

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA**  
**CENTRO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS - CECEN**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA**  
**BIODIVERSIDADE - PPGECB**

**MARCELO SILVA DE ALMEIDA**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Cichla***  
**(CICHLIFORMES: CICHLIDAE) INTRODUZIDAS EM BACIAS HIDROGRÁFICAS**  
**MARANHENSES**

**São Luís – MA**  
**2022**

**MARCELO SILVA DE ALMEIDA**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Cichla*  
(CICHLIFORMES: CICHLIDAE) INTRODUZIDAS EM BACIAS HIDROGRÁFICAS  
MARANHENSES**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, da Universidade Estadual do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Área de Concentração: Recursos Pesqueiros.

Orientador: Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga  
CESC/UEMA

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Claudene  
Barros

**São Luís – MA  
2022**

Almeida, Marcelo Silva de.

Identificação molecular de espécies do gênero *Cichla* (CICHLIFORMES: CICHLIDAE) introduzidas em bacias hidrográficas maranhenses / Marcelo Silva de Almeida. – São Luís, 2022.

76f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Estadual do Maranhão, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga.

1.Ictiofauna. 2.Biodiversidade. 3.Filogenéticos. I. Título.

CDU: 639.2.053.3(812.1)

**MARCELO SILVA DE ALMEIDA**

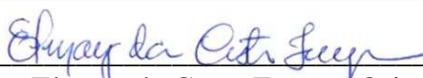
**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Cichla*  
(CICHLIFORMES: CICHLIDAE) INTRODUZIDAS EM BACIAS HIDROGRÁFICAS  
MARANHENSES**

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de Pós - Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação da Biodiversidade.

Orientador: Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga

Aprovado em: 30/03/2022

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga – Orientador  
Doutorado em Genética Molecular  
Universidade Estadual do Maranhão – CESC/UEMA



---

Profa. Dra. Andréa Martins Cantanhede (1ºExaminador)  
Doutorado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva  
Universidade Federal do Maranhão/Campus São Luís



---

Profa. Dra. Erivânia Gomes Teixeira (2ºExaminador)  
Doutorado em Engenharia de Pesca  
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

Dedico à Deus por guiar meus passos e pela saúde; a minha família pelo apoio, aos meus irmãos da igreja, incentivo e compreensão nos momentos de ausência e dificuldades.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me ouvir nos momentos de dificuldades e nunca me desamparar quando necessitei, pela infinita bondade de me fortalecer por meio dos obstáculos e pelas conquistas ao longo de minha vida. Agradeço ainda, por guiar meus passos e por me cercar de pessoas abençoadas.

Ao meu orientador, o professor Dr. Elmary da Costa Fraga, por ter me acolhido no Laboratório de Genética e Biologia Molecular (GENBIMOL), pela confiança e persistência comigo ao longo desses dois anos e meio de aprendizado. Obrigada por sempre me apoiar nos momentos de dificuldades, com seus conselhos cheios de amor e sabedoria, pelas broncas e pressões que só me proporcionaram crescimento e por sempre acreditar no meu potencial.

A minha coorientadora professora Dra. Maria Claudene Barros, pelo apoio durante minha caminhada acadêmica e científica e por suas orientações.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade (PPGECB) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) pela formação acadêmica.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e o Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo financiamento dos projetos e concessão da bolsa.

Aos meus pais, José Augusto e Sebastiana Silva, por sempre estarem ao meu lado e me proporcionarem suporte para meus estudos, mesmo diante das dificuldades. Obrigada pai e mãe, pelo suporte acadêmico, emocional, financeiro, por serem minha base, pelo amor, confiança e fé na minha pessoa.

Aos meus irmãos, Eduarda, Sabrina e Waleson e sobrinho Arthur, por me proporcionarem a alegria e tranquilidade de sempre poder contar com eles, seja nos momentos bons ou de tristeza, e agradeço por sempre me sentir tão amada pelos mesmos.

Ao pastor Clóvis Milhomem, irmã Miriam e aos seus filhos Apolo e Nayrane, por fazerem parte da minha caminhada acadêmica, sou grato a Deus por suas orações, preocupações comigo durante os dois anos de mestrado, aqui deixo minha gratidão a vocês.

A toda família GENBIMOL, a qual sempre pude contar com os amigos nos meus momentos de preocupação e busca do saber, entre estes: Andreлина Alves, Maria Histelle, Amanda Caroline, Jordânia Leticia, Roseane Oliveira, Cleison Luís, Walna Mikaelly, Samira Brito, Priscila Olímpio, e aos demais meu muito obrigado.

A todo o corpo docente do PPGRAP/UEMA por contribuírem com meu aprendizado e crescimento acadêmico durante esses últimos anos, em especial os professores: Raimunda Fortes, Lígia Tchaicka, Selma Patrícia, Andrea Christina, Veronica Maria, Ilka Márcia,

Nancylene Pinto, Marina Bezerra, Erivânia Gomes, Audalio Rebelo, Elmary Fraga e Ícaro Gomes.

Quero agradecer de todo o coração as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização de mais um sonho, ser Mestre. Por fim agradeço a todos por serem meus amigos.

A todos, meu muito obrigado!

*“Por maior que sejam seus sonhos, o sonho de Deus é maior. Ele sabe o que você pede, mas o que ele quer dar é melhor!”*

*Robson Fonseca*



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

**Figura 1** - Genoma mitocondrial dos Peixes. Em vermelho evidenciando a região do Citocromo Oxidase Subunidade I (COI).....17

### CAPÍTULO 2











**Figura 1** - Localização dos rios Flores e Pindaré/MA onde foram obtidos os espécimes.....28

**Figura 2** - Árvore filogenética gerada a partir de Agrupamentos de Vizinhos utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) para o gene COI. Os números dos nós representam os valores de *bootstrap* (1000 pseudoréplicas). PIN – Pindaré e Flor – Flores.....31

### CAPÍTULO 3

**Figura 1** - Figura 1 - Mapa da localização dos pontos de coleta nas bacias maranhenses (A). Ponto A: Rio Pindaré; ponto B: Rio Flores; ponto C: Rio Parnaíba; (B) Rio Tocantins, ponto A: Palmas; ponto B: Lajeado. Fonte: Adaptado por Teixeira (2020) no programa Quantum GIS 2.6.0.....41

**Figura 2.** Árvore de inferência bayesiana evidenciando os agrupamentos dos OTUs delimitadas pelos métodos ABGD, ASAP, PTP e GMYC baseada no gene mitocondrial COI. Congruência entre métodos é representado por retângulos pretos.....44

**Figura 3.** Rede de haplótipos gerada para espécies do gênero *Cichla* provenientes de bacias hidrográficas Pindaré, Mearim, Parnaíba e Tocantins e sequências depositadas na plataforma Genbank com base no gene COI. **H1**-  *Cichla* sp. - Parnaíba,  *Cichla monoculus* - Mearim,  *Cichla monoculus* – Alto Paraná; **H2** -  *Cichla kelberi* - Pindaré,  *Cichla kelberi* – Tocantins, *Cichla kelberi* – Alto Paraná; **H3** -  *Cichla piquiti* - Tocantins,  *Cichla piquiti* - Paraná; **H4**-  *Cichla ocellaris* – rio Maroni; **H5** -  *Cichla melaniae* - Xingú; **H6** -  *Cichla mirianae* - Xingú.....45

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1** - Relação dos táxons coletados nos rios Flores e Pindaré/MA.....30

**Tabela 2** - Percentual das médias de divergência nucleotídica interespecífica e intraespecífica, gerada no programa MEGA X baseada no gene COI. NC – Não calculado.....31

**Tabela 3** - Comparações de fragmentos do gene COI dos táxons do rio Flores e Pindaré na plataforma BOLDSystems.....32

### CAPÍTULO 3

**Tabela 1.** Espécimes de Tucunaré obtidos em bacias hidrográficas no estado do Maranhão e Tocantins.40

**Tabela 2.** Média de divergência genética entre os clados interespecífica e intraespecífica (diagonal) das espécies de *Cichla* dos rios em estudo e do Genbank gerada no programa MEGA X para o gene COI.....43

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	12
RESUMO GERAL.....	13
ABSTRACT.....	14
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
1. Gênero <i>Cichla</i> Schneider, 1801.....	16
2. DNA <i>barcoding</i> e modelos de delimitação de espécies .....	17
3. OBJETIVO.....	19
REFERÊNCIAS.....	20
<b>CAPÍTULO 2: Identificação Molecular de Tucunarés (Cichlidae, Perciformes) Introduzidos em Bacias Hidrográficas Maranhenses Através do DNA Mitocondrial.....</b>	<b>23</b>
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. METODOLOGIA.....	28
2.1 Área de estudo e obtenção das amostras.....	28
2.2 Coleta do Material.....	29
2.3 Procedimentos genéticos.....	30
2.4 Análises dos dados.....	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.1 Análise do Fragmento e Composição Nucleotídica.....	31
3.2 Relações Filogenéticas e Distância Genética .....	32
3.3 Identificação Molecular (BOLDSYSTEMS v3).....	33
4. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	34
<b>CAPÍTULO 3: DNA BARCODING CONFIRMA A INTRODUÇÃO DE <i>Cichla monoculus</i> E <i>Cichla Kelberi</i> EM BACIAS MARANHENSES.....</b>	<b>39</b>

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação, intitulada “Identificação Molecular de Espécies do Gênero *Cichla* (Cichliformes: Cichlidae) Introduzidas em Bacias Hidrográficas Maranhenses” é um dos requisitos exigidos pelo Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, da Universidade Estadual do Maranhão, para a obtenção do título de Mestre. Os resultados aqui apresentados foram gerados no Laboratório de Genética e Biologia Molecular vinculado a esta instituição no Campus Caxias/MA. Este estudo contou com o apoio financeiro da Fundação de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) inclusive concedeu também a bolsa de mestrado. A dissertação será apresentada em três capítulos sendo o Capítulo 1: Revisão de literatura e objetivo sobre os temas abordados neste trabalho e os demais capítulos serão apresentados em formato de capítulo e artigo científico. Capítulo 2: Identificação Molecular de Tucunarés (Cichlidae, Perciformes) introduzidos em Bacias Hidrográficas Maranhenses Através do DNA Mitocondrial, aceito como Capítulo de livro publicado “Coletânea Estudos Ambientais e Agrônômicos: resultados para o Brasil. Capítulo 3: DNA *BARCODING* CONFIRMA A INTRODUÇÃO DE *Cichla monoculus* E *Cichla Kelberi* EM BACIAS MARANHENSES a ser submetido a Neotropical Ichthyology.

## RESUMO GERAL

A inferência sobre a origem dos estoques pesqueiros introduzidos fora de seu habitat utilizando enfoque filogenético constitui-se uma importante aplicação para a compreensão e controle da expansão das espécies invasoras. Nesse sentido, utilizamos a técnica de DNA *barcoding* para identificar espécies do gênero *Cichla* em bacias maranhenses. Os peixes foram coletados nas bacias do Mearim/afluentes, Pindaré, Parnaíba e Tocantins, utilizando-se redes de malhadeiras e tarrafas, e em seguida foram transportados para o Laboratório de Genética e Biologia Molecular (GENBIMOL) para triagem e identificação com o auxílio de literatura específica e submetidas às técnicas de extração de DNA, amplificação do gene COI via PCR e sequenciamento. A edição, alinhamento das sequências, distâncias genéticas, rede de haplótipos foram realizadas a partir dos programas BioEdit, MEGA X e Network. Os modelos ABGD, ASAP GYMC e PTP foram usados para a delimitação de OTUs. Um total de 78 sequências do gene COI foram obtidas, 37 sequências correspondem às espécies *Cichla kelberi* do rio Pindaré, *Cichla monoculus* do rio Flores, *Cichla piquiti* do rio Tocantins e *Cichla* sp. do rio Parnaíba e 41 sequências foram provenientes do Genbank, com médias de divergências genéticas intraespecíficas de 0% e interespecíficas de 6,78% a 44,75%. Os agrupamentos pelas reconstruções filogenéticas de (ML) e (BI) apresentaram clados fortemente sustentados, indicando concordância com as espécies atribuídas por identificação morfológica. Um total de seis haplótipos foram obtidos para os espécimes do gênero *Cichla*, com valores de diversidade haplotípica  $h = 0,726$  e nucleotídica  $\pi = 0,0479$ . O haplótipo H1 foi compartilhado nas populações de *C. monoculus* provenientes dos rios Parnaíba, Mearim e Alto Paraná. Já o haplótipo H2 compartilhou populações de *C. kelberi* dos rios Pindaré, Tocantins e Alto Paraná. O haplótipo H3 foi compartilhado com populações de *C. piquiti* dos rios Tocantins e Paraná. Foram observados três haplótipos exclusivos para as populações de *Cichla ocellaris* proveniente do rio Maroni na Guiana Francesa, para *Cichla melaniae* e *Cichla mirianae* provenientes do Xingú (H4, H5 e H6). A identificação realizada na plataforma BOLD Systems confirmou a identificação morfológica das espécies em estudo com similaridade de 99,13 a 100%. Portanto, sugerimos que os espécimes de *C. kelberi* do rio Pindaré sejam provenientes de populações nativas da bacia do rio Tocantins e *C. monoculus* dos rios Mearim, Parnaíba e Alto Paraná por constituírem o mesmo haplótipo sejam provenientes de um mesmo estoque. É possível inferir também que *C. piquiti* do rio Paraná seja derivada de populações do rio Tocantins. Em conclusão, nosso estudo foi o primeiro a usar análises moleculares para validar a presença de *C. monoculus* como espécies invasoras em rios maranhenses, bem como, confirma a introdução e registro de *C. kelberi* no rio Pindaré.

**Palavras-chave:** Ictiofauna, Biodiversidade, Filogenia.

## ABSTRACT

The inference on the origin of fish stocks introduced outside their habitat with a phylogenetic approach constitutes an important step in understanding and controlling the expansion of invasive species. In this sense, we used the DNA *barcoding* technique to identify species of the genus *Cichla* in Maranhão basins. The fish were collected in the Mearim/tributaries, Pindaré, Parnaíba and Tocantins basins, using nets of gillnets and nets, and then transported to the Laboratory of Genetics and Molecular Biology (GENBIMOL) for sorting and identification with the aid of specific literature and submitted to DNA extraction techniques, COI gene amplification via PCR and sequencing. Editing, sequence alignment, genetic distances, haplotype network were performed using the BioEdit, MEGA X and Network programs. ABGD, ASAP GYMC and PTP models were used for OTU delimitation. A total of 78 sequences of the COI gene were obtained, 37 sequences correspond to the species *Cichla kelberi* from the Pindaré River, *Cichla monoculus* from the Flores River, *Cichla piquiti* from the Tocantins River and *Cichla* sp. from the Parnaíba river and 41 sequences were from Genbank, with average intraspecific genetic divergence of 0% and interspecific genetic divergence from 6.78% to 44.75%. The clusters by phylogenetic reconstructions of (ML) and (BI) showed strongly supported clades, indicating agreement with the species assigned by morphological identification. A total of six haplotypes were obtained for specimens of the genus *Cichla*, with haplotypic diversity values  $h = 0.726$  and nucleotide diversity  $\pi = 0.0479$ . The H1 haplotype was shared in populations of *C. monoculus* from the Parnaíba, Mearim and Alto Paraná rivers. The H2 haplotype shared populations of *C. kelberi* from the Pindaré, Tocantins and Alto Paraná rivers. The H3 haplotype was shared with populations of *C. piquiti* from the Tocantins and Paraná rivers. Three exclusive haplotypes were observed for the populations of *Cichla ocellaris* from the Maroni River in French Guiana, for *Cichla melaniae* and *Cichla miriana* from the Xingú (H4, H5 and H6). The identification performed on the BOLD Systems platform confirmed the morphological identification of the species under study with a similarity of 99.13 to 100%. Therefore, we suggest that specimens of *C. kelberi* from the Pindaré River come from native populations from the Tocantins River basin and *C. monoculus* from the Mearim, Parnaíba and Alto Paraná Rivers, as they constitute the same haplotype, come from the same stock. It is also possible to infer that *C. piquiti* from the Paraná River is derived from populations from the Tocantins River. In conclusion, our study was the first to use molecular analysis to validate the presence of *C. monoculus* as an invasive species in Maranhão rivers, as well as confirming the introduction and registration of *C. kelberi* in the Pindaré River.

**Keywords:** Ichthyofauna, Biodiversity, Phylogenetics.

**CAPÍTULO 1**  
**REVISÃO DE LITERATURA**

## 1. Gênero *Cichla* Schneider, 1801

O gênero *Cichla*, representado popularmente pelos tucunarés, pode ser distinguido de outros ciclídeos por apresentar um ocelo característico na nadadeira caudal. São peixes de grande tamanho, alimentam-se preferencialmente de peixes pequenos, são os maiores determinantes na estrutura da comunidade em muitos habitats fluviais (JEPSEN et al., 1997; WINEMILLER et al., 1997) produzem uma intensa pressão de seleção em uma variedade de peixes (LAYMAN; WINEMILLER, 2004) e são adaptados a ambientes lênticos (STAECK; LINE, 1985; NELSON, 1994). Os representantes deste gênero são endêmicos da bacia amazônica, no entanto, foram introduzidos ao longo de várias bacias hidrográficas brasileiras e a sua constante introdução tem gerado discussões no que diz respeito aos impactos que podem ocasionar às populações nativas (TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2005).

O gênero foi primeiramente descrito por Schneider em 1801, baseado na descrição da espécie *Cichla ocellaris*. Taxonomicamente foram sugeridas para *Cichla* 15 formas diferentes, contudo apenas seis espécies foram aceitas como válidas: *Cichla temensis* Humboldt & Valenciennes (Alto Orinoco – Colômbia, Venezuela; Rio Negro e Amazônia Ocidental – Brasil); *Cichla ocellaris* Schneider em 1801 (Suriname; drenagens da Guiana e Amazônia Venezuelana); *Cichla orinocensis* Humboldt & Valenciennes, 1821 (Bacia do Rio Orinoco – Colômbia e Venezuela; Rio Negro – Brasil); *Cichla monoculus* Agassiz, 1831 (Bacia Amazônica – Brasil, Peru, Colômbia e Equador); *Cichla intermedia* Machado-Allison, 1971 (Alto Rio Negro e Médio Orinoco) (KULLANDER, 1986; KULLANDER & NIJSSEN, 1989; WINEMILLER, 2001) e *Cichla nigromaculata* Jardine 1843 (Alto Rio Orinoco – Venezuela e Médio Rio Negro – Brasil). Entretanto Kullander; Ferreira (2006) em uma revisão taxonômica do gênero *Cichla* descreve nove novas espécies: *Cichla kelberi*, *Cichla pleiozona*, *Cichla mirinae*, *Cichla melaniae*, *Cichla piquiti*, *Cichla thyrorus*, *Cichla jarina*, *Cichla pinima*, *Cichla vazzoleri*, assim ficou estabelecido 15 espécies para o gênero.

Entre os peixes alóctones, introduzidos em diversas bacias hidrográficas do Brasil, o Tucunaré, destaca-se devido ao impacto ambiental gerado por suas características de predador, pois é considerado agressivo e não desiste facilmente de sua presa (AGOSTINHO; JÚLIO JR, 1999; CHELLAPPA et al., 2003; KOVALENKO et al., 2010).

Considerando os impactos ambientais causados ao introduzir espécies desse grupo, faz-se necessário o entendimento taxonômico, com o uso de abordagens moleculares que colaboram para distinguir ou identificar espécies desconhecidas ou morfologicamente semelhantes (LUZ, 2016).



Devido às problemáticas em que o gênero está envolvido, tais como a identificação errônea das espécies do gênero, faz-se necessários estudos capazes de caracterizar e identificar espécies de peixe que são cultivadas ou simplesmente que alteram ambientes naturais; e, dentre as ferramentas utilizadas neste tipo de estudo está a genética molecular (MOURÃO, 2013).

