Gymnotus carapo</i>	21,42	08,09																				
3. <i>Apteronotus cf albifrons</i>	23,16	22,47	0,19																			
4. <i>Rhamphichthys marmoratus</i>	24,84	24,80	28,10	0																		
5. <i>Plagioscion squamosissimus</i>	26,06	25,74	28,99	27,50	0,04																	
6. <i>Pachypops fourcroyi</i>	27,17	25,43	29,48	26,21	19,19	0,11																
7. <i>Centropomus parallelus</i>	26,72	24,28	29,53	30,87	26,52	24,79	0,11															
8. <i>Crenicichla menezesi</i>	31,64	29,93	33,26	35,89	32,44	28,26	29,20	0,43														
9. <i>Oreochromis niloticus</i>	27,32	25,01	26,64	23,14	24,36	25,34	24,78	28,54	-													
10. <i>Geophagus parnaibae</i>	22,91	23,15	29,81	24,24	22,00	26,85	25,01	30,46	22,69	0												
11. <i>Aequidens tetramerus</i>	24,10	26,18	30,21	26,74	26,39	24,64	26,44	27,50	20,17	27,99	0,69											
12. <i>Cichlasoma orientale</i>	24,89	22,78	30,35	25,76	25,55	24,87	28,11	25,80	22,35	26,87	14,46	0,19										
13. <i>Apistogramma sp</i>	27,83	25,98	26,62	27,50	30,85	30,45	27,19	29,74	25,34	25,10	25,39	27,78	-									
14. <i>Mugil incilis</i>	29,15	25,54	28,95	27,70	20,53	21,09	28,63	30,79	22,01	22,36	27,95	25,73	30,89	0,14								
15. <i>Achoviella sp</i>	26,37	23,10	31,33	29,11	24,85	27,46	27,32	32,48	25,02	20,12	29,58	28,43	30,85	25,67	-							
16. <i>Anchoviella lepidentostole</i>	27,51	23,31	31,15	28,98	24,16	29,76	28,27	30,03	26,25	24,12	28,68	26,85	31,14	26,82	14,51	0,73						
17. <i>Rivulus sp</i>	28,10	27,06	31,24	27,41	29,78	28,31	27,87	30,88	29,02	26,15	26,20	28,87	30,08	29,06	26,42	29,15	0,15					
18. <i>Anableps anableps</i>	27,85	28,52	31,91	32,84	28,63	29,56	27,74	35,20	26,21	28,74	25,82	29,67	30,29	29,56	27,09	31,13	26,61	06,56				
19. <i>Synbranchus sp</i>	30,89	25,90	31,59	28,08	27,37	26,58	26,77	29,83	23,22	27,63	27,32	27,70	28,91	27,90	27,50	26,23	27,53	30,72	-			
20. <i>Sinbranchus marmoratus</i>	29,92	26,67	30,94	30,23	28,73	27,22	29,06	34,04	25,35	26,48	27,97	29,74	31,86	29,13	26,65	29,91	27,88	29,22	10,71	0,08		
21. <i>Strongylura marina</i>	24,31	25,25	28,55	27,78	24,53	22,44	24,12	29,86	26,26	22,00	26,34	24,20	29,75	25,19	25,66	24,26	28,47	28,04	28,20	28,19	01,14	
22. <i>Apionichthys dumerili</i>	26,28	23,38	28,61	26,11	25,03	24,51	22,97	30,19	24,28	23,65	28,10	27,22	30,40	24,72	22,30	25,71	24,94	28,24	24,91	25,73	26,07	01,5