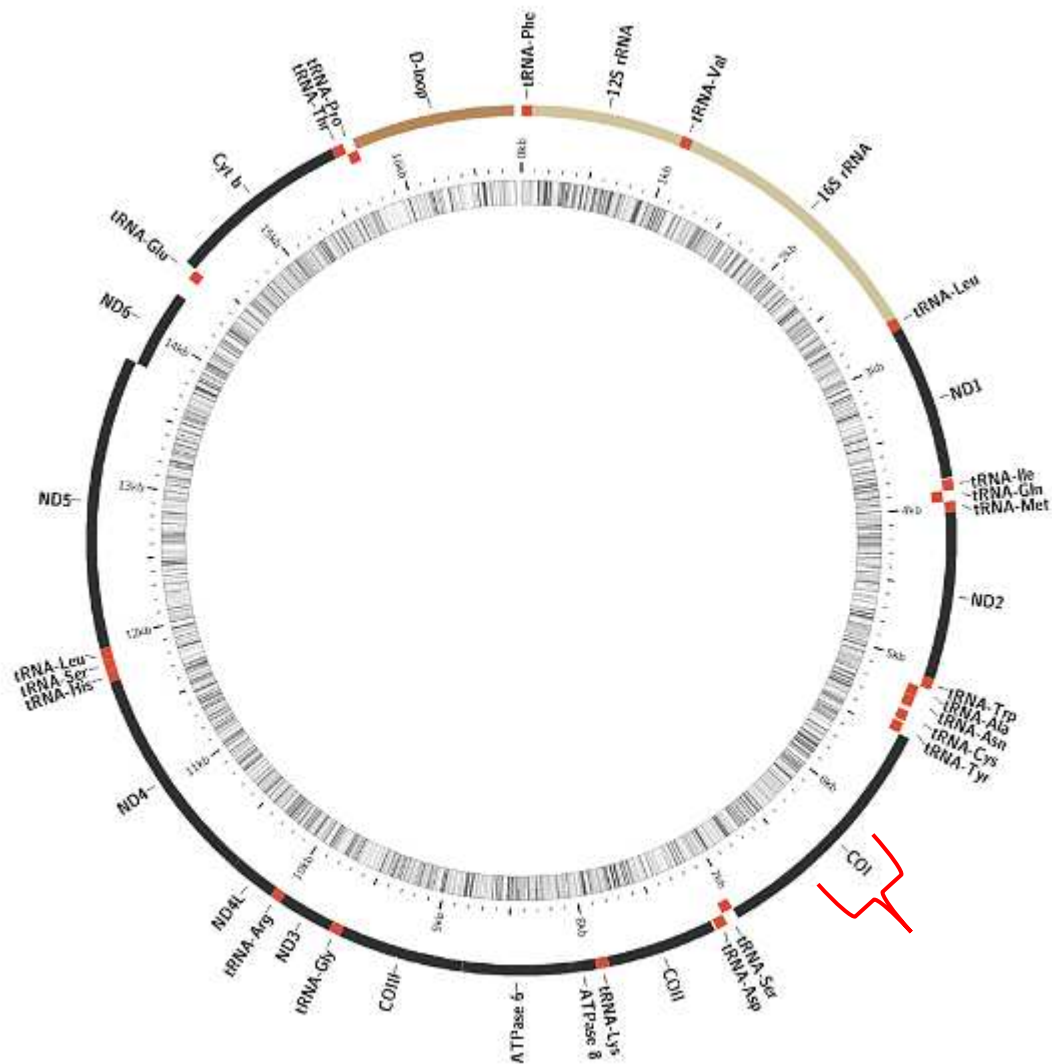
## **2. DNA *barcoding* e modelos de delimitação de espécies**

Ferramentas moleculares têm sido cada vez mais empregadas na caracterização e diferenciação de espécies filogeneticamente próximas, especialmente para identificar ou distinguir espécies morfológicamente semelhante (crípticas) e desconhecidas, ou mesmo quando acontece hibridação entre espécies simpátricas (PADIAL et al., 2010; PONZETTO, 2012; ROSSO et al., 2012). Dentre os marcadores mitocondriais, o Citocromo Oxidase Subunidade I (COI), também conhecido como DNA *barcoding*, é constituído de um fragmento com cerca de 650 pares de bases com polimorfismo intraespecífico muito menor que o interespecífico, o que permite discriminar as espécies, como ocorre com o código de barras (HERBET et al., 2003; HUBERT et al., 2008) (Figura 1).

Este marcador corresponde a uma região codificante bastante conservada dentro da espécie sendo parte de uma enzima terminal da cadeia respiratória da mitocôndria que vem sendo utilizado devido a eficiência demonstrada na identificação de várias espécies de peixes marinhos e de água doce com uma taxa de sucesso de mais de 90% (PEREIRA et al., 2013).

O emprego de um único gene (COI), no apoio a taxonomia de espécies foi proposto por Hebert et al. (2003), para servir como o código de barras universal para todas as espécies animais através da criação do “Consortium for the Barcode of Life” (CBOL - [www.barcoding.si.edu](http://www.barcoding.si.edu)). A identificação molecular de peixes por DNA *barcoding* já comprovou ser eficaz, com precisão chegou a distinguir peixes marinhos e ornamentais australianos e ainda do Sudeste e Sul do Brasil (WARD et al., 2005; STEINKE et al., 2009; RIBEIRO, 2012), além de 200 espécies de peixes de água doce da região Neotropical, inclusive discriminando espécies estreitamente relacionadas, como no caso das espécies *Cichla piquiti*, *Cichla monoculus* e *Cichla kelberi* (PEREIRA et al., 2013). Para o gênero *Cichla* esta técnica molecular foi usada para a caracterização genética das espécies *Cichla piquiti* e *Cichla kelberi* provenientes dos rios Paraná (PR) e Tietê (SP) e seus prováveis híbridos (MOURÃO, 2013) e na discriminação dos peixes da bacia do rio Paraná (PR) (PEREIRA et al., 2013).

**Figura 1:** Genoma mitocondrial de peixes. Em vermelho evidenciando a região do Citocromo Oxidase Subunidade I (COI).



**Fonte:** <http://www.ifsj.edu.br/recgenlab/>

O uso do DNA *barcoding* tem sido cada vez mais evidenciado para delimitação e resolução de complexos de espécies, contudo, estratégias mais refinadas com o gene COI estão sendo empregadas para a identificação de OTUs (*Operational Taxonomic Unit*), destacando-se os modelos que incluem ferramentas bioestatísticas e algorítmicas, como o *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABGD), *Assemble species by automatic partitioning* (ASAP) e o *Poisson Tree Process* (PTP) (PUILLANDRE et al., 2020).

O modelo ABGD foi proposto para encontrar automaticamente a distância onde os *barcode gaps* estão localizados, utilizando como entrada um banco de dados com sequências alinhadas, a hipótese primária de espécie é definida após a suposição da existência de uma

lacuna para os valores de distância dentro e entre grupos de indivíduos, após sucessivos testes de agrupamento e limiares (PUILLANDRE et al., 2012).

ASAP é um método de implementação de um algoritmo de agrupamento hierárquico que usa exclusivamente distâncias genéticas pareadas, direcionando a carga computacional da reconstrução filogenética. Deste modo, o ASAP sugere partições de espécies classificadas por um novo sistema de pontuação que não use uma visão biológica previa da diversidade intraespecífica. Diante disto, o ASAP tem potencial de interface gráfica exploratória completa no processo de taxonomia integrativa (PUILLANDRE et al., 2020).

Entre os métodos de delimitação de espécies que respondem por processos filogenéticos-coalescentes, e que são baseados em locus único, tem-se o General Mixed Yule Coalescent (GMYC) um dos algoritmos mais populares que estima os limites entre espécies a partir de sequências de DNA (SILVA, 2018). Esse método identifica em uma árvore filogenética os padrões dos ramos como uma transição entre fenômenos de coalescência e de especiação de linhagens que tem evoluído independentemente, examinando os maiores valores de verossimilhança em cada transição (FUJISAWA; BARRACLOUGH, 2013). O GMYC múltiplo é uma implementação que inclui o uso de múltiplos limiares temporais recriando a suposição de limite único que eventos de especiação são mais antigos do que todos os eventos coalescentes na árvore genética, diferindo processos coalescentes e de diversificação interespecífica em uma filogenia (MONAGHAN et al., 2009; FUJISAWA; BARRACLOUGH, 2013).

No PTP, a diversificação no processo de especiação é obtida considerando o número de substituições de nucleotídeos (no lugar do tempo como no GMYC) em um determinado ramo, em princípio o número de substituições parece ser maior entre espécies do que dentro de espécies (ZHANG et al., 2013). Em uma nova implementação do PTP (procedimento de árvore de Poisson multi-taxa esses, mPTP), os distintos valores de divergência intraespecífica causadas por diferenças no processo evolutivo são contabilizados, e devem conferir mais credibilidade às espécies delimitação (KAPLI et al., 2017).

### **3. OBJETIVO**

A utilização do DNA *barcoding* em conjunto com os métodos aqui apresentados aumenta a eficácia de identificação e delimitação das espécies de peixes das bacias Maranhenses e Tocantina. Diante disto, este trabalho tem como objetivo identificar em nível molecular, as espécies de tucunaré introduzidas nas bacias maranhenses/afluentes e rio Tocantins. As informações advindas desta pesquisa poderão dar suporte para uma avaliação do

estado atual do status taxonômico dos tucunarés que fazem parte da comunidade e elaborar práticas de manejo e estudos de ecologia mais adequados às espécies do gênero.

## REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO JR, HORÁCIO F. Peixes da bacia do alto rio Paraná. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**, p. 374-400, 1999.

CHELLAPPA, S.; CÂMARA, M. R.; CHELLAPPA, N. T. Ecology of *Cichla monoculus* (Osteichthyes: Cichlidae) from a reservoir in the semi-arid region of Brazil. **Hydrobiologia**, v. 504, n. 1-3, p. 267-273, 2003.

FUJISAWA, T.; BARRACLOUGH, T. G. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulated datasets. **Systematic Biology**. 44:1–49. 2013.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; WARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 270, p. 313-321. 2003.

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 barcodes. **PloS One** [www.plosone.org](http://www.plosone.org). v. 3, p. 2490, 2008.

JEPSEN, D. B.; WINEMILLER, K. O.; TAPHORN, D. C. Temporal patterns of resource partitioning among *Cichla* species in a Venezuelan blackwater river. **Journal Fish Biology** 51:1085-1108, 1997.

KAPLI, P.; LUTTEROPP, S.; ZHANG, J.; KOBERT, K.; PAVLIDIS, P.; STAMATAKIS, A.; FLOURI, T. Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. **Bioinformatics**. 33:1630–1638. 2017.

KOVALENKO, K. E.; DIBBLE, E. D.; AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M. Recognition of non-native peacock bass, *Cichla kelberi* by native prey: testing the naiveté hypothesis. **Biological Invasions**, v. 12, n. 9, p. 3071-3080, 2010.

KULLANDER, S.O. Cichlid Fishes of the Amazon River drainage of Peru. **Swedish Museum of Natural History**. Springer, Berlin, 1-431, Pls. 1-38. 1986.

KULLANDER, S.O.; NIJSSEN, H. The Cichlids of Suriname. Brill, Leiden, **Netherlands**. 1989.

KULLANDER, S. O.; FERREIRA, E. J. G. A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with description of nine new species (Teleostei: Cichlidae). **Ichthyology Exploration Freshwaters**. 17(4):289A398, 2006.

LAYMAN, C. A.; WINEMILLER, O. Size-based responses of prey to piscivore exclusion in a species-rich Neotropical River. **Ecology**, 85 pp. 1311-1320, 2004.

LUZ, S. C. S. **Identificação molecular e biologia reprodutiva do *Cichla* e suas interações morfológicas**. Tese de Doutorado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2016.

MONAGHAN, M. T.; WILD, R.; ELLIOT, M.; FUJISAWA, T.; BALKE, M.; INWARD, D. J. G. Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. **Systematic Biology**, 58:298-311. 2009.

MOURÃO, A. A. F. **Caracterização citogenética e molecular das espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* e seu possível híbrido interespecífico, coletados em ambientes naturais/ Botucatu**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2013.

NELSON, J. S. Fishes of the world. New York: **John Wiley & Sons**, Inc., 600p. 1994.

PADIAL, J. M.; MIRALLES, A.; DE LA RIVA, I.; VENCES, M. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology**, 7: 1-14, 16, 2010.

PEREIRA, L. H. G.; MAIA, G. M. G.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse neotropical freshwater fish fauna? **Biomed center Genetics**, vol. 14, n. 20, p. 1471-2156, 2013.

PONZETTO, J. Me. **Relações filogenéticas e filogeografia molecular das espécies de peixes anuais do gênero *Simpsonichthys* (Cyprinodontiformes: Rivulidae)**. 2012. 63 f. Dissertação - (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2012.

PULLANDRE, N.; LAMBERT, A.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. “*ABGD*, Automatic Barcode Gap Discovery for Primary Species Delimitation.” **Molecular Ecology** 21(8):1864–77, 2012.

PULLANDRE, N.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. ASAP: assemble species by automatic partitioning. **Molecular Ecology Resources**, 21, 609–620, 2020.

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

ROSSO, J. J.; MABRAGAÑA, E.; GONZÁLEZ CASTRO, M.; DÍAZ DE ASTARLOA, J. M. DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. **Molecular Ecology Resources**. 12, 999–1011. 2012.

SILVA, R.; PELOSO, P. L. V.; STURARO, M. J.; VENEZA, I.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H.; GOMES, G. Comparative analyses of species delimitation methods with molecular data in snappers (Perciformes: Lutjaninae). **Mitochondrial DNA Part A**, 29 (7), 1108–1114. 2018.

STAECK, W.; LINKE, H. Large Cichlids: American Cichlids II, A Handbook for their identification, care and breeding. **Tetra-Verlag**. Melle, Germany, 216p, 1985.

STEINKE, D.; ZEMLAK, T. S.; BOUTILLIER, J. A.; HEBERT, P. D. N. DNA barcoding of Pacific Canada's fishes. **Marine Biology**. v. 156, p. 2641-2647. 2009.

TEIXEIRA, A. S.; OLIVEIRA, S. D. S. Evidence for a natural hybrid of peacock bass (*Cichla monoculus* vs *Cichla temensis*) based on esterase electrophoretic patterns. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 1, p. 74-83, 2005.

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.

WINEMILLER, K. O., TAPHORN, D. C., BARBARINO-DUQUE, A. Ecology of *Cichla* (Cichlidae) in two blackwater rivers of southern Venezuela. **Copeia**, 1997, 690–696, 1997.

WINEMILLER, K.O. Ecology of peacock cichlids (*Cichla* spp.) in Venezuela. *J. Aquaric. Aquatic Science: Cichlid Research: State of the Art IX*, 93–112. 2001.

ZHANG, J.; PASCHALIA, K.; PAVLOS P.; ALEXANDROS, S. “A General Species Delimitation Method with Applications to Phylogenetic Placements.” **Bioinformatics** 29(22):2869–76. 2013.

**CAPÍTULO 2: IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE TUCUNARÉS (CICHLIDAE,  
PERCIFORMES) INTRODUZIDOS EM BACIAS HIDROGRÁFICAS  
MARANHENSES ATRAVÉS DO DNA MITOCONDRIAL**

**<https://doi.org/10.29327/530100>**

**Capítulo publicado no livro “Coletânea Estudos Ambientais e Agronômicos: resultados  
para o Brasil / Camila Pinheiro Nobre e Anna Christina Sanazario de Oliveira (Org).**

**São Luís – Editora Pascal, 2021.**

**ISBN 978-65-86707-43-4**



PHONE:  
+55 98 988348752



EMAIL:  
contato@editorapascal.com.br


[INÍCIO](#)
[A EDITORA](#)
[CATÁLOGO](#)
[SUBMISSÃO](#)
[ISBN](#)
[DÚVIDAS](#)
[CONTATOS](#)
[LOGIN](#)





## CAPÍTULO 6

# **IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE TUCUNARÉS (CICHLIDAE, PERCIFORMES) INTRODUZIDOS EM BACIAS HIDROGRÁFICAS MARANHENSES ATRAVÉS DO DNA MITOCONDRIAL**

MOLECULAR IDENTIFICATION OF TUCUNARÉS (CICHLIDAE,  
PERCIFORMES) INTRODUCED IN MARANHENSES HYDROGRAPHIC  
BASINS THROUGH MITOCHONDRIAL DNA

**Marcelo Silva de Almeida**

**Francisca Karoline Marinho Ferreira**

**Maria Claudene Barros**

**Elmary da Costa Fraga**

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo identificar espécimes de tucunaré introduzidos em bacias hidrográficas maranhenses inferindo quanto à origem dos estoques. Foram coletados 20 espécimes, as coletas foram realizadas utilizando apetrechos de pesca nos rios Flores e Pindaré, o DNA total foi extraído utilizando o kit Promega. Isolamos e amplificamos o gene (COI), por meio da PCR, os produtos da PCR foram purificados e posteriormente sequenciados em sequenciador automático de DNA. A edição, alinhamento e análise dos dados foram realizados a partir dos programas BioEdit, MEGA X e utilizou-se a plataforma BOLDSystems para identificação das sequências de DNA barcoding. Um fragmento de 640 pb foi obtido para o gene COI. Foi gerada uma árvore através da abordagem de agrupamentos de vizinhos (NJ) utilizando o modelo de Kimura-2-Parâmetros (K2P), revelando três clados fortemente suportados com alto índice de *bootstrap*. As médias de divergências genéticas interespecífica variaram de 13,6 a 56,9%, enquanto que a média intraespecífica foi de 0,1%. As sequências obtidas foram submetidas na plataforma BOLD Systems v3 a fim de se obter a identificação a partir da comparação com sequências presentes neste sistema. Os espécimes de *Cichla* sp. obtiveram 98,57% de similaridade com *Cichla kelberi*. Portanto, o fragmento do gene COI se mostrou uma ferramenta útil para a identificação biológica em nível específico em peixes dos rios Flores e Pindaré/MA.

**Palavras chave:** Dna mitocondrial, Biodiversidade, Ictiofauna.

## ABSTRACT

The present study aimed to identify specimens of tucunaré introduced in Maranhão watersheds, inferring as to the origin of the stocks. Twenty specimens were collected, collections were made using fishing equipment in the Flores and Pindaré rivers, the total DNA was extracted using the Promega kit. We isolated and amplified the gene (COI), by means of PCR, the PCR products were purified and subsequently sequenced in an automatic DNA sequencer. Data editing, alignment and analysis were performed using the BioEdit, MEGA X programs and the BOLDSystems platform was used to identify DNA barcoding sequences. A 640 bp fragment was obtained for the COI gene. A tree was generated through the approach of groupings of neighbors (NJ) using the Kimura-2-Parameters (K2P) model, revealing three highly supported clades with a high bootstrap index. The means of interspecific genetic divergences ranged from 13.6 to 56.9%, while the intraspecific average was 0.1%. The obtained sequences were submitted in the BOLD Systems v3 platform in order to obtain the identification from the comparison with sequences present in this system. The specimens of *Cichla* sp. obtained 98.57% similarity with *Cichla kelberi*. Therefore, the fragment of the COI gene proved to be a useful tool for biological identification at a specific level in fish from the Flores and Pindaré/MA rivers.

**Keywords:** Dna mitochondrial, Biodiversity, Ichthyofauna.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a introdução de peixes tem sido realizada principalmente para peixamentos e aumento da produção pesqueira de reservatórios (CRIVELLI, 1995). Essa atividade representa a segunda maior ameaça à biodiversidade (SIMBERLOFF, 2003; CLAVERO; GÁRCIA-BERTHOU, 2005) e tem como consequência o surgimento de problemas relacionados ao registro desses organismos em ambiente não nativo dificultando a correta caracterização das espécies (NASCIMENTO et al., 2001).

Espécies do gênero *Cichla*, conhecidas vulgarmente como tucunarés (NELSON, 1994) são originárias de bacias do rio Amazonas, Tocantins e Orinoco, sendo também introduzidas em diversos rios e reservatórios. O grande porte e elevado valor comercial caracteriza o tucunaré como um dos recursos pesqueiros mais importantes e principal exemplo de introdução indiscriminada de grupos de peixes no Brasil (NELSON, 1994; PARANARI-ANTUNES et al., 2012; CARVALHO et al., 2014). Alguns trabalhos têm avaliado os efeitos da introdução de *Cichla* em comunidades nativas como Zaret; Paine (1973) e Gomiero et al. (2010) que relataram o desaparecimento de várias espécies de peixe com a dispersão de *Cichla ocellaris* no rio Chagres/Panamá e em lagos do Vale do Rio Doce/Minas Gerais. Pinto-Coelho et al. (2008) e Pompeu; Godinho (2003) mostraram que espécies de *Cichla* provocaram drástica redução da ictiofauna em lagos do Parque Estadual do Rio Doce e rio São Francisco. No entanto, o tucunaré continua a ser introduzido em diversos reservatórios e rios do Brasil (AGOSTINHO et al., 2007; PELICICE; AGOSTINHO, 2008).

O tucunaré-amarelo *Cichla kelberi* (KULLANDER & FERREIRA, 2006), se diferencia morfológicamente das demais espécies do gênero pela presença de pequenas manchas de luz sobre as barbatanas pélvicas e anal e lobo inferior da nadadeira caudal, presença de três barras verticais escuras no lado do corpo. Esta espécie é nativa da bacia do rio Tocantins e têm sido introduzidas com sucesso para aumento da produção pesqueira em rios, lagos e reservatórios (CHELLAPPA et al., 2003), sobretudo nas regiões Nordeste e Sudeste (KULLANDER & FERREIRA, 2006), porém pouco se sabe sobre a sua identidade taxonômica, número de espécimes e diversidade genética das populações.

Apesar do grande sucesso evolutivo, não se sabe ao certo os efeitos da introdução sobre a estrutura genética de populações de *Cichla kelberi*, que em teoria, segundo Ellstrand; Elam (1993) tenderia a homogeneizá-las geneticamente e diminuir a variabilidade genética, levando à endogamia, perda de heterozigosidade e consequentemente de adaptabilidade.

A introdução intencional ou acidental de espécies resulta, muitas vezes, em seu estabelecimento fora dos locais de origem (COHEN; CARLTON, 1995). Segundo Pivello (2011), o fato das espécies invasoras serem altamente eficientes na competição por recursos, terem alta capacidade reprodutiva e de dispersão, faz com que dominem os ambientes em que são introduzidas. Estudos como esse podem revelar a dominância de habitat dos tucunarés provavelmente devido à sua voracidade, prolificidade e adaptação a ambientes lênticos, características que fazem com que a espécie se torne potencialmente invasora.

Diante disso, estudos utilizando marcadores moleculares a partir da análise de DNA mitocondrial (mtDNA) têm sido realizados visando solucionar problemáticas taxonômicas de espécies como as pertencentes ao gênero *Cichla*. Dentre os marcadores mitocondriais, o Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) também conhecido como DNA *barcoding*, que é constituído de um fragmento com cerca de 645 pares de base (HERBET et al., 2003; HUBERT et al., 2008) que vem sendo utilizado devida a eficiência demonstrada pela identificação de várias espécies de peixes marinhos e de água doce com uma taxa de sucesso de mais de 90% (PEREIRA et al., 2013).

Devido às problemáticas em que o gênero está envolvido, tais como a identificação errônea das espécies, tornam-se necessários estudos que proporcionem ferramentas capazes de caracterizar e identificar espécies de peixe que são cultivadas ou simplesmente que alteram ambientes naturais. E, dentre as ferramentas utilizadas neste tipo de estudo está a genética molecular. Dessa forma, os estudos genéticos de populações de *Cichla* (tucunaré) introduzidas nas bacias maranhenses/ afluentes são de grande valia do ponto de vista ecológico por fornecerem dados que poderão auxiliar para uma melhor caracterização taxonômica e vir a orientar práticas de manejo e estudos de ecologia mais adequados das espécies do gênero.

Portanto, a presente proposta visa identificar e caracterizar espécies do gênero *Cichla* introduzidas nas bacias maranhenses, dessa forma buscando contribuir com o conhecimento dos estoques de tucunaré introduzido em bacias hidrográficas maranhenses.

## **2 METODOLOGIA**

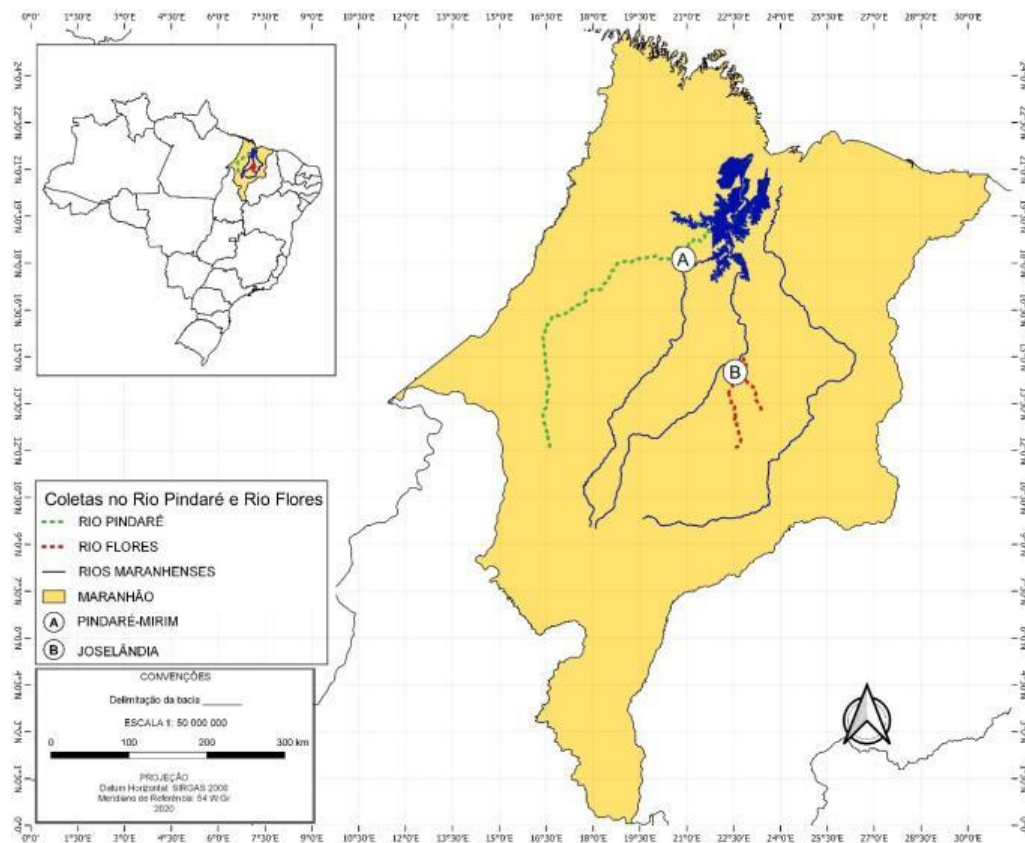
### **2.1 Área de estudo e obtenção das amostras**

Amostras de Tucunaré foram obtidas no rio Pindaré no município de Pindaré-Mirim e no rio Flores afluente do rio Mearim no município de Josêlandia/MA. O rio Pindaré situa-se entre as coordenadas 3°39'54"S e 45°25'31"W, principal afluente do rio Mearim, nasce nas

elevações que formam o divisor entre as bacias Mearim e Tocantins, com aproximadamente 686 Km<sup>2</sup>, sendo navegável no trecho compreendido entre a sua foz no Km 41 do rio Mearim até a foz do rio Buriticupu no Km 456 (STELLA, 2011).

Amostras do rio Flores foram coletadas na cidade de Josélandia, nas coordenadas geográficas latitude 05°05'508"S, longitude 044°39'811"W e com altitude de 68m. Os cursos d'água da região fazem parte da bacia hidrográfica do Mearim (IMESC 2008). O rio Flores compõe o alto Mearim, estende-se desde as nascentes à sua foz, afluente pela margem direita, com uma extensão aproximada de 400 km (LOPES et al., 2011) (Figura 1).

**Figura 1.** Localização dos rios Flores e Pindaré/MA onde foram obtidos os espécimes.



Fonte: Adaptado por Teixeira (2020) no programa Quantum GIS 2.6.0.

## 2. 2 Coleta do Material

As amostras foram coletadas utilizando-se instrumentos de pesca como redes de malhadeiras e tarrafas de diferentes milímetros (10 a 200 mm), estas coletas foram devidamente autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade e Conservação (ICMBIO) (ICMBIO n°. 46367-1 - Rio Pindaré e ICMBIO - MMA n° 42.119-2 - Rio Mearim).

Os espécimes coletados foram acondicionados em sacos plásticos e transportados em gelo dentro de isopor ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular (GENBIMOL) do

Centro de Estudos Superiores de Caxias da Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA. Os peixes coletados passaram por uma triagem: foram etiquetados, fotografados e amostras do tecido muscular foram retirados para análises moleculares.

Os tecidos foram preservados em álcool 80% e mantidos sob refrigeração a -20°C. Os exemplares foram fixados em formalina 10% e conservados em álcool 70%. A identificação taxonômica foi realizada com o auxílio de literatura específica (KULLANDER & FERREIRA, 2006) e confirmada por especialista. Exemplares testemunhos de *Cichla kelberi* estão depositados na Universidade Estadual de Londrina – MZUEL no Paraná. Os espécimes se encontram depositados no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do CESC/UEMA.

### 2.3 Procedimentos genéticos

O DNA total foi extraído usando o kit Wizard Genomic DNA Purification da Promega seguindo as instruções do fabricante. O isolamento e amplificação das regiões genômicas COI foi realizado através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando-se primers específicos para cada gene, para o gene COI: COI Fish F2: ‘5-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC -3’; e COI Fish R2: ‘ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA -3’ como descrito por (WARD et al., 2005).

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit ExoSap-IT® (USB Corporation) seguindo instruções dos fabricantes. Os produtos das PCRs purificados foram utilizados em uma reação de sequenciamento utilizando-se o Kit “Big Dye TM Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems). Após a precipitação os produtos foram submetidos à eletroforese em um sequenciador automático de DNA (ABI 3500).

### 2.4 Análises dos Dados

As sequências obtidas foram alinhadas e editadas manualmente no programa Bioedit (HALL, 1999). As análises filogenéticas foram realizadas através dos métodos de análise de agrupamento de vizinhos (NJ) e máxima verossimilhança (ML) usando o programa MEGA X (KUMAR et al., 2018), ambas usando, o modelo evolutivo de substituição nucleotídica Kimura-2 parâmetros (KIMURA, 1980), com 1000 réplicas de *bootstrap*. FELSENSTEIN, 1985). As médias de distâncias genéticas foram geradas no programa MEGA X, utilizando o modelo Kimura-2-Parâmetros (K2P). Foram utilizadas como grupo externo sequências para o gene COI *Cichla monoculus* (JN988799.1) e *Cichla* sp. (JN988806.1).

A identificação molecular a partir do gene COI foi realizada por comparação das sequências obtidas com dados disponíveis na plataforma bioinformática BOLD Systems (Barcode of Life Data Systems) (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados 20 espécimes de Tucunaré, pertencentes à ordem Perciformes, a família Cichlidae, gênero *Cichla*. 15 espécimes foram coletados no rio Flores e 5 no rio Pindaré/MA (Tabela 1).

ORDEM	FAMÍLIA	GÊNERO	ESPÉCIES	RIO	
				Flores	Pindaré
PERCIFORMES	Cichlidae	<i>Cichla</i>	<i>Cichla</i> sp.	15	05

**Tabela 1** - Relação dos táxons coletados nos rios Flores e Pindaré/MA.  
Fonte: Dados do autor (2020)

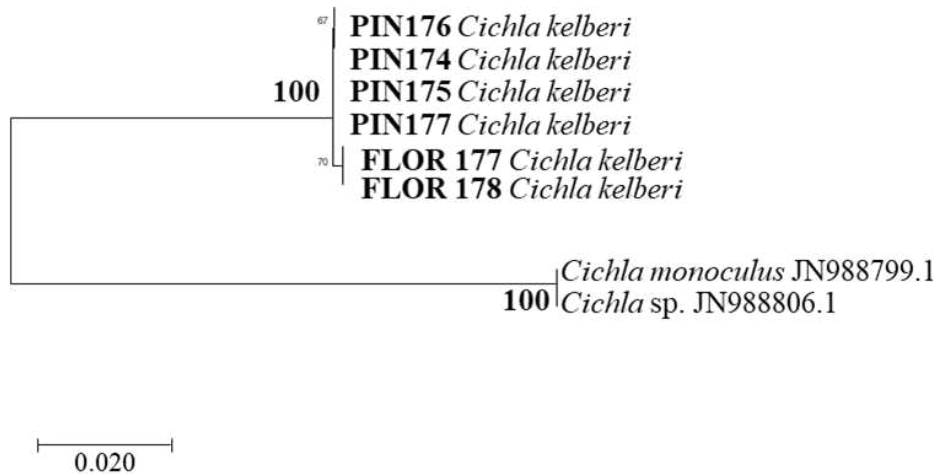
#### 3.1 Análise do Fragmento e Composição Nucleotídica

Após alinhamento e edição foi obtido um fragmento 640 pares de bases (pb) para o gene mitocondrial COI de oito espécimes do gênero *Cichla*, sendo quatro oriundas do rio Pindaré, duas do rio Flores e duas sequências obtidas do GenBank. Destes 436 sítios conservados e 193 mostraram-se variáveis. A maioria destes sítios variáveis, cerca de 90% deles (172) foram encontrados na posição três do códon. Este padrão é esperado para o gene COI devido sua natureza altamente conservada, por ser um gene codificador de proteínas, contudo apresentando uma alta taxa de evolução, ou seja, substituições sinônimas de nucleotídeos na posição três do códon o que não modifica a informação genética contida no fragmento.

A composição média de nucleotídeos foi de 29,3% para timina (T), 29,2% para citosina (C), 23,7% para adenina (A) e 17,8% para guanina (G). Estes valores estão dentro do esperado para gene mitocondrial; Henrique (2015) em estudos com DNA Barcode com os peixes dos rios Ribeira de Iguape e de rios costeiros do estado de São Paulo, encontrou maior porcentagem de T e C, assim como Ward et al. (2008).

### 3.2 Relações Filogenéticas e Distância Genética

A árvore filogenética baseada no método de agrupamento de vizinhos (NJ), modelo Kimura-2-Parâmetros (K2P), revelou que os indivíduos considerados pertencentes à mesma espécie se agruparam em conjuntos coerentes com valores de 100% *bootstrap*, por tanto revelando a formação de clados fortemente suportados (Figura 2).



**Figura 2.** Árvore filogenética gerada a partir de Agrupamentos de Vizinhos utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) para o gene COI. Os números dos nós representam os valores de *bootstrap* (1000 pseudoréplicas). **PIN** – Pindaré é **Flor** – Flores  
Fonte: Dados do autor (2020)

Os índices de divergência genética intraespecífica que se obteve neste trabalho foram de 0,1%, e a interespecífica de 13,6 a 56,9% (Tabela 2). O sucesso da identificação de espécies usando o código de barras (DNA barcode) é fundamentado na diferença entre as divergências intra e interespecífica (HEBERT et al., 2003).

Espécies	Divergência Genética			
	1	2	3	4
1. <i>Cichla</i> sp. Pindaré	0,1			
2. <i>Cichla</i> sp. Flores	0,6	0,6		
3. <i>Cichla monoculus</i>	56,9	55,6	NC	
4. <i>Cichla piquiti</i>	55,9	55,6	13,6	NC

**Tabela 2** - Percentual das médias de divergência nucleotídica interespecífica e intraespecífica, gerada no programa MEGA X baseada no gene COI. NC – Não calculado  
Fonte: Dados do autor (2020)



### 3. 3 Identificação Molecular (BOLD SYSTEMS v3)

Os fragmentos do gene COI obtidos foram submetidos na plataforma BOLD Systems (*Barcode of Life Data Systems*) com a finalidade de se obter a identificação molecular a partir da comparação com sequências depositadas nesse sistema. Considerando a divergência de 3% como valor limite para determinar espécies em pesquisas com DNA *barcoding* (CARVALHO et al, 2011; MABRAGAÑA et al., 2011; PEREIRA et al., 2011).

Os espécimes *Cichla* sp. apresentaram similaridade consistente de 98,57% com *Cichla kelberi* (KULLANDER & FERREIRA, 2006) (Tabela 3).

Morfológica	Molecular	Similaridade (%)
<i>Cichla</i> sp. Pindaré	<i>Cichla kelberi</i>	98,57%
<i>Cichla</i> sp. Pindaré	<i>Cichla kelberi</i>	98,57%
<i>Cichla</i> sp. Pindaré	<i>Cichla kelberi</i>	98,57%
<i>Cichla</i> sp. Pindaré	<i>Cichla kelberi</i>	98,57%
<i>Cichla</i> sp. Flores	<i>Cichla kelberi</i>	98,57%
<i>Cichla</i> sp. Flores	<i>Cichla kelberi</i>	98,57%

**Tabela 3** - Comparações de fragmentos do gene COI dos táxons do rio Flores e Pindaré na plataforma BOLD Systems. Fonte: Dados do autor (2020)

Não existem registros dessa espécie em trabalhos anteriores realizados no Maranhão (BARROS et al., 2011; RAMOS et al., 2014; MATAVELLI et al., 2015; MELO et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2016; BRITO et al., 2019; LIMA et al., 2019, TEIXEIRA et al., 2019; GUIMARÃES et al., 2020). Ocorrendo sua distribuição na América do Sul e bacias hidrográficas amazônicas (FISHBASE, 2020). Apontando a possibilidade da ocorrência dessa espécie para o rio Flores e Pindaré/MA que possui características amazônicas (PIORSKI, 2010), está espécie se constitui, como possível novo registro para o Maranhão.

Cogita-se que a introdução dessa espécie ocorreu acidentalmente em períodos chuvosos, quando os açudes aumentam o volume de suas águas e transbordam se comunicando com os canais do Rio Pindaré, pois é muito comum a construção de açudes para a criação de peixes nessa região. Por ser uma espécie predadora, seu desenvolvimento pode afetar diretamente as espécies endêmicas da região (CASTRO; DOURADO, 2011).

#### 4. CONCLUSÃO

Foram obtidas e analisadas cinco sequências para o gene COI pertencente ao rio Pindaré e Flores. Os exemplares identificados como coespecíficos foram agrupados em conjuntos coerentes confirmando status específico conforme identificação morfológica.

As médias de divergência intraespecíficas foram baixas, onde permitiram estabelecer o status específico para as espécies com base nessa divergência. Os espécimes *Cichla* sp. antes identificados morfológicamente em nível genérico foram confirmados através da técnica de DNA *barcoding* como *Cichla kelberi* (Kullander & Ferreira, 2006), caracterizando-se como um novo registro da espécie para o Maranhão.

#### REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. Maringá: **EDUEM**. 2007.
- 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, n. 2, 2011.
- BRITO, P. S.; GUIMARÃES, E. C.; FERREIRA, B. R. A.; OTTONI, F. P.; PIORSKI, N. M. Freshwater fishes of the Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses and adjacent areas. **Biota Neotropica**. 19 (3): e20180660. 2019.
- 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.; OLIVEIRA, D. A. A.; SAMPAIO, I.; BEHEREGARAY, L. B. Analysis of propagule pressure and genetic diversity in the invasibility of a freshwater apex predator: the peacock bass (genus *Cichla*). *Neotropical Ichthyology*, 12, 105-116. 2014.
- CASTRO, A. C. L.; DOURADO, E. C. S. Ictiofauna da Amazônia Oriental Brasileira: um panorama das regiões maranhenses. In: Martins, M. B.; Oliveira, T. G. (Org.) **Amazônia Maranhense: Diversidade e Conservação**. Belém: MPEG, 328 p, 2011.
- CHELLAPPA, S.; CÂMARA, M. R.; CHELLAPPA, N. T.; BEVERIDGE, M. C. M.; HUNTINGFORD, F. A. Reproductive ecology of a neotropical cichlid fish, *Cichla monoculus* (Osteichthyes: Cichlidae). *Brazilian Journal of Biology*, 63, 17-26. 2003.
- CLAVERO, M.; GARCÍA-BERTHO, E. Invasive species are a leading cause of animal extinctions. *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 110. 2005.

COHEN, A. N. E.; CARLTON, J. T. Biological study: non-indigenous aquatic species in a United States estuary: a case study of the Biological invasions of the San Francisco Bay and Delta. **US Fisheries and Wildlife and National Sea Grant College**. USA. 1995.

CRIVELLI, A. J. Are fish introductions a threat to endemic freshwater fishes at the Northern Mediterranean Region? *Biological Conservation*, 72, 311-319. 1995.

ELLSTRAND, N. C.; ELAM, D. R. Population genetic consequences of small population size: Implications for Plant Conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 24, 217-242. 1993.

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

FISHBASE; FROESE, R.; PAULY, D. (eds.) 2020. World Wide Web electronic publication. Disponível em [http: <www.fishbase.com>](http://www.fishbase.com), Version (01/2019). Consulta em dezembro de 2020.

GOMIERO, L. M.; CARMASSI, A. L.; RONDINELI, G. R.; VILLARES JR, G. A.; BRAGA, F. M. S. Growth and mortality of *Cichla* sp. (Perciformes, Cichlidae) introduced in Volta Grande Reservoir (Grande River) and in a small artificial lake in Southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 70, 1093-1101. 2010.

GUIMARÃES, E. C.; BRITO, P. S.; GONÇALVES, C. S.; OTTONI, F. P. An inventory of Ichthyofauna of the Pindaré River drainage, Mearim River basin, Northeastern Brazil. *Biota Neotropica*. 20 (4): e 20201023. 2020.

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.

HENRIQUES, J. M.; SILVA, G. J. C.; ASHIKAGA, F. Y.; HANNER, R.; FORESTI F. AND OLIVEIRA, C. Use of DNA barcode in the identification of fish species from Ribeira de Iguape Basin and coastal rivers from São Paulo State (Brazil). *De Gruyter Open*, v. 3, p.118–128, 2015.

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

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 barcodes. *PloS One* [www.plosone.org](http://www.plosone.org). v. 3, p. 2490, 2008.

INSTITUTO MARANHENSE DE ESTUDOS SOCIOECONÔMICOS E CARTOGRÁFICOS. Perfil do Maranhão 2006/2007. v.1. São Luis: IMESC, 2008.

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.

- KULLANDER, S. O.; FERREIRA, E. J. G. A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). *Ichthyological Exploration Freshwat*, 17, 289-398. 2006.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAR, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*. v. 35, p. 1547-1549, 2018.
- LIMA, R. C., ALMEIDA, M. S., BARROS, M. C.; FRAGA, E. Identificação e caracterização molecular de peixes da APA do Inhamum, Leste Maranhense, Brasil. In **Conceitos Básicos da Genética** (B.R. Silva Neto, Org.), Atena Editora, Ponta Grossa, p. 151-168. 2019.
- LOPES, F. J. B.; CORREIA FILHO, F. L.; GOMES, E. R.; NUNES, O. O. **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea: relatório diagnóstico do município de Josêlandia**. Teresina: Cprm – Serviço Geológico do Brasil, p. 39, 2011.
- MABRAGAÑA E; ASTARLOA J. M. D; HANNER R; ZHANG J; CASTRO MG. DNA Barcoding Identifies Argentine Fishes from Marine and Brackish Waters. *PLoS One*, 6: e 28655, 2011.
- MATAVELLI, R.; CAMPOS, A. M.; VALE, J.; PIORSKI, N. M.; POMPEU, P. S. Ichthyofauna sampled with tadpoles in northeastern Maranhão state, Brazil. **The journal of biodiversity data, Check List**, v. 14, p. 3 – 4, 2015.
- MELO, F. A. G.; BUCKUP, P. A.; RAMOS, T. P. A.; SOUZA, A. K. N.; SILVA, C. M. A.; COSTA, T. C.; TORRES, A. R. Fish fauna of the lower course of the Parnaíba River, northeastern Brazil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*. 38(4):363-400. 2016.
- NASCIMENTO, F. L.; CATELLA, A. C.; MORAES, A. E. Distribuição espacial do tucunaré, *Cichla* sp. (Pisces, Cichlidae), peixe amazônico introduzido no Pantanal, Brasil. Corumbá: Embrapa Pantanal. *Boletim de Pesquisa*, 24. 2001.
- 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, n. 3, 2016.
- NELSON, JS Fishes of the world. 3edition. John Wiley & Sons. **New York**, 600pp. 1994.
- PANARARI-ANTUNES, R. S.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A. P.; GOMES, V. N.; JÚLIO JR, H. F.; AGOSTINHO, C. S.; SILVA FILHO, J. P.; BONI, T. A.; PRIOLI, L. M. Genetic divergence among invasive and native populations of *Plagioscion squamosissimus* (Perciformes, Sciaenidae) in neotropical regions. *Journal of Fish Biology*, 80, 2434–2447. 2012.

PELICICE, F. M.; AGOSTINHO, A. A. Fish Fauna destruction after the introduction of a non-native predator (*Cichla kelberi*) in a Neotropical reservoir. *Biology Invasions*. 11, 1789-1801. 2008.

PEREIRA, L. H. G. **Identificação molecular de peixes da bacia do alto rio Paraná**. 2011. 180f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Área de Zoologia. - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2011.

PEREIRA, L. H. G.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *Bio Med Central Genetics*, v. 14, n.20, 2013.

PINTO-COELHO, R. M., BEZERRA-NETO, J. F.; MIRANDA, F.; MOTA, T. G.; RESCK, R.; SANTOS, A. M.; MAIA-BARBOSA, P. M.; MELLO, N.; MARQUES, M. M.; CAMPOS, M. O.; BARBOSA, F. The inverted trophic cascade in tropical plankton communities: Impacts of exotic fish in the Middle Rio Doce lake district, Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 68, 1025-1037. 2008.

PIORSKI, N. M. **Diversidade Genética e Filogeografia das Espécies *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) e *Prochilodus lacustres* Steindachner, 1907 no Nordeste do Brasil**. 2010. 152F. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Área de concentração: Genética e Evolução – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

PIVELLO, V. R. The use of fire in the cerrado and Amazonian rainforests of Brazil: past and present. *Fire Ecology*. 7:24–39. 2011.

POMPEU, P. S.; GODINHO, H. P. Ictiofauna de três lagoas marginais do médio São Francisco, In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (org.) *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas. 2003.

RAMOS, T. P. A. RAMOS, R. T. C. RAMOS S. A. Q. A. Ichthyofauna of the Parnaíba river Basin, Northeastern Brazil. *Biota Neotropical*, v. 14, p. 1-8. 2014.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes*, vol. 7, p. 355 – 364, 2007.

SIMBERLOFF, D. How much information on population biology is needed to manage introduced species? *Conservation Biology*, 17, 83-92. 2003.

STELLA, A. Síntese do diagnóstico, matriz do plano e contribuições do processo de consulta pública para elaboração do PPCD-MA. **Secretaria de Estado do Meio Ambiente**. Brasília, Distrito Federal, 2011.

TEIXEIRA, B. R. S., BARROS, M. C.; FRAGA, E. C. DNA barcoding confirma a ocorrência de espécies amazônicas na ictiofauna do rio Turiaçu, Maranhão/Brasil. **In Conceitos Básicos da Genética**. (B.R. Silva Neto, Org.). Atena Editora, Ponta Grossa, p. 98-110. 2019.

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. 360, n. 1462, p. 1847-1857, 2005.

ZARET, T. M.; PAINE, R. T. Species introduction in a tropical lake. *Science*, 182, 449-455. 1973.

**CAPÍTULO 3**  
**DNA *BARCODING* CONFIRMA A INTRODUÇÃO DE *Cichla monoculus* E *Cichla***  
***Kelberi* EM BACIAS HIDROGRÁFICAS MARANHENSES**

Artigo científico a ser encaminhado a revista

**Neotropical Ichthyology.**

**Fator de impacto 2.091**

Todas as normas de redação e citação, deste capítulo, atendem as estabelecidas pela referida revista. Apêndice

**DNA *BARCODING* CONFIRMA A INTRODUÇÃO DE *Cichla monoculus* E  
*Cichla kelberi* EM BACIAS HIDROGRÁFICAS MARANHENSES**

1 **Marcelo Silva de Almeida<sup>1\*</sup>, Amanda Caroline Cardoso e Silva<sup>2</sup>, Jordânia Leticia**  
2 **do Nascimento Silva<sup>2</sup>, Maria Histelle Sousa do Nascimento<sup>3</sup>, Renato Correia**  
3 **Lima<sup>4</sup>, Maria Claudene Barros<sup>2</sup>, Elmary da Costa Fraga<sup>5</sup>**

4 <sup>1</sup>Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Departamento de Química e Biologia,  
5 Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, São Luís,  
6 MA, Brasil

7 <sup>2</sup>Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Departamento de Química e Biologia,  
8 Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Ambiente e Saúde, Caxias, MA, Brasil

9 <sup>3</sup>Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Doutorado em Rede de Biodiversidade e  
10 Biotecnologia da Amazônia Legal – Bionorte

11 <sup>4</sup>Doutorado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva - Instituto Nacional de  
12 Pesquisas da Amazônia, INPA, Brasil.

13 <sup>5</sup>Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Doutor em Genética e Biologia  
14 Molecular pela Universidade Federal do Pará, Brasil  
15

16 **\* Correspondência:**

17 Marcelo Silva de Almeida  
18 almeidasp101@gmail.com  
19

20 **Resumo**

21 Espécies invasoras causam grande preocupação por alterar a estrutura das assembleias de peixes e até  
22 eliminar populações locais. O presente estudo teve como objetivo, identificar via DNA *barcoding* espécies  
23 do gênero *Cichla* introduzidas nas bacias maranhenses e rio Tocantins. Um total de 78 sequências foram  
24 obtidas para o gene COI, 37 sequências, correspondem para os 11 espécimes de *Cichla monoculus* do rio  
25 Flores, quatro sequências de *Cichla kelberi* do rio Pindaré, sete sequências de *Cichla piquiti* do rio  
26 Tocantins e 15 sequências de *Cichla* sp. do rio Parnaíba e 41 sequências foram provenientes do Genbank.  
27 Com média de divergência genética intraespecífica de 0% e interespecíficas de 6,78% a 44,75%. Os  
28 agrupamentos pelas reconstruções filogenéticas de Máxima verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana  
29 (BI) mostraram clados fortemente sustentados. Um total de seis haplótipos foram obtidos para os espécimes  
30 do gênero *Cichla*, com valores de diversidade haplotípica  $h= 0,726$  e nucleotídica  $\pi= 0,0479$ . Com  
31 similaridades variando de 99,13% a 100% foi possível confirmar a identificação morfológica com a  
32 informação molecular das espécies analisadas. Portanto, sugerimos que os espécimes de *C. kelberi* do rio  
33 Pindaré sejam provenientes de populações nativas da bacia do rio Tocantins e *C. monoculus* dos rios  
34 Mearim, Parnaíba e Alto Paraná por constituírem o mesmo haplótipo sejam provenientes de um mesmo  
35 estoque. É possível inferir também que *C. piquiti* do rio Paraná seja derivada de populações do rio  
36 Tocantins. Em conclusão, nosso estudo foi o primeiro a usar análises moleculares para validar a presença  
37 de *C. monoculus* como espécies invasoras em rios maranhenses bem como, confirma a introdução e registro  
38 de *C. kelberi* no rio Pindaré.  
39

40 **Palavras-chaves:** Biodiversidade, Predadores, Filogenéticas.  
41



## 42 INTRODUÇÃO

43 A introdução de peixes predadores é o principal motivo de ampla apreensão, à  
44 medida que diminuem ou reduzem as populações locais, alterando permanentemente a  
45 estrutura de assembleias de peixes (Sharpe *et al.*, 2017; Marshall, 2018). Espécies  
46 exóticas podem afetar espécies nativas pela competição por recursos, predação sobre a  
47 fauna nativa, introdução de novos patógenos, hibridação com espécies nativas ou  
48 alterando significativamente o habitat, podendo atuar simultaneamente com a degradação  
49 ambiental (Elvira; Almodóvar, 2011).

50 No entanto, a diversidade de peixes está sendo afetada em ecossistemas de água  
51 doce em todo o mundo, com impactos antrópicos e introdução de peixes não nativos  
52 atuando como os principais impulsionadores da perda de biodiversidade. Em geral, os  
53 peixes invasores afetam as interações ecológicas, a estrutura do habitat e os ciclos  
54 biogeoquímicos, perda de diversidade taxonômica e funcional em comunidades naturais  
55 (Cucherousset, Olden, 2011). Nos Neotrópicos, a invasão contínua de múltiplas espécies  
56 tem prejudicado a estrutura e funcionamento de ecossistemas de água doce e a diversidade  
57 de peixes ameaçada (Toussaint *et al.*, 2016; Pelicice *et al.*, 2017; Bezerra *et al.*, 2019).

58 Os peixes invasores causam grande preocupação, à medida que reduzem ou  
59 eliminam as populações locais, alterando permanentemente a estrutura das assembleias  
60 de peixes (Sharpe *et al.*, 2017; Marshall, 2018). No entanto, a compreensão de como as  
61 atividades humanas prejudicam as funções do ecossistema geradas pelas populações  
62 de peixes permanece incipiente (Nash *et al.*, 2013), incluindo os impactos causados por  
63 predadores não nativos. Espera-se que predadores invasores induzam fortes efeitos nas  
64 funções do ecossistema devido a fortes efeitos demográficos nas populações ali presentes.

65 Espécies do gênero *Cichla*, popularmente conhecidos como tucunarés, estão entre  
66 os peixes mais introduzidos em todo o Brasil (Carvalho *et al.*, 2014). Existindo registros  
67 apontados para as regiões nordeste, centro-oeste, sudeste e sul (Pelicice *et al.*, 2015; Daga  
68 *et al.*, 2016; Latini *et al.*, 2016). Apresentam hábito alimentar zooplancívoro enquanto  
69 jovens, e piscívoro quando adultos, são vorazes e consomem preferencialmente peixes de  
70 pequeno porte (Britton; Orsi, 2012; Ortega *et al.*, 2015; Sastraprawira *et al.*, 2020), com  
71 forte potencial para perturbar a comunidade invadida onde foi inserido, particularmente  
72 em reservatórios e açudes (Sharpe *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2021; Franco *et al.*, 2021).

73 Os ciclídeos são peixes de águas doce e salobra que ocorrem nas Américas Central  
74 e do Sul, na Ásia e na África (Nelson, 2016). O gênero *Cichla* tem 15 espécies descritas  
75 que são nativos das bacias do rio Tocantins, Amazonas e Orinoco (Kullander; Ferreira,  
76 2006).

77 A inferência sobre a origem dos estoques pesqueiros introduzidos com enfoque  
78 filogenético constitui-se de informações importante na compreensão e controle da  
79 expansão das espécies invasoras (Pelicice *et al.*, 2015, Pelicice *et al.*, 2017) além de gerar  
80 informações que permitem um entendimento da sistemática do grupo e subsídio ao  
81 monitoramento sustentável destas espécies.

82 Diante disto, este trabalho teve como objetivo identificar, via DNA *barcoding*  
83 espécies do gênero *Cichla* introduzidas nas bacias maranhenses e rio Tocantins, com a  
84 implementação de métodos de delimitação de espécies. As informações advindas desta

85 pesquisa poderão dar suporte para uma avaliação do estado atual do status taxonômico  
 86 dos tucunarés que fazem parte da comunidade e elaborar práticas de manejo e estudos de  
 87 ecologia mais adequados às espécies do gênero.

88

## 89 **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 90 **Área de estudo**

91 Amostras de Tucunaré foram coletadas nas bacias dos rios Pindaré,  
 92 Mearim/afluentes, Parnaíba e Tocantins entre 2019 e 2021 (Tabela 1) e (Figura 1).

93 Os espécimes foram coletados usando uma variedade de técnicas de pesca,  
 94 incluindo redes de arrasto, redes de emalhar (de malhas variadas) e, tarrafas. Todos os  
 95 espécimes foram eutanasiados por imersão em água gelada (Ashley, 2007). O material  
 96 coletado foi devidamente triado, etiquetado e conservado em gelo para posterior  
 97 transporte ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular - GENBIMOL, no Centro de  
 98 Estudos Superiores de Caxias, Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA.

99 A identificação taxonômica foi realizada com o auxílio de literatura específica  
 100 (Kullander; Ferreira, 2006) e confirmada por especialistas. Um exemplar do rio Pindaré  
 101 material testemunho (voucher) foi depositado no Museu de Zoologia da Universidade  
 102 Estadual de Londrina (MZUEL) e o restantes dos espécimes foram depositados na  
 103 coleção Zoológica do Centro de Estudos Superiores de Caxias da Universidade Estadual  
 104 do Maranhão CESC/UEMA.

105 Os peixes coletados foram fotografados e retiradas amostras de tecido muscular.  
 106 Os tecidos foram preservados em álcool 80% e mantidos sob refrigeração a -20°C. Os  
 107 exemplares foram fixados em formalina 10% e conservados em álcool 70%. As coletas  
 108 dos exemplares foram autorizadas pelo ICMBio MMA, por meio das licenças 46367-1  
 109 (Rio Pindaré), 64.601-2 (Rio Mearim).

110

111 **Tabela 1.** Espécimes de Tucunaré obtidos em bacias hidrográficas no estado do Maranhão e Tocantins.

<b>Bacias hidrográficas</b>	<b>Nº amostral</b>	<b>Localidades</b>	<b>Coordenadas geográficas</b>
Rio Pindaré	05	Pindaré-Mirim	3°39'54"S e 45°25'31"W
Rio Mearim	11	Josêlandia	05°05'508"S,044°39'811"W
Rio Parnaíba	15	Coelho Neto	04°15'24"S, 43°00'46"W
Rio Tocantins	07	Lajeado e Palmas	9°44'58.25'868"S, 48°21'46'.1088"W e 10°7'30.70304"S 48°21'33.1974"W

112

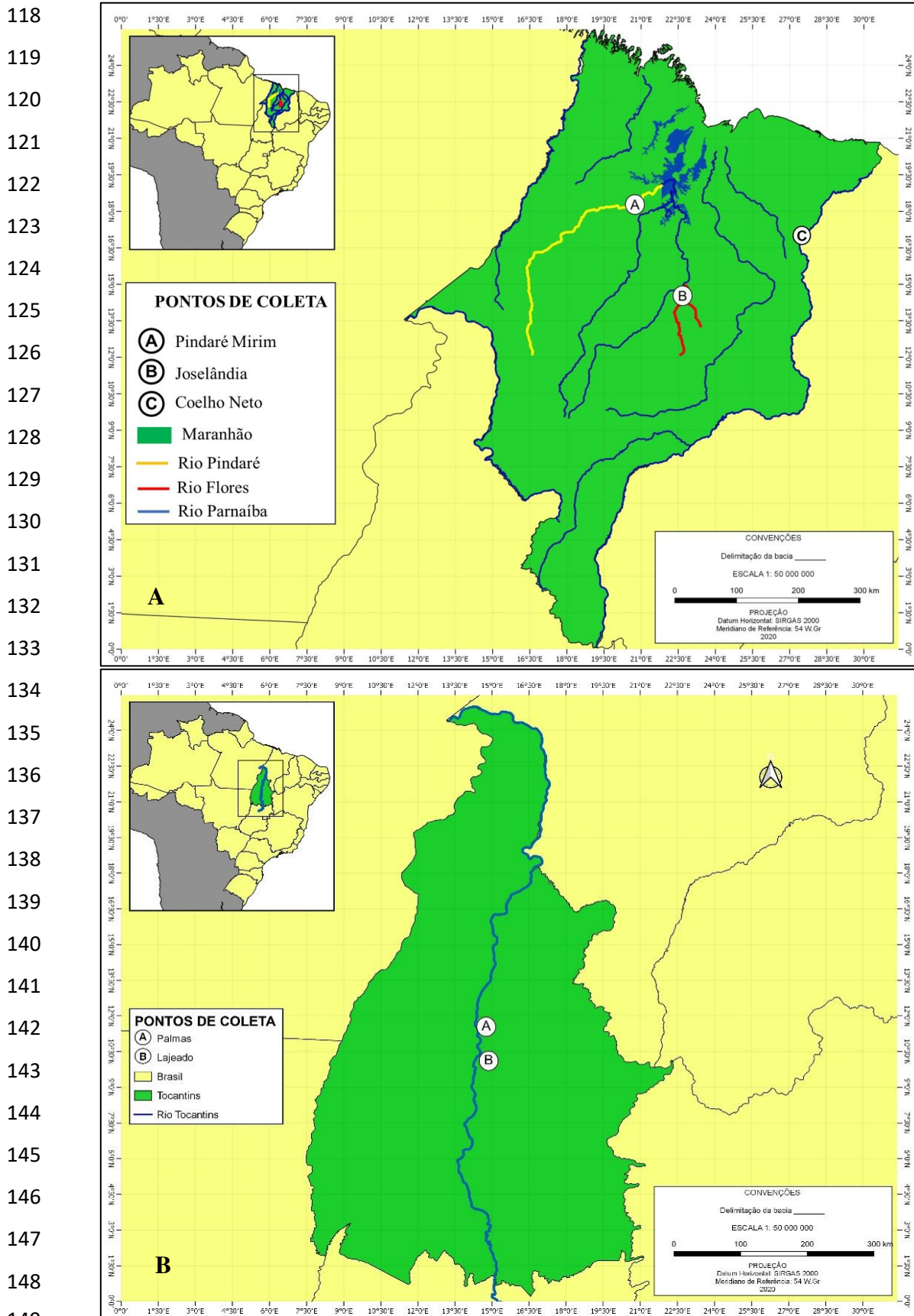
113

114

115

116

117



151 **Figura 1** - Mapa da localização dos pontos de coleta nas bacias maranhenses (A). Ponto A: Rio Pindaré;  
152 ponto B: Rio Flores; ponto C: Rio Parnaíba; (B) Rio Tocantins, ponto A: Palmas; ponto B: Lajeado.  
153 **Fonte:** Adaptado por Teixeira (2020) no programa Quantum GIS 2.6.0.

## 154 **Extração de DNA, PCR e Sequenciamento**

155 O DNA total foi extraído do tecido muscular usando um Promega Wizard®  
156 Genomic DNA Purification comercial, de acordo com as instruções do fabricante. Uma  
157 sequência de 650 pb da região 5' do gene Citocromo Oxidase I (COI) foi isolada usando  
158 os primers COIF2/ COIR2 (Ward et al., 2005). A PCR foi executada em volume final de  
159 25 µL, contendo: 4µl de DNTPs, 2,5 µl de solução tampão (10X); 0,5 µl de solução de  
160 MgCl<sub>2</sub>, 2µl de DNA, 0,25 µl de cada primer, 0,2 µl da enzima Taq polimerase e 15,3 µl  
161 de H<sub>2</sub>O. O protocolo de amplificação consistiu em uma desnaturação inicial de 95° C por  
162 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento  
163 54° C por 30 segundos, extensão 72° C por 1 minuto e uma extensão final de 72° C por  
164 10 minutos. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit ExoSap-IT®,  
165 seguindo as recomendações do fabricante e submetidos à reação de sequenciamento de  
166 DNA segundo o método de Sanger *et al.* (1977), utilizando - se o Kit “Big Dye TM  
167 Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems)”. As  
168 amostras foram sequenciadas em ambas as direções (forward e para reverse).

## 169 **Alinhamento das sequências e Divergência genética**

170 As sequências amplificadas foram editadas manualmente no programa BioEdit  
171 (Hall, 1999) e alinhadas com o algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). O número  
172 de haplótipos foi verificado no DnaSP v6.10.01 (Rozas *et al.*, 2017). Para a identificação  
173 e verificação do grau de similaridade, as sequências foram plotadas nas plataformas de  
174 bioinformática BOLD Systems v3 137 (Barcode of Life Data) (Ratnasingham; Hebert,  
175 2007). As médias de divergências genéticas e a árvore de Máxima verossimilhança (ML)  
176 de foram obtidas no MEGA X (Kumar *et al.*, 2018), utilizando o modelo Tamura-Nei3,  
177 com 1000 réplicas de *bootstrap* (Felsenstein, 1985). A rede de haplótipos foi inferida por  
178 meio do programa Network 4.5.1.0, utilizando-se o algoritmo median-joining (Bandelt *et*  
179 *al.*, 2008).

## 180 **Testes de delimitação de espécie**

181 A escolha do modelo evolutivo para a construção da árvore de Inferência  
182 Bayesiana (BI) foi gerada no JModelTest2 (Darriba *et al.*, 2012) que está disponível no  
183 CIPRES Science Gateway v3.3 (Miller *et al.*, 2010). A árvore de BI foi construída usando  
184 o software BEAST v.1.10.4 (Drummond; Rambaut, 2007; Suchard *et al.*, 2018), utilizando  
185 o algoritmo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G+I), um relógio estrito e o processo de  
186 especiação de Yule como priori. A análise foi realizada com base em 40.000.000 milhões  
187 de gerações. Em seguida os arquivos de log foram verificados no Tracer v1.6 (Rambaut  
188 *et al.*, 2014) para avaliar a convergência e o comprimento adequado do *burn in*, onde a  
189 convergência foi considerada adequada quando os parâmetros apresentaram ESS  
190 (*Effective Sample Size*) superiores a 200. A árvore gerada no BEAST foi sumarizada no  
191 Tree Annotator v.10.4 (Suchard *et al.*, 2018) para obtenção da árvore consenso,  
192 posteriormente visualizada e editada no Fig Tree v1.4.2 (Rambaut *et al.*, 2014) e Inkscape  
193 Clados (Programa de edição de imagem). com porcentagens de BP  $\geq 85$  ou PP  $\geq 0.95$   
194 foram considerados fortemente suportados, as espécies de *Thorichthys meeki*

195 (HQ564588.1) e *Oreochromis tanganyica* (MK497081.1) foram usados como grupo  
196 externo.

197 As análises de delimitação de OTUs, foram utilizados os modelos: *Automatic*  
198 *Barcode Gap Discovery* (ABGD), *Assemble Species by Automatic Partitioning* (ASAP),  
199 *Poisson Tree Process* (PTP) e *Generalized Model Yule Coalescent* (GMYC). O teste  
200 ABGD (Puillandre *et al.*, 2012) foi executado em <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/>  
201 usando o banco de sequências alinhadas e o algoritmo Kimura-2-parâmetro (K2P). O teste  
202 ASAP (Puillandre *et al.*, 2020) foi realizado em  
203 <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/asapweb.html> usando como entrada uma matriz  
204 de distância genética realizada no MEGA X. O PTP (Zhang *et al.*, 2013) foi executado  
205 no servidor da web <https://species.h-its.org/> usando como arquivo de entrada uma árvore  
206 filogenética de Máxima Verossimilhança (ML) construída no programa RaxML v.8.29  
207 (Stamatakis, 2014) que está disponível no CIPRES Science Gateway v3.3 (Miller *et al.*,  
208 2010). O GMYC (Fujisawa; Barraclough, 2013), foi realizado a partir da árvore  
209 ultramétrica consenso construída no software BEAST v1.8, a qual foi submetida nos  
210 pacotes Ape, Splits, Paran e Mass disponíveis no software R v. 4.1.0. A utilização de mais  
211 de um teste para a delimitação é recomendado (Carstens *et al.*, 2013).

## 212 RESULTADOS

213 Foram obtidas 78 sequências do gene COI, 37 sequências correspondem os 11  
214 espécimes de *Cichla monoculus* do rio Flores, quatro sequências de *Cichla kelberi* do rio  
215 Pindaré, sete sequências de *Cichla piquiti* do rio Tocantins e 15 sequências de *Cichla* sp.  
216 do rio Parnaíba. 41 sequências foram provenientes do Genbank, que correspondem as  
217 espécies *Cichla kelberi*, *Cichla monoculus*, *Cichla piquiti*, *Cichla ocellaris*, *Cichla*  
218 *melaniae*, *Cichla mirianae* que foram incorporadas ao banco de dados do gene COI  
219 (**Tabela suplementar 1**) para as análises filogenéticas.

220 Um fragmento de 645 pares de bases foi obtido, destes 228 sítios foram  
221 conservados, 278 mostraram-se variáveis e 243 informativos para parcimônia. A  
222 composição média de nucleotídeos foi de 32,3% para timina (T), 13,5% para citosina (C),  
223 33,4% para adenina (A) e 20,9% para guanina (G).

224 Quando analisadas as populações de espécies do gênero *Cichla* agrupadas foi  
225 obtido diversidade haplotípica de  $h = 0,726$  e diversidade nucleotídica de  $\pi = 0,0479$ . No  
226 entanto, quando analisadas as populações separadamente foi observado que as  
227 diversidades nucleotídicas e haplotípicas foram zero.

228 As médias das divergências intraespecífica dentro de cada táxon de *Cichla* foi de  
229 0%, já a divergência interespecífica foi menor entre o *Cichla ocellaris* e *Cichla mirinae*  
230 com 6,78% e maior entre *Cichla kelberi* e *Cichla monoculus* com 44,75% (Tabela 2).

231

232

233

234

235

236

237 **Tabela 2.** Média de divergência genética interespecífica e intraespecífica (diagonal) entre os táxons de  
 238 *Cichla* dos rios em estudo e do Genbank gerada no programa MEGA X para o gene COI.

Espécies	Matriz de Distância Genética (%)					
	1	2	3	4	5	6
1. <i>C. monoculus</i>	0					
2. <i>C. mirinae</i>	17,74	0				
3. <i>C. ocellaris</i>	15,6	6,78	0			
4. <i>C. piquiti</i>	25,16	27,70	28,95	0		
5. <i>C. melaniae</i>	24,73	29,94	28,41	31,24	0	
6. <i>C. kelberi</i>	44,75	42,35	42,25	41,44	41,34	0

239

240

241

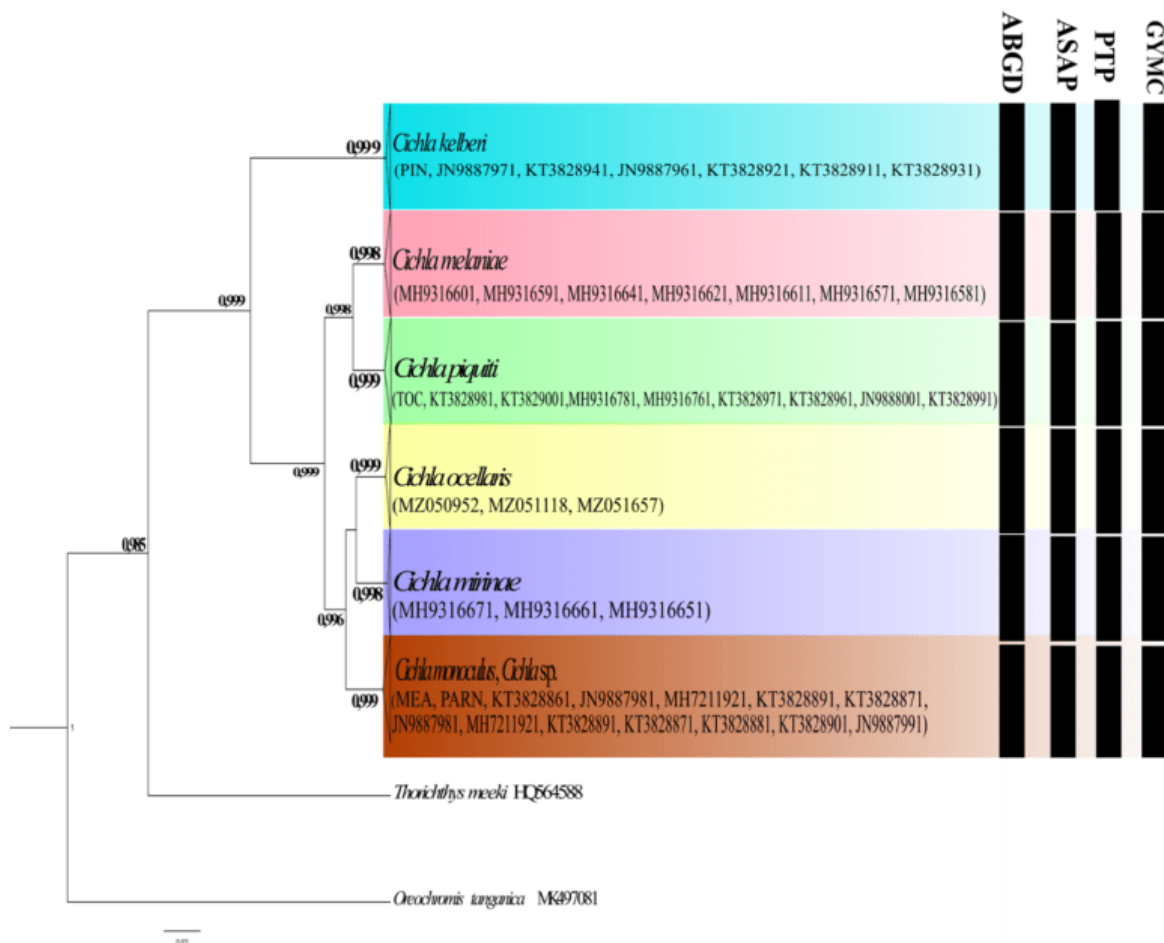
242

243

244

245

A árvore ultramétrica e filogenética foi possível observar resultados semelhantes entre os métodos de delimitação utilizados (Figura 2). Os agrupamentos pelas reconstruções filogenéticas de Máxima verossimilhança (ML) (**Figura suplementar 1**) e Inferência Bayesiana (BI) apresentaram OTUs (BP= 99; PP= 0,999), ABGD, ASAP, PTP e GMYC resultou em 6 OTUs. Indicando a concordância com as espécies atribuídas por identificação morfológica (Figura 2).



246

247

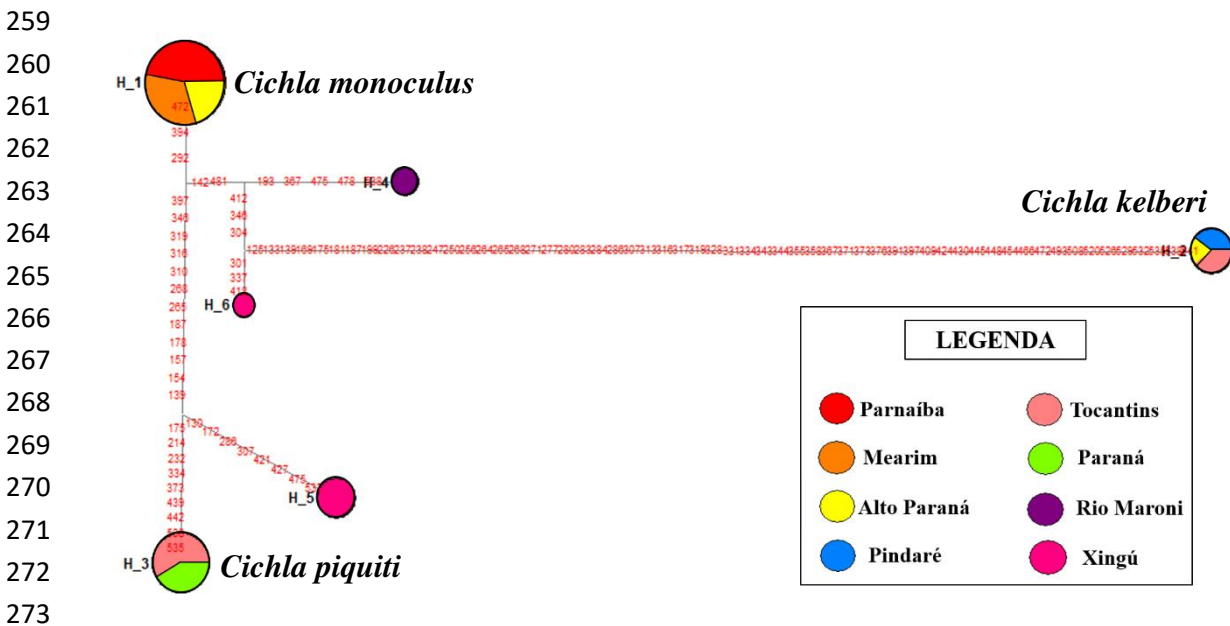
248

249

250

**Figura 2.** Árvore de inferência bayesiana evidenciando os agrupamentos dos OTUs delimitadas pelos métodos ABGD, ASAP, PTP e GMYC baseada no gene mitocondrial COI. Congruência entre métodos é representado por retângulos pretos.

Um total de seis haplótipos foram obtidos na análise conjunta das sequências do gênero *Cichla* (Figura 3). Destes haplótipos, o H1 foi compartilhado nas populações de *Cichla monoculus* provenientes dos rios Parnaíba, Mearim/afluentes e Alto Paraná (Figura 3). Já o haplótipo H2 compartilhou populações de *Cichla kelberi* dos rios Pindaré, Tocantins e Alto Paraná. O haplótipo H3 foi compartilhado com populações de *Cichla piquiti* dos rios Tocantins e Paraná. Foram observados três haplótipos exclusivos para as populações de *Cichla ocellaris* proveniente do rio Maroni na Guiana Francesa, para *Cichla melaniae* e *Cichla mirianae* provenientes do Xingú (H4, H5 e H6).



**Figura 3.** Rede de haplótipos gerada para espécies do gênero *Cichla* provenientes de bacias hidrográficas Pindaré, Mearim, Parnaíba e Tocantins e sequências depositadas na plataforma Genbank com base no gene COI. **H1** - ■ *Cichla* sp. - Parnaíba, ■ *Cichla monoculus* - Mearim, ■ *Cichla monoculus* - Alto Paraná; **H2** - ■ *Cichla kelberi* - Pindaré, ■ *Cichla kelberi* - Tocantins, *Cichla kelberi* - Alto Paraná; **H3** - ■ *Cichla piquiti* - Tocantins, ■ *Cichla piquiti* - Paraná; **H4** - ■ *Cichla ocellaris* - rio Maroni; **H5** - ■ *Cichla melaniae* - Xingú; **H6** - ■ *Cichla mirianae* - Xingú.

A identificação dos espécimes foi confirmada pela comparação das sequências com aquelas depositadas na plataforma BOLD Systems. Das comparações realizadas, observou-se que a identificação molecular corroborou com a identificação morfológica para as espécies *Cichla piquiti* da bacia do Rio Tocantins com 99,82% de similaridade, *Cichla kelberi* do Rio Pindaré com similaridade genética de 99,13%, *Cichla monoculus* do rio Mearim obteve similaridade de genética de 100%. Quando comparado os 15 espécimes de *Cichla* sp. do rio Parnaíba na plataforma, obtiveram índices de similaridades genéticas de 100% com *Cichla monoculus*.

## DISCUSSÃO

Os espécimes *Cichla* das bacias analisadas mostraram alta diversidade haplotípica e baixos valores de diversidade nucleotídica. Resultados similares foram encontrados por Marques *et al.* (2016) ao analisar divergência genética entre populações invasoras e nativas de ciclídeos no rio Paraíba do Sul por meio do gene cytochrome *b* (*cytb*), com

288 diversidade haplotípica 0,93 superior a diversidade nucleotídica de 0,007 e por Briñez *et*  
289 *al.* (2013) em que a diversidade haplotípica foi superior com valor de 0,888 as de  
290 diversidade nucleotídica com valor de 0,066 em estudos com identificação molecular de  
291 *Cichla* introduzidas em reservatórios do Sul do Brasil por meio da região controle  
292 mtDNA. Este padrão de dominância na diversidade haplotípica e o esperado em  
293 populações invasoras, que assim refletem parcialmente a diversidade genética de  
294 populações não nativas, chamado efeito fundador (Briñez *et al.*, 2013).

295 Em nossas análises as médias de distâncias genéticas intraespecíficas foram  
296 consideravelmente menores que as interespecíficas, visto que é fundamentado nessa  
297 diferença, caracterizando o *barcoding gap*, o que mostra o sucesso da técnica do DNA  
298 *barcoding*, corroborando com estudos realizados anteriormente envolvendo o marcador  
299 mitocondrial COI, que revelaram também baixos níveis de divergências genéticas  
300 intraespecíficas (Carvalho *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2015; Díaz *et al.*, 2016; Guimarães  
301 *et al.*, 2018).

302 Para sucesso do DNA *barcoding*, as sequências de DNA dentro de uma mesma  
303 espécie necessitam apresentar maior similaridade do que entre espécies (Hubert *et al.*,  
304 2015). De modo geral, os resultados das distâncias genéticas do presente estudo  
305 evidenciam que as sequências de uma mesma espécie tendem a se relacionar fortemente  
306 entre si e apresentam divergências quando comparadas entre espécies distintas,  
307 permitindo a identificação dos táxons envolvidos.

308 Em nossos resultados o primeiro OTUs agrupou os espécimes dos rios  
309 Mearim/afluentes (*Cichla monoculus*), Parnaíba (*Cichla sp.*) e *Cichla monoculus* do Alto  
310 Paraná provenientes do Genbank (Figura 2), resultados estes corroboram com a rede de  
311 haplótipos, no qual o haplótipo H1 que compartilhou amostras dos rios Parnaíba, Mearim  
312 e Alto Paraná, esses resultados estão de acordo com os de Marques *et al.* (2016) usando  
313 o gene *cytb* e Diamante *et al.* (2017) utilizando a região *D-loop*, que verificaram em seus  
314 resultados que amostras nativas dos rios Paraíba do Sul e São João estavam  
315 compartilhadas com a do Alto Paraná.

316 Consequentemente, a hipótese que pode ser sugerida é que as populações de *C.*  
317 *monoculus* dos rios Mearim, Parnaíba e do alto Paraná são oriundas de um mesmo  
318 estoque, resultados estes semelhantes aos de Marques *et al.* 2016 e Diamante *et al.*, 2017  
319 ao analisar populações nativas e invasoras de *C. monoculus* que foram previamente  
320 estudadas nos rios Paraíba do Sul e São João. Além disso, *C. monoculus* foi identificado  
321 em outros reservatórios da região sudeste do Brasil por meio da região *D-loop* e gene *cytb*  
322 por Briñez *et al.* (2013) e Santos *et al.* (2016). Segundo Almeida-Ferreira *et al.* (2011) no  
323 ano de 1986 *C. monoculus* foi a primeira espécie a ser identificada no Alto Paraná.

324 O presente estudo é o primeiro a validar através de análise molecular a presença  
325 de populações não-nativas de *C. monoculus* nos rios Mearim e Parnaíba. *C. monoculus* é  
326 uma espécie endêmica do rio Amazonas (Kullander; Ferreira, 2006), foi introduzida  
327 praticamente em todo o território brasileiro, com o único intuito de incentivar a pesca  
328 esportiva e a piscicultura (Santos *et al.*, 2011). O sucesso dos ciclídeos nos ambientes  
329 onde foram introduzidos é atribuído à sua habilidade adaptativa, estabelecendo-se com  
330 êxito no ambiente receptor devido à plasticidade fenotípica, e à sua capacidade  
331 reprodutiva, impedindo um controle eficaz (Gasques *et al.*, 2014).



332 As sequências de *C. monoculus*, *C. mirinae* e *C. ocellaris* formaram grupos  
333 monofiléticos com altos valores de *bootstrap* (Figura 2). Resultados similares foram  
334 encontrados por Marques *et al.* (2016) em estudo realizados com espécies invasoras do  
335 gênero *Cichla* provenientes do rio Paraíba do Sul.

336 Os espécimes de *Cichla piquiti* do rio Tocantins e rio Paraná agruparam-se em um  
337 único OTUs, concordando com a rede de haplótipos, no qual o H3 foi compartilhado com  
338 populações de *Cichla piquiti* dos rios Tocantins e Paraná. Mourão *et al.* (2017) ao analisar  
339 hibridização da espécie *Cichla piquiti* introduzidas no rio Paraná e Tietê (SP) utilizando  
340 marcadores mitocondrial (COI) e nuclear (RAG1) evidenciou que os espécimes dos  
341 diferentes rios se agruparam em um mesmo clado, o mesmo encontrado em nossos  
342 resultados (Figura 2).

343 *C. piquiti* cuja distribuição original ocorre nas drenagens do rio Araguaia-  
344 Tocantins, atualmente é encontrada em vários reservatórios do Brasil como resultado de  
345 introdução intencional ou acidental fora de sua área, visto que, *Cichla* não são peixes  
346 migradores (Kullander; Ferreira, 2006; Luiz *et al.*, 2011). Diante destes resultados, é  
347 possível inferir a hipótese de que *C. piquiti* do rio Paraná seja derivada de populações do  
348 rio Tocantins. Tendo conhecimento que populações não-nativas são registradas em  
349 muitos reservatórios do centro, sul e sudeste do Brasil (Santos *et al.*, 2016).

350 O haplótipo H2 de *Cichla kelberi* do rio Pindaré que teve compartilhamento com  
351 haplótipos das bacias do rio Tocantins e Alto Paraná, Diamante *et al.* (2017) ao analisar  
352 a rede de haplótipos de populações de espécies do gênero *Cichla* na bacia do rio São João  
353 com outras bacias hidrográficas neotropicais obteve resultados similares ao observar que  
354 as amostras de *C. kelberi* de seu estudo estavam compartilhados com amostras dos rios  
355 Tocantins e Alto Paraná. Conseqüentemente, a hipótese que pode ser proposta é que as  
356 populações de *C. kelberi* do rio Pindaré são derivadas de populações nativas da bacia do  
357 rio Tocantins, resultados estes semelhantes aos de Almeida-ferreira *et al.* (2011) e  
358 Marques *et al.* (2016) ao analisar populações nativas e invasoras de *C. kelberi* que foram  
359 previamente estudadas nos rios Alto Paraná e Paraíba do Sul.

360 Os resultados do estudo atual e outras investigações indicam que a introdução  
361 histórica de *C. kelberi* para diferentes bacias hidrográficas brasileiras começaram com  
362 populações da bacia do rio Tocantins (Briñez *et al.*, 2013; Marques *et al.*, 2016) essas  
363 populações invasoras foram bem sucedidas.

364 Nossas análises confirmam por meio de dados moleculares a presença de *C.*  
365 *kelberi* na bacia do rio Pindaré. Corroborado por consulta realizada na base de dados on-  
366 line “Portal da Biodiversidade”  
367 (<https://portaldabiodiversidade.icmbio.gov.br/portal/search>) onde não há registro da  
368 espécie *C. kelberi* para o estado do Maranhão.

369 Em relação a espécie *Cichla* sp. proveniente do rio Parnaíba, observou-se que a  
370 identificação molecular foi de 100% com *C. monoculus*, considerando que elas  
371 agruparam com os demais *C. monoculus* do rio Mearim e do Alto Paraná sequências estas  
372 proveniente do Genbank (Figura 2), e compartilharam o mesmo haplótipo H1 (Figura 3).

373 De acordo com Magalhães *et al.* (2018), os estudos mostram que a diversidade  
374 local de peixes decai após a introdução dessas espécies invasoras, causando efeitos sobre  
375 a estrutura das teias tróficas e organização do ecossistema. Espécies do gênero *Cichla*

376 quando introduzidas são altamente eficientes na competição por recursos, tem alta  
377 capacidade de dispersão e reprodução (Santos *et al.*, 2016).

378 A introdução de espécies de tucunaré nos diversos ambientes no que se refere à  
379 ictiofauna local, pode provocar aparecimento de patógenos, redução de espécimes e das  
380 espécies locais em consequência de competições diretas, e adulterações no ambiente,  
381 além de perda da diversidade genética populacional das espécies nativas (Santos *et al.*,  
382 2016).

383 Tendo em vista a grande capacidade dessas espécies em se adaptar a novos  
384 ambientes, e os diferentes problemas ecológicos que as estas podem acarretar ao ambiente  
385 receptor como a diminuição da biodiversidade ictiofaunística local (Sastraprawira *et al.*,  
386 2020), a identificação exata dos status taxonômico é fundamental para delinear futuras  
387 avaliações ecológicas com o objetivo de desenvolver estratégias de manejo e impactos  
388 que possam trazer para região.

### 389 **Conclusão**

390 Com similaridades de 99,13 a 100% foi possível confirmar a identificação  
391 morfológica com a moleculares das espécies estudadas. Portanto, confirma que os  
392 espécimes de *C. kelberi* do rio Pindaré sejam provenientes de populações nativas da bacia  
393 do rio Tocantins e *C. monoculus* dos rios Mearim, Parnaíba e Alto Paraná por  
394 constituírem o mesmo haplótipo sejam provenientes de um mesmo estoque. É possível  
395 inferir que *C. piquiti* do rio Paraná seja derivada de populações do rio Tocantins. Em  
396 conclusão, nosso estudo foi o primeiro a usar análises moleculares para validar a presença  
397 de *C. monoculus* como espécies invasoras em rios maranhenses bem como, confirma a  
398 introdução e registo de *C. kelberi* no rio Pindaré.

### 399 **Agradecimentos**

400 Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade,  
401 da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). Os autores agradecem ao Laboratório  
402 de Genética e Biologia Molecular (GENBIMOL) do Centro de Estudos Superiores de  
403 Caxias (CESC) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) por todo aparato  
404 fornecido para o desenvolvimento dessa pesquisa e a Fundação de Amparo à Pesquisa e  
405 o Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pela concessão  
406 da bolsa.

### 407 **REFERÊNCIAS**

408 **Almeida-Ferreira GC, Oliveira, AV, Prioli, AJ, Prioli, SMAP.** Spar genetic analysis  
409 of two invasive species of *Cichla* (Tucunaré) (Perciformes: Cichlidae) in the Paraná River  
410 basin. *Acta scientiarum. Biology Science*, 33, 79 e 85, 2011.

411 **Ashley PJ.** Bem-estar dos peixes: questões atuais na aquicultura. *Ciência do*  
412 *Comportamento Animal Aplicada*, vol. 104, nº. 3-4, págs. 199-235, 2007.  
413 <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2006.09.001>

414 **Bandelt HJ, Forster P, Rohl A.** Median-joining networks for inferring intraespecific  
415 phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, v.16, p.37-48, 2008.

- 416 **Bezerra LAV, Ribeiro VM, Freitas MO, Kaufman L, Padial AA, Vitule JRS.**  
417 Benthification, biotic homogenization behind the trophic downgrading in altered  
418 ecosystems. *Ecosphere*. 10(6):e02757, 2019. <http://dx.doi.org/10.1002/ecs2.2757>
- 419 **Britton JR, Orsi ML.** Non-native fish in aquaculture and sport fishing in Brazil:  
420 economic benefits versus risks to fish diversity in the upper River Paraná Basin. *Rev Fish*  
421 *Biol Fisher*. 22:555–65, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s11160-012-9254-x>
- 422 **Bríñez B, Júlio HF Jr, Prioli SMAP, Maniglia TC, Prioli AJ.** Molecular identification  
423 of *Cichla* (Perciformes: Cichlidae) introduced in reservoirs in Southern Brazil. *Acta*  
424 *Scientiarum Biological Sciences* 35: 233–239, 2013.  
425 <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v35i2.10684>
- 426 **Carvalho TL, Ferreira EA, Pelicice FM, Fernandes R.** Comparative functional  
427 responses predict the predatory impact of the highly invasive fish *Cichla kelberi*.  
428 *Hydrobiologia*. 848:2203–11, 2021. <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-020-04440-6>
- 429 **Carvalho DC, Oliveira DAA, Pompeu P S, Leal CG, Oliveira C, Hanner R.**  
430 Divergência profunda de código de barras em água doce brasileira peixes: o caso da bacia  
431 do rio São Francisco. *DNA mitocondrial*, 80-86, 2011.
- 432 **Carvalho DC, Oliveira DAA, Sampaio I, Beheregaray LB.** Analysis of propagule  
433 pressure and genetic diversity in the invasibility of a freshwater apex predator: the  
434 peacock bass (genus *Cichla*). *Neotropical Ichthyology*. 12, 105e116, 2014.  
435 <https://doi.org/10.1590/S1679-62252014000100011>
- 436 **Carstens BC, Pelletier TA, Reid NM, Satler JD.** How to fail at species delimitation.  
437 *Mol. Ecol*. 22, 4369–4383, 2013. <http://dx.doi.org/doi:10.1111/mec.12413>
- 438 **Cucherousset J, Olden JD.** Ecological impacts of non-native freshwater fishes.  
439 *Fisheries*. 36(5):215–30, 2011. <http://dx.doi.org/10.1080/03632415.2011.574578>
- 440 **Darriba D, Taboada, GL, Doallo R, Posada D.** “jModelTest 2: More Models, New  
441 Heuristics and Parallel Computing.” *Nature Methods* 9(8):772, 2012.
- 442 **Daga VS, Debona T, Abilhoa V, Gubiani ÉA, Vitule JRS.** Non-native fish invasions  
443 of a Neotropical ecoregion with high endemism: a review of the Iguaçu River. *Aquatic*  
444 *Invasions*, 11(2), 209–223, 2016. <http://dx.doi:10.3391/ai.2016.11.2.10>
- 445 **Diamante, NA, de Oliveira, AV, Petry, AC, Catelani, PA., Pelicice, FM, Prioli,**  
446 **SMAP, Prioli, AJ.** Molecular analysis of invasive *Cichla* (Perciformes: Cichlidae)  
447 populations from neotropical ecosystems. *Biochemical Systematics and Ecology*, 72, 15–  
448 22, 2017. <http://dx.doi:10.1016/j.bse.2017.03.004>
- 449 **Díaz J, Villanova GV, Brancolini F, Del Pazo F, Posner VM.** Primeiro DNA Biblioteca  
450 de referência de código de barras para a identificação de Peixes de água doce sul-  
451 americanos do baixo Rio Paraná. *PLoS ONE*, 1-20, 2016.

- 452 **Drummond AJ, Rambaut A.** BEAST: Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling  
453 Trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214, 2007.
- 454 **Elvira B, Almodóvar A.** Freshwater fish introductions in Spain: facts and figures at the  
455 beginning at the 21st century. *Journal of Fish Biology*, v.59, p.323-331, 2011.
- 456 **Franco ACS, García-Berthou E, Santos LN.** Ecological impacts of an invasive top  
457 predator fish across South America. *Sci Total Environ.* 2021; 761:143296,  
458 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143296>
- 459 **Felsenstein J.** Confidence limits on phylogenies: An approach using the 388 *bootstrap*.  
460 *Evolution*, 783-791, 1985.
- 461 **Fujisawa, T, Barraclough, TG.** Delimiting species using single-locus data and the  
462 Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation  
463 on simulated datasets. *Systematic Biology* 44, 1–49, 2013  
464 <https://doi.org/10.1093/sysbio/syt033>
- 465 **Gasques, LS, Fabrin, TMC, Prioli, SMAP, Prioli, AJ.** A introdução do gênero *Cichla*  
466 (Block e Schneider, 1801) na planície de inundação do Alto Rio Paraná. *Arquivos de*  
467 *Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, Umarama*, v. 17, n. 4, p. 261-266, 2014.
- 468 **Gomes LC, Pessali TC, Guimarães VN, Pompeu PS, Carvalho DC.** A taxonomia  
469 integrativa detecta espécies de peixes crípticas e negligenciadas em uma bacia  
470 hidrográfica neotropical. *Genetics*, 1-8, 2015.
- 471 **Guimarães KLA, De Sousa MPA, Ribeiro FRV, Porto JIR, Rodrigues LRR.** DNA  
472 *barcoding* da ictiofauna de riachos de baixa ordem da bacia do rio Tapajós. *PLoS ONE*,  
473 2018.
- 474 **Hall TA.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis  
475 program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41: 95-98, 1999.
- 476 **Hubert N, Espiau B, Meyer C, Planes S.** Identifying the ichthyoplankton of a coral reef  
477 using DNA Barcodes. *Molecular Ecology Resources*. n. 15, p. 57– 67, 2015.
- 478 **Kullander SO, Ferreira EJG.** A review of the South American cichlid genus *Cichla*,  
479 with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). *Ichthyol Explor Fres.*  
480 17(4):289–398, 2006.
- 481 **Kumar S, Stecher G, Li M, Knyar C, Tamura K.** MEGA X: Molecular Evolutionary  
482 Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*. v. 35,  
483 p. 1547-1549, 2018.
- 484 **Latini AO, Resende DC, Pombo VB, Coradin L.** Espécies exóticas invasoras de águas  
485 continentais no Brasil. Brasília, DF: MMA, (Série Biodiversidade, 39), p. 791, 2016.
- 486 **Luiz TF, Velludo MR, Peret AC, Rodrigues Filho JL, Peret AM.** Diet, reproduction  
487 and population structure the introduced Amazonian fish *Cichla piquiti* (Perciformes:  
488 Cichlidae) in the Cachoeira Dourada reservoir (Paranaíba River, central Brazil). *Revista*  
489 *Biologia Tropical (Int. J. Trop. Biol)*, v. 59, n. 2, 727-741, 2011.

- 490 **Marshall BE.** Guilty as charged: Nile perch was the cause of the haplochromine decline  
491 in Lake Victoria. *Can J Fish Aquat Sci.* 75(9):1542–59, 2018.  
492 <http://dx.doi.org/10.1139/cjfas-2017-0056>
- 493 **Marques, ACPB, Franco, ACS, Salgueiro, F, García-Berthou, E, Santos, LN.** Genetic  
494 divergence among invasive and native populations of the yellow peacock cichlid. *Cichla*  
495 *kelberi*, 2016. <http://dx.doi.org/10.1111/jfb.13144>
- 496 **Magalhães ALB, Pelicice FMP, Lima-Junior DP.** Riscos ambientais e  
497 socioeconômicos do Projeto de Lei que visa a proteção de espécies invasoras (tucunaré  
498 azul e tucunaré amarelo) no Estado do Paraná. *Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia.*  
499 *Nota Técnica:*1–08, 2018.
- 500 **Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T.** “Creating the CIPRES Science Gateway for  
501 inference of large phylogenetic trees”. In *Proceedings of the Gateway Computing*  
502 *Environments Workshop*, 1-8, 2010. <http://dx.doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>
- 503 **Mourão AAF, Freitas-Souza D, Hashimoto DT, Ferreira DC, Prado FD, Silveira**  
504 **RV, Foresti F, Porto-Foresti, F.** Molecular and morphological approaches for species  
505 delimitation and hybridization investigations of two *Cichla* species. *Iheringia. Série*  
506 *Zoologia*, 107(0), 2017. <https://doi:10.1590/1678-4766e2017016>
- 507 **Nash KL, Graham NAJ, Bellwood DR.** Fish foraging patterns, vulnerability to fishing,  
508 and implications for the management of ecosystem function across scales. *Ecol Appl.*  
509 23(7):1632–44, 2013. <http://dx.doi.org/10.1890/12-2031.1>
- 510 **Nelson JS, Grande TC, Wilson MVH.** *Fishes of the World* 5.ed. 476 WILEY, J.; SONS,  
511 N. J. New Jersey, U.S.A, 2016. <https://doi.org/10.1002/9781119174844>
- 512 **Ortega JCG, Julio Jr HF, Gomes LC, Agostinho AA.** Fish farming as the main driver  
513 of fish introductions in Neotropical reservoirs. *Hydrobiologia.* 746(1):147–58, 2015.  
514 <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-014-2025-z>
- 515 **Pelicice FM, Latini JD, Agostinho AA.** Fish fauna disassembly after Introduction of a  
516 voracious predator: main drivers and the role of the invader’s demography.  
517 *Hydrobiologia.* 746(1):271–83, 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-014-1911-8>
- 518 **Pelicice FM, Azevedo-Santos VM, Vitule JRS, Orsi ML, Lima Junior DP,**  
519 **Magalhães ALB, Pompeu PS, Petrere Jr M, Agostinho AA.** Neotropical freshwater  
520 fishes imperiled by unsustainable policies. *Fish Fish.* 18(6):1119–33, 2017.  
521 <http://dx.doi.org/10.1111/faf.12228>
- 522 **Puillandre N, Brouillet S, Achaz G.** ASAP: assemble species by automatic partitioning.  
523 *Molecular Ecology Resources* 21(2) 609–620. 2020. [https://doi.org/10.1111/1755-](https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281)  
524 [0998.13281](https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281)
- 525 **Puillandre, N, Lambert, A, Brouillet, S, Achaz, G.** ABGD, Automatic Barcode Gap  
526 Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21, (8), 1864–1877,  
527 2012. <http://dx.10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>

- 528 **Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ.** Tracer v1.6, Available from, 2014.  
529 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>
- 530 **Ratnasingham S, Hebert PDN.** BOLD. The barcode of Life Data System  
531 (www.barcodinglife.org). Molecular Ecology Notes, 355–364, 2007.
- 532 **Rozas J, Ferrer-Mata, A, Sánchez-Delbarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-**  
533 **Onsins SE, Sánchez-Gracia A.** DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of  
534 Large Datasets. Molecular Biology and Evolution. 34: 3299-3302, 2017.  
535 <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- 536 **Santos, AFGN, Santos, LN.** Feeding morphology of the Neotropical piscivorous fish  
537 *Cichla kelberi* (Perciformes: Cichlidae) introduced into an oligotrophic Brazilian  
538 reservoir. Revista Biologia Tropical. v.59, n.3, 2011.
- 539 **Santos LN, Salgueiro F, Sampaio Franco AC, Marques ACP, Nóbrega F.** First record  
540 of the invasive blue peacock cichlid *Cichla piquiti* Kullander and Ferreira 2006  
541 (Cichliformes: Cichlidae) in the Paraíba do Sul River basin, Southeastern Brazil.  
542 BioInvasions Record, 5(4), 2016.
- 543 **Sastraprawira SM, Razak IHA, Shahimi S, Pati S, Edinur HA, John AB, Ahmad A,**  
544 **Kumaran JV, Martin MB, Chong JL, Chowdhury AJK, Nelson BR.** A review on  
545 introduced *Cichla* spp. and emerging concerns. Heliyon. 6(11):e05370, 2020.  
546 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05370>
- 547 **Sharpe DMT, De León LF, González R, Torchin ME.** Tropical fish Community does  
548 not recover 45 years after predator introduction. Ecol. 98(2):412–24, 2017.  
549 <http://dx.doi.org/10.1002/ecy.1648>
- 550 **Sanger F, Nichlen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain termination inhibitors.  
551 Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v. 74, p. 5463-5468, 1977.
- 552 **Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A.** Bayesian  
553 phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10 Virus Evolution, 1:4.  
554 2018. <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>
- 555 **Stamatakis A.** “RAxML Version 8: A Tool for Phylogenetic Analysis and 562  
556 PostAnalysis of Large Phylogenies.” Bioinformatics, 2014.  
557 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- 558 **Toussaint A, Charpin N, Brosse S, Villéger S.** Global functional diversity of freshwater  
559 fish is concentrated in the Neotropics while functional vulnerability is widespread. Sci  
560 Rep. 6:22125, 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/srep22125>
- 561 **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W.** Improving the sensitivity of  
562 progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific  
563 gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. n. 22, p. 4673- 4680,  
564 1994.

565 **Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN.** DNA *barcoding* Australia's  
566 fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B,  
567 Biological Sciences, v. 359, p.1847-1857, 2005. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>

568 **Yang Z, Rannala, B.** Species identification by Bayesian fingerprinting: a powerful  
569 alternative to DNA barcoding. bioRxiv. 2016:041608, 2016.  
570 <https://doi.org/10.1101/041608>

571 **Zhang J, Kapli P, Pavlidis P, Stamatakis A.** A general species delimitation 591 method  
572 with applications to phylogenetic placements. Bioinformatics, 2869–2876, 2013.  
573 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt499>

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

## 594 MATERIAL SUPLEMENTAR

595 Tabela suplementar 1. Números de acesso do GenBank para espécies do gênero *Cichla*.

Espécies	Acesso GenBank	Localidades	Referência
<i>Cichla monoculus</i>	JN988798.1	Bacia do Alto Paraná	Pereira <i>et al.</i> (2013)
<i>Cichla monoculus</i>	JN988799.1	Bacia do Alto Paraná	
<i>Cichla monoculus</i>	KT382890.1	Bacia do Alto Paraná	Gasques <i>et al.</i> (2015)
<i>Cichla monoculus</i>	KT382889.1	Bacia do Alto Paraná	
<i>Cichla monoculus</i>	KT382888.1	Bacia do Alto Paraná	
<i>Cichla monoculus</i>	KT382886.1	Bacia do Alto Paraná	
<i>Cichla monoculus</i>	KT382887.1	Bacia do Alto Paraná	
<i>Cichla monoculus</i>	MH721192.1	Bacia do Alto Paraná	Vu <i>et al.</i> (2018)
<i>Cichla kelberi</i>	JN988797.1	Bacia do Alto Paraná	Pereira <i>et al.</i> (2013)
<i>Cichla kelberi</i>	JN988796.1	Bacia do Alto Paraná	
<i>Cichla kelberi</i>	KT382894.1	Rio Tocantins	
<i>Cichla kelberi</i>	KT382893.1	Rio Tocantins	
<i>Cichla kelberi</i>	KT382892.1	Rio Tocantins	
<i>Cichla kelberi</i>	KT382891.1	Rio Tocantins	
<i>Cichla piquiti</i>	KT382900.1	Rio Paraná, Brasil	Gasques <i>et al.</i> (2015)
<i>Cichla piquiti</i>	KT382899.1	Rio Paraná, Brasil	
<i>Cichla piquiti</i>	KT382898.1	Rio Paraná, Brasil	
<i>Cichla piquiti</i>	KT382897.1	Rio Paraná, Brasil	
<i>Cichla piquiti</i>	KT382896.1	Rio Paraná, Brasil	
<i>Cichla piquiti</i>	KT382895.1	Rio Paraná, Brasil	
<i>Cichla piquiti</i>	MH931678.1	Rio Paraná, Brasil	Carvalho <i>et al.</i> (2019)
<i>Cichla piquiti</i>	MH931677.1	Rio Paraná, Brasil	
<i>Cichla piquiti</i>	MH931676.1	Rio Paraná, Brasil	
<i>Cichla piquiti</i>	JN988800.1	Rio Paraná, Brasil	
<i>Cichla ocellaris</i>	MZ051601.1	Rio Maroni - Guiana Francesa	Papa, Y.; Le Bail, P.Y; Covain, R. (2020)
<i>Cichla ocellaris</i>	MZ051118.1	Rio Maroni - Guiana Francesa	
<i>Cichla ocellaris</i>	MZ050952.1	Rio Maroni - Guiana Francesa	
<i>Cichla ocellaris</i>	MZ051137.1	Rio Maroni - Guiana Francesa	
<i>Cichla melaniae</i>	MH931664.1	Rio Xingú, Brasil	Carvalho <i>et al.</i> (2019)
<i>Cichla melaniae</i>	MH931663.1	Rio Xingú, Brasil	
<i>Cichla melaniae</i>	MH931662.1	Rio Xingú, Brasil	
<i>Cichla melaniae</i>	MH931657.1	Rio Xingú, Brasil	
<i>Cichla melaniae</i>	MH931658.1	Rio Xingú, Brasil	
<i>Cichla melaniae</i>	MH931659.1	Rio Xingú, Brasil	
<i>Cichla melaniae</i>	MH931660.1	Rio Xingú, Brasil	
<i>Cichla melaniae</i>	MH931661.1	Rio Xingú, Brasil	
<i>Cichla miriana</i>	MH931667.1	Rio Xingú, Brasil	Carvalho <i>et al.</i> (2019)
<i>Cichla miriana</i>	MH931666.1	Rio Xingú, Brasil	
<i>Cichla miriana</i>	MH931665.1	Rio Xingú, Brasil	
<i>Thorichthys meeki</i>	HQ564588.1	Ontario, Canadá	Universidade de Ontario
<i>Oreochromis tanganyica</i>	MK497081.1		Mojeckwu <i>et al.</i> (2017)

596

597

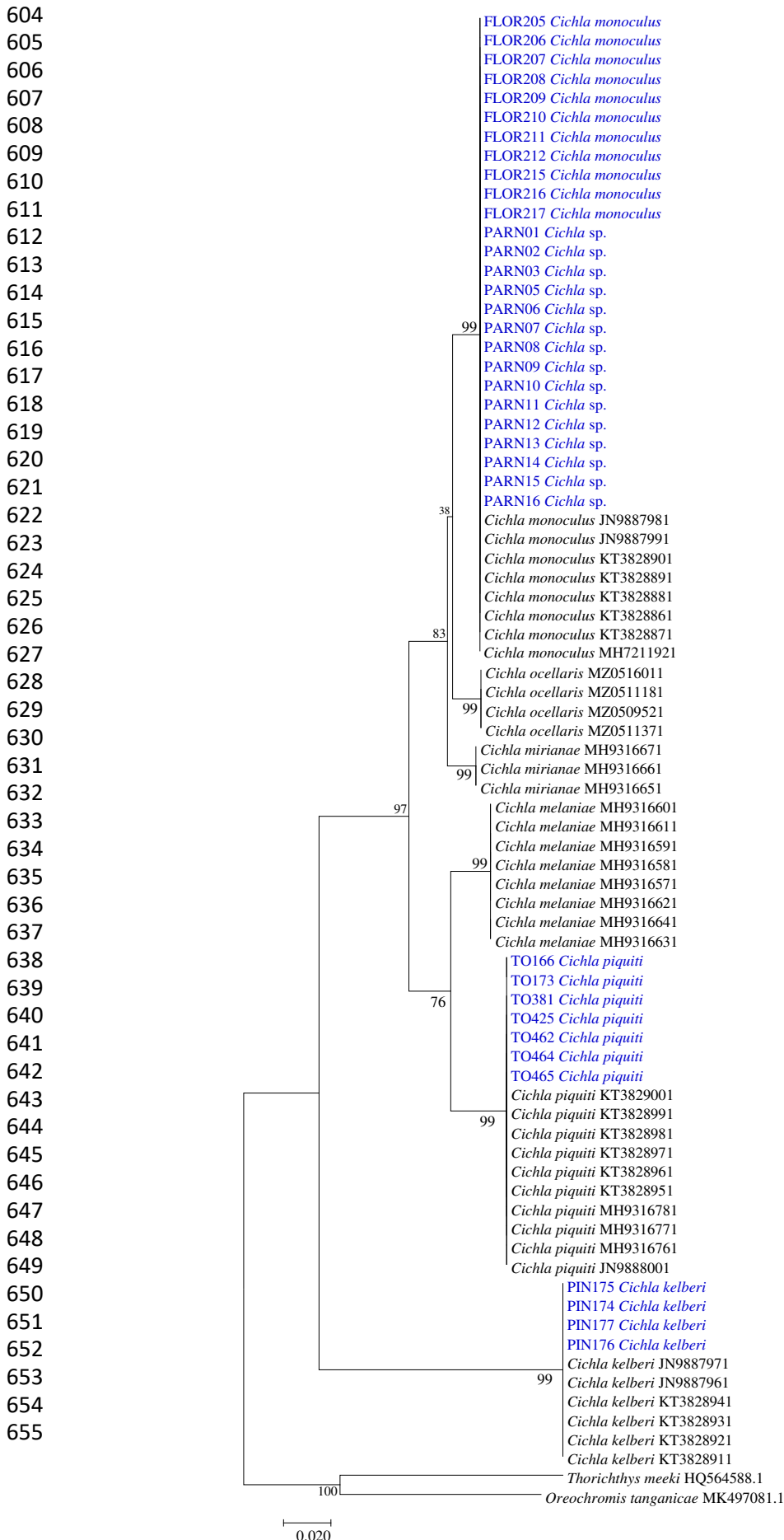
598

599

600



601 **Figura Suplementar 1.** Árvore filogenética obtida através do método Máxima verossimilhança  
 602 (MV) com 1000 réplicas de *bootstrap* baseada no gene mitocondrial COI através do algoritmo de  
 603 Tamura-Nei-3-parâmetros. Azul= Sequências do Maranhão e Tocantins.



## APÊNDICE

## NEOTROPICAL Ichthyology

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

664 **Scope and policy**

665 Neotropical Ichthyology prioritizes articles on native species in their original  
 666 basins. Articles focusing on aquaculture should be submitted to journals  
 667 focusing on Animal Science.

669 Submitted manuscripts must report on original research, provide clear  
 670 theoretical foundations, describe the objectives and/or hypotheses under  
 671 consideration, and employ appropriate sampling and analytical designs.  
 672 Descriptive studies which have a clear conservation or management focus  
 673 and/or demonstrate relevance to a broad audience by addressing interesting  
 674 scientific questions can be eventually published only when they (i) focus on  
 675 important species lacking critical information about their biology and natural  
 676 history; (ii) investigate species occurring in highly disturbed environments,  
 677 especially those impacted by mining, large hydroelectric plants and urban  
 678 areas, with an explicit conservation or management problem; or (iii) investigate  
 679 species in a threat category or the DD (Data Deficient) category on redlists.  
 680 Ultimately, the decision to consider a descriptive study is a prerogative of the  
 681 editors. Casual observations, scientific notes or descriptive studies not  
 682 associated with relevant theoretical issues will not be considered.

684 **Submission of manuscripts**

685 Submissions to **Neotropical Ichthyology** occur exclusively online through the  
 686 ScholarOne portal. Manuscripts must be submitted as digital files at  
 687 <http://mc04.manuscriptcentral.com/ni-scielo>. The Editor-in-Chief will screen  
 688 each manuscript submitted to **Neotropical Ichthyology** to verify whether it is  
 689 within the journal's scope, presents original research and follows the  
 690 instructions of the journal to authors. After passing through the initial screening,  
 691 articles are assigned to a Section Editor, who then assigns an Associate Editor  
 692 to start the single blind review process. The journal is open for submissions to  
 693 all researchers on Neotropical ichthyofauna.

694 With each new *manuscript* submission, *authors* must include a **cover letter**  
 695 stating that the article constitutes original research and is not being submitted  
 696 to other journals. The letter should also explain to editors why your article  
 697 should be published, highlight the strengths of your research and outline the  
 698 recommendations that can be drawn from your work. In multi-authored papers,  
 699 the author responsible for submission must declare in the cover letter that all  
 700

701 coauthors are aware of and agree with the submission. To that end, please  
702 ensure that all coauthors have read and approved the final version.

703 Before starting the submission, the corresponding author must obtain the  
704 validated ORCID from all authors and co-authors and ask them to update their  
705 profiles in the system BEFORE submission. Authors may register for an  
706 ORCID at <http://orcid.org/>, and provide ORCID numbers for all coauthors  
707 during submission. The mailing addresses and valid e-mail addresses for all  
708 authors must be entered in the appropriate forms during manuscript submission  
709 as well. Do not translate institution names. During the submission, indicate at  
710 least five possible reviewers, providing name, institution, country, and valid e-  
711 mail addresses. You may also indicate your opposition to particular reviewers  
712 or conflicts of interests, if applicable.

713

714 Please, read carefully and follow all applicable rules prior to submission.  
715 Manuscripts that do not meet the journal formatting requirements, lack  
716 required files, or are written in poor English will be returned to authors without  
717 review.

#### 718 **Costs**

719

720 Paper charges will be billed to the corresponding author with costs of R\$400  
721 reais for article. For authors from outside Brazil the values will be converted to  
722 US dollars based on the current exchange rate.

723 All charges are waived when one or more authors are current SBI members  
724 (having paid the membership fee in the current year) or when the paper has  
725 been invited through the system. Contact the SBI Secretary  
726 (<http://www.sbi.bio.br/en/membership>) for membership rates and payment  
727 procedures.

728

#### 729 **Form and preparation of manuscripts**

##### 730 **General form and preparation of manuscripts**

731 Do not duplicate information among the text, figures and tables. Submit only  
732 figures and tables that are strictly necessary. Supplementary files such as  
733 appendices, and videos should be uploaded already formatted, as pdf or video  
734 files in MP4 format. For taxonomic papers, please also refer to: *Neotropical*  
735 *Ichthyology* taxonomic style below.

#### 736 **Licensing**

737 Since 2015, *Neotropical Ichthyology* publishes under a Creative Commons BY  
738 license (Attribution). Articles accepted for publication become property of the  
739 journal.

#### 740 **Copyright**

741 Though authors retain the copyright of their articles, by submitting manuscripts  
742 to *Neotropical Ichthyology*, they grant the journal a license to publish the  
743 article electronically, to identify itself as the original publisher, and to

744 distribute and promote the article on the journal's website and via social media.  
 745 Neotropical Ichthyology publishes under the Creative Commons Attribution  
 746 4.0 License. Unless otherwise stated, associated published material is  
 747 distributed under the same license.

#### 748 **Ethical statement**

749 As recommended by the Brazilian Council of Animal Experimentation  
 750 Control, we ask you to provide the protocol numbers authorizing the research  
 751 by the Animal Ethics Committees of your institution and the permit numbers or  
 752 collection licenses authorizing field research.

753 *E.g.:* Experiments were approved by the Ethical Committee for Animal Use in  
 754 Experiments of the Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CEUA  
 755 number ####/year ###) and Collection Licenses of SISBIO number #####. If  
 756 your work did not require such permissions, state this explicitly. For  
 757 manuscripts from countries other than Brazil, please provide the documentation  
 758 required in the respective country.

759

#### 760 **Science Communication**

761 NI has now a Science Communication Editor, which will be in charge of  
 762 preparing press releases, social media posts and other promotional material for  
 763 selected articles. If you prefer to produce such material yourself, please  
 764 produce materials such as a cartoon, text, video, infographic or any other  
 765 material during the peer-review period. It will be asked to you, in case of  
 766 acceptance of your article, to be displayed on NI's website or other medias.  
 767 Otherwise, I would like you authorize the journal to do it for you, if pertinent.

#### 768 **Author contributions and competing interests**

769 This information is required at the time of article submission. Ensure that all  
 770 authors and co authors are aware and agree, as they will be included in the  
 771 publication.

772

### **FORMATTING RULES**

773

774

Please, be sure you have carefully read all the items below

775

#### 776 **FILE AND PAGE SETUP**

777 Manuscript files must be in the DOC, DOCX or RTF formats. Do not lock or  
 778 protect the file. Formats such as XLS, XLSX or PDF will NOT be accepted.  
 779 The document file cannot include headers, footers, or footnotes (except page  
 780 number). Do not format text in multiple columns. Although no page limit is  
 781 imposed, manuscripts should always be as concise as possible.

782 Text should be aligned to the left (except if otherwise mentioned), not fully  
 783 justified, not indented by tab or space and not underlined. Do not hyphenate  
 784 words at line breaks (though hyphens can be used in compound constructions,  
 785 such as dorsal-fin rays, as appropriate).

786 All text must be Times New Roman font size 12, with 1.5 line spacing. Do not  
 787 number lines. The font "symbol" can be used to represent the following

788 characters:  $\chi \mu \theta \omega \varepsilon \rho \tau \Psi \upsilon \iota \omicron \pi \alpha \sigma \delta \Phi \gamma \eta \varphi \kappa \lambda \exists \varpi \beta \nu \cong \Theta \Omega \Sigma \Delta \Phi$ . Spell  
 789 out numbers from one to nine, except those that refer to numerical values, scale  
 790 counts, and when referencing figures and tables. Also, spell out numbers that  
 791 begin a sentence.

792

793 Abbreviations used in the text must be listed under Material and Methods;  
 794 except for those in common use (*e.g.*, min, km, mm, kg, m, sec, h, ml, L, g).  
 795 For measurements, use the metric system.

## 796 LANGUAGE

797 Text must be submitted in English. Avoid clichés, slang, and colloquial words  
 798 or expressions such as “In the present study”. If none of the authors are native  
 799 English speakers, we recommend that you contract with a professional  
 800 language editing and copyediting services or have the manuscript read by a  
 801 native English speaking colleague prior to submission. Authors are free to  
 802 choose any certified service, but Neotropical Ichthyology authors receive a  
 803 discount from these two companies.

804

## 805 MANUSCRIPT FILE

### 806 TITLE

807 New taxa names should not appear in the title or abstract. Center the title and  
 808 present it in boldface, without quotation marks, with sentence-style  
 809 capitalization, and with subordinate taxa separated by “:”. Titles must reflect the  
 810 contents of the paper and use scientific names rather than vernacular names. Do  
 811 not provide taxonomic authorship in the  
 812 title. *E.g.*:

813 **A new species of loricariid catfish from the rio Ribeira de Iguape**  
 814 **basin, Brazil (Ostariophysi: Siluriformes)**

815

### 816 AUTHORS

817 As the submitting author will be responsible for completing information at  
 818 submission, it is mandatory that all authors have reviewed, discussed, and agreed  
 819 with the contents of the manuscript and the order of authorship prior to  
 820 submission. All co-authors must have contributed substantially to all article  
 821 steps.

822 Capitalize only the initial letters of authors' names. Do not abbreviate first name  
 823 of authors and separate the names of the last two authors by “and”. We encourage  
 824 presenting the full middle names of the authors, except when the number of  
 825 authors is more than four. In case of authors from different institutions, use  
 826 superscript numerals to identify each one in regular font (not italics). Superscript  
 827 numerals can also be used to identify multiple addresses for each individual  
 828 author. For Hispanic surnames, insert a hyphen between the paternal and the  
 829 maternal surname if the author wishes to be cited with both. *E.g.*:

830

831 Heraldo Antônio Britski<sup>1</sup>, Naércio Aquino de Menezes<sup>1</sup>, Hernán Ortega<sup>2</sup>  
 832 and John Lundberg<sup>3</sup>

## AUTHORS ADDRESSES

833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846

Full mailing addresses and a valid email of all authors must be provided, including institution name, ZIP codes, cities (no comma between ZIP and city), states and countries. For Brazilian and American states, use standard abbreviations preceded by comma, and always present the country name in English. Footnotes should not be used. List emails as part of the institutional address. When there is more than one author at a given institution, insert initials of each author name before their respective email address. Provide ORCIDs of all the authors and coauthors in the main text and of the submission author in the system. If any author is not registered yet, one must register in <http://orcid.org/>. Indicate the corresponding author by adding (corresponding author) after the ORCID. Do not use period. *E.g.*:

847  
848  
849  
850  
851

<sup>1</sup> Seção de Peixes, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Av. Nazaré, 481, Ipiranga, 04263-000 São Paulo, SP, Brazil. (HAB) [heraldo@usp.br](mailto:heraldo@usp.br), ORCID <http://orcid.org/0000-0002-5593-9651> (corresponding author), (NAM) [naercio@usp.br](mailto:naercio@usp.br), ORCID <https://orcid.org/0000-0002-9634-6051>

852  
853  
854  
855

<sup>2</sup> Departamento de Ictiología, Museo de Historia Natural, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Arenales 1256, Apartado, 14-0434 Lima, Peru. [horteiga.musm@gmail.com](mailto:horteiga.musm@gmail.com), ORCID <http://orcid.org/0000-0002-4396-2598>

856  
857  
858

<sup>3</sup> Department of Ichthyology, The Academy of Natural Sciences of Drexel University, 1900 Benjamin Franklin Parkway, 19103-1195 Philadelphia, PA, USA. [mhs58@drexel.edu](mailto:mhs58@drexel.edu), ORCID <https://orcid.org/0000-0002-5671-9933>

859

### TEXT

860  
861  
862  
863

The body of text may employ named heading and subheadings, which cannot be lettered or numbered. All sections are left justified, except the primary headings, which should appear centered in small caps and bold font. Employ the following heading, in the cited order:

864  
865

#### Abstract

866  
867  
868  
869  
870

Abstracts must appear as a single paragraph with fewer than 200 words in English. Do not include new taxa names, authorship or references. Do not indent. Remember that this is the first piece of your article that will be viewed by each potential reader. Include information showing the importance and relevance of your article to encourage the reader to read your entire paper.

871

#### Resumo or Resumen

872  
873  
874

Provide a concise (maximum 200 words) and accurate Portuguese or Spanish translation of the English abstract.

875

#### Keywords, Palavras-chave ou Palabras clave

876  
877

Provide up to five capitalized keywords in English, in alphabetic order and

878 separated by commas. Do not use words already contained in the title, nor  
 879 Neotropical (which appears in the name of the journal). If the article provides an  
 880 identification key, include that as keyword in the English and translated lists.  
 881 According to the language you provide the Resumo or Resúmen, choose present  
 882 Palavras-chave or Palabras clave. The order of them also is arranged  
 883 alphabetically, and then the sequence of the words might differ from those in  
 884 English. *E.g.*:

885

886 **Keywords:** Conservation, Identification key, Ostariophysi, Taxonomy

887 **Palavras-chave:** Chave de identificação, Conservação, Ostariophysi,

888 Taxonomia **ORPalabras clave:** Clave de identificación, Conservación,

889 Ostariophysi, Taxonomía

890

### Running Head

891

892 Provide a suggested running head of up to 50 characters. It must concisely  
 893 reflect the content of the article. Do not include vernacular names or species  
 894 authorship here. *E.g.*:

895

896 *New Astyanax* species from the rio Ribeira de Iguape

897

898

### Introduction

899

900 Provide taxonomic authorship in the first appearance of species names in  
 901 the text. See Nomenclature Section below for further instructions.

902

### Material and Methods

903

904 If two heading levels are used, follow this format:

905

906 **Sampling sites.** Collections were carried out in...

907

**Statistical analyses.** Data were analyzed...

908

909 In case of listing Examined Material, provide a list of institutional acronyms in  
 910 Material and Methods section OR a reference to a published paper with a list of  
 911 acronyms in Material and Methods. Also, reference(s) for species identification  
 and classification used must be provided.

912

### Results

913

Do not unite Results and Discussion as a unique section.

914

915

### Discussion

916

Do not provide a separate Conclusion section. However, we encourage

917

highlighting conclusions as the last paragraph(s) of the Discussion.

### Acknowledgments

918  
 919 Acknowledgments are optional but encouraged. If included, they must be  
 920 concise and include both first and last names of persons. If you wish to provide  
 921 the institutions of people thanked, use abbreviate names for institutions, which  
 922 the full name has been provided in the Material and Methods. Names of sponsor  
 923 institutions should be listed in their original spelling and not translated to  
 924 English. Collections permit numbers and approvals of ethics committees can be  
 925 listed here OR in the Material and Methods section.

### References

926  
 927 See detailed rules bellow.

### VOUCHER SPECIMENS

928  
 929 Voucher specimens of all species examined must be deposited in a recognized  
 930 scientificresearch collection, even in studies focusing on a single well-known  
 931 species. A list of catalog numbers of voucher specimen(s) must be furnished in  
 932 all manuscripts.  
 933  
 934

### GENETIC SEQUENCES

935  
 936 Authors must deposit genetic sequence data used for phylogenetic or other  
 937 analyses in a public online depository, and include a Table or Appendix in their  
 938 manuscript with the following information: museum acronym and catalog  
 939 number; online depository name (*e.g.* BOLD, GenBank); depository accession  
 940 number (it is appropriate to use “pending” prior to acceptance of a manuscript,  
 941 but following acceptance of a manuscript, these numbers must be made available  
 942 as a condition for final publication); the markergene/locus (*e.g.* CO1, cytB,  
 943 RAG2).  
 944

### NOMENCLATURE

945  
 946 Species, genera, and Latin terms (*et al.*, *in vitro*, *in vivo*, *vs.*, *i.e.*, *e.g.*) must be  
 947 in italics. Cite scientific names according to the ICZN  
 948 (<http://iczn.org/iczn/index.jsp>). Authorship should be given at the first  
 949 reference to a species or genus. Spelling, validnames and authorship of species  
 950 must be checked in the Catalog of Fishes at  
 951 <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.  
 952 Latin terms presented between the generic and specific names (*cf.*, *aff.*, *etc.*)  
 953 are not in italics(*e.g.*, *Hoplias aff. malabaricus*).

954  
 955 The genus name must always be fully spelled at its first appearance, at the  
 956 beginning of a sentence and at least once in each figure and table caption(s).  
 957 After first mention, the firstletter of the genus name followed by the full species  
 958 name may be used (*e.g.*, *H. aff. malabaricus*) as long as the abbreviation leaves  
 959 no possibility of confusion with another generic name mentioned in the  
 960 manuscript. In the case of possible confusion, theabbreviation can include more  
 961 than the first letter to allow the differentiation of genera beginning with the same  
 962 letter.

### TABLES

963  
 964 Tables must be numbered sequentially in Arabic numerals according to the order



965 of citation in the text and be cited in the text using the following formats: Tab. 1,  
 966 Tabs. 1–2, Tabs. 1,  
 967 4. Approximate locations where tables should be inserted must be indicated in  
 968 upper case, along the right margin of the text, as in:  
 969 TABLE 1

970  
 971 **Note:** Use an **n-dash** for ranges (to automatically create n-dash in Word type  
 972 “something  
 973 – something” (*number-space-hyphen-space-number*)).

974 In table captions, the word Tab., its respective number and final period after  
 975 the number should be in bold (*e.g.*, **Tab. 1.** ). End the caption in a period.  
 976 Captions must be self- explicative. If genus names appear in a caption, spell  
 977 out the name at least once. Tables must be constructed in cells using lines and  
 978 columns. Do not format tables with “tab” or “space”. Tables should not contain  
 979 visible vertical lines or footnotes [contents of footnotes must be included in the  
 980 caption].

981 List all captions at the end of the manuscript, in the following format. *E.g.*:

982  
 983 **Tab. 1.** Monthly variation of the gonadosomatic index in *Diapoma*  
 984 *pyrrhopteryx* and *D.speculiferum*...

## 985 FIGURES

986 Figures cannot be submitted as images inserted in Word files. Figures must be  
 987 submitted as high quality individual files. For b&w figures, they must be saved  
 988 in TIFF format, gray scale, 8.5 or 17.5 cm width, 600 dpi. Color figures must  
 989 be in TIFF format, CMYK, 8.5 or  
 990 17.5 cm width and 300 dpi.

991 Composed figures must fit either the page (17.5 cm) or column width (8.5 cm).  
 992 Text included in graphs and pictures must have a font size compatible with  
 993 reductions to page or column width.

994 Figures must be numbered sequentially in Arabic numerals according to their  
 995 order of citation in the text. Cite figures in the text using the following  
 996 formats: Fig. 1, Figs. 1–2, Fig. 1A, Figs. 1A–B, Figs. 1A, C. Indicate the  
 997 approximate locations where figures should be inserted in upper case, along  
 998 the right margin of the text, as in:

999 FIGURE 1

1000  
 1001 **Note:** Use an **n-dash** for ranges (to automatically create n-dash in Word type  
 1002 “something – something” (*number-space-hyphen-space-number*)).

1003 In each figure caption, the word Fig., its respective number and period are in  
 1004 bold (*e.g.*, **Fig. 1.**...). End each caption with a period. Captions must be self-  
 1005 explicative. If genus names appear in a caption, spell out the name at least once.  
 1006 Do not include symbols in the caption, but rather replace them with text (*e.g.*,  
 1007 black triangle) or include a legend in the figure itself. Indicate figure subsections  
 1008 in upper case and bold letters in both in the figure and caption. Do not use  
 1009 parentheses after letters. Cite figures from other articles using the same formats  
 1010 as figures published in the present article, but do not capitalize them. Illustrations  
 1011 must include either a scale or reference to the size of the item in the figure  
 1012 caption. List all captions at the end of the manuscript, in the following format.

1013 *E.g.:*

1014

1015 **Fig. 1.** Otoliths of representatives of Otophysi. **A.** *Brycon hilarii*; **B.**  
1016 *B. orbignyanus*; **C.** *Pimelodus maculatus*; and **D.** *Sternopygus macrurus*. (Scale  
1017 bars = 1 mm), lapillus (black triangle), asteriscus (white dot) and sagittal (red star),  
1018 according to fig. 2 of Campana (2001).

1019

## SUPPLEMENTARY FILES

1020 Upload appendices, videos, datasets and other complementary materials as  
1021 supplementary files. Provide the files formatted as you wish it appear, but in  
1022 some format that allow edition. Videos must be in MP4 format. Identify these  
1023 files in the text by a bolded letter **S** followed by sequential numbers in Arabic  
1024 numerals. Indicate in the text that those will appear only in the online version  
1025 (*e.g.*... as shown in the video **S1**, available only in the online version,...). List all  
1026 captions at the end of the manuscript. *E.g.:*

1027

1028 **S1.** Video of variation of tides...

1029 **S2.** Spreadsheet with catalog numbers of all voucher specimens collected in...

1030

## PERSONAL COMMUNICATION

1032 Personal communications should be included in the text of your document –  
1033 cited in text only and not included in your reference list. Provide the full name,  
1034 first and family name in

1035 full, and initials of middle names when applicable, and year of  
1036 the personal communication. *E.g.:*

1037

1038 The sample site had scarce riparian vegetation (Carlos A. R. Silva, 2018, pers.  
1039 comm.).

1040

1041 **Note:** It is recommended you get permission from the source/author of your  
1042 personal communication.

1043

## REFERENCES

1044

1045 **Ensure that all citations in the text and the References coincide before**  
1046 **submitting a manuscript.**

1047

1048 References must be cited in the following formats in the text: Eigenmann (1915,  
1049 1921) or (Eigenmann, 1915, 1921; Fowler, 1945, 1948; Carvalho, 2001) or  
1050 Eigenmann, Norris (1918) or, for more than two coauthors, Eigenmann *et al.*  
1051 (1910a,b), always in chronological order and then in alphabetical order in case  
1052 of more than one author cited. Do not include undergraduate monographs,  
1053 conference papers, abstracts or technical reports. Include Masters Thesis or  
1054 Ph.D. dissertations only if extremely necessary. Do not format references with  
1055 “tab” or “space” and present references in rigorous alphabetical order. In case  
1056 of authors with surnames with prepositions, in Portuguese do not include the  
1057 preposition (*e.g.*, Carlos Alberto da Silva = Silva CA), in Spanish do not include  
1058 “de” (*e.g.*, María de Rueda = Rueda M), but include “Del” (*e.g.*, Angel Del Río  
1059 = Del Río A), except for authors who usually self cite differently. Ignore

1060 prepositions for the purpose of alphabetization, as in the following example:

1061

1062 *E.g.* of sequence De Carli F Devincenzi GJ Eigenmann CH Maldonado-  
1063 Ocampo JDe Pinna MCC Del Río ARueda MSilva CA

1064

1065 **Note:** In case of self-citations using a convention other than those exemplified,  
1066 please cite using your usual convention and, in the cover letter, mention your  
1067 intention to maintain and standardize that usage in all your self-citations in this  
1068 and other journals.

1069

1070 **For more than six authors you can use *et al.* from the seventh in all**  
1071 **categories of references, or list all the authors. Choose one pattern and**  
1072 **follow it consistently for all references.**

1073

1074 For authors using reference management software, Vancouver is the style  
1075 closest to NI's but the citations must be as described above. For users of the  
1076 **Mendeley** manager, which is free, the Neotropical Ichthyology style for  
1077 citations and references is available. To insert it in your Mendeley, login the  
1078 software > view > citation styles > get more styles > paste the link  
1079 <https://cs1.mendeley.com/styles/78754841/neotropical-ichthyology>. For more  
1080 information see: <https://www.elsevier.com/solutions/mendeley/support>.

1081

1082 **Note:** Do not forget to put the scientific names of references in italics  
1083 in **Mendeley** before importing the reference. To do this, use the HTML <i>  
1084 tags at the beginning of the word and </i> at the end. *E.g.:*

1085

1086 Reproductive biology of two species of <i>Mugil</i>: <i>M. curema</i>  
1087 and <i>M.liza</i> =

1088

Reproductive biology of two species of *Mugil*: *M.*

1089

*curema* and *M. liza*. Example formats are listed below.

1090

### **Book**

1091

Baumgartner G, Pavanelli CS, Baumgartner D, Bifi AG, Debona T, Frana VA.  
1092 Peixes do baixo rio Iguçu. Maringá: EDUEM; 2012.

1093

### **Edited book**

1094

Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ, Jr., editors. Check list of the freshwater  
1095 fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs; 2003.

1096

### **Chapter in a book**

1097

Pires T, Ohara W. Gasteropelecidae. In: Queiroz L, Torrente-Vilara G,  
1098 Ohara W, Pires T, Zuanon J, Doria C, editors. Peixes do rio Madeira. São  
1099 Paulo: Dialeto Latin America Documentary; 2013. p.206–11.

1100

1101 **Note:** You must present only **two** digits for last page if the previous digits  
 1102 coincide with the previous digits of the first page, separated by an **n-dash** (to  
 1103 automatically create n-dash in Word type “something – something” (*number-*  
 1104 *space-hyphen-space-number*)).

### 1105 **Journal Articles**

1106 Journal titles may be abbreviated according to the style used in the  
 1107 sites:

1108 [https://images.webofknowledge.com/images/help/WOS/R\\_abrvjt.html](https://images.webofknowledge.com/images/help/WOS/R_abrvjt.html),

1109 <http://cassi.cas.org/search.jsp>,

1110 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>, or others.

1111 In case you do not find the journal name in the above links, provide the full name  
 1112 of the journal and highlight it in yellow. **DO NOT USE POINTS IN JOURNAL**  
 1113 **ABBREVIATIONS.**

1114  
 1115 Ota RR, Deprá GC, da Graça WJ, Pavanelli CS. Peixes da planície de  
 1116 inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes: Revised, annotated and  
 1117 updated. *Neotrop Ichthyol.* 2018; 16(2):e170094.  
 1118 <http://dx.doi.org/10.1590/1982-0224-20170094>  
 1119

1120 **Note:** You must provide only the e-location if there are no page numbers.

1121  
 1122 Sawakuchi AO, Hartmann GA, Sawakuchi HO, Pupim FN, Bertassoli DJ, Parra  
 1123 M, *et al.* The Volta Grande do Xingu: Reconstruction of past environments and  
 1124 forecasting of future scenarios of a unique Amazonian fluvial landscape. *Sci*  
 1125 *Drill.* 2015; 20:21–  
 1126 32. <https://doi.org/10.5194/sd-20-21-2015>  
 1127

1128 **Note:** You can use *et al.* for articles with more than six authors, and the page  
 1129 numbers separated by an **n-dash** (to automatically create n-dash in Word type  
 1130 “something – something” (*number-space-hyphen-space-number*)).

1131 Abudayah WH, Mathis A. Predator recognition learning in rainbow darters  
 1132 *Etheostomacraeruleum*: specific learning and neophobia. *J Fish Biol.* 2016;  
 1133 89(3):1612–  
 1134 23. <https://doi.org/10.1111/jfb.13061>  
 1135

1136 **Note:** You must present only **two** digits for last page if the previous digits  
 1137 coincide with the previous digits of the first page, separated by an **n-dash** (to  
 1138 automatically create n-dash in Word type “something – something” (*number-*  
 1139 *space-hyphen-space-number*)).

1140  
 1141 Koike Y, Koya Y. Viable periods of fertilizability of eggs and sperm of Japanese  
 1142 medaka, *Oryzias latipes*. *Japan J Ichthyol.* 2014; 61(1):9–14. Available  
 1143 from: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jji/61/1/61\\_9/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jji/61/1/61_9/_pdf)  
 1144

1145 **Note:** You must provide the issue number, and can present the URL of

1146 online articles without DOI number, preceded by Available from:  
 1147

1148 **Journal article – in press**

1149 Birindelli JL, Britski HA, Provenzano F. New species of *Leporinus*  
 1150 (Characiformes: Anostomidae) from the highlands of the Guiana Shield in  
 1151 Venezuela. Neotrop Ichthyol. Forthcoming 2019.

1152

1153 **Note:** You must cite only if the paper is about to be published.

1154 **Reports and other Government Publications**

1155

1156 Eayrs S. A Guide to bycatch reduction in Tropical shrimp-trawl fisheries  
 1157 [Internet]. Rome; 2007. Available from:  
 1158 www.fao.org/docrep/015/a1008e/a1008e.pdf  
 1159

1160 International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN). International  
 1161 code of zoological nomenclature. 4th ed. London: International trust for  
 1162 zoological nomenclature Natural History Museum [Internet]. London; 1999.  
 1163 Available

1164 from: [https://www.iczn.org/the-code/the-international-code-of-zoological-](https://www.iczn.org/the-code/the-international-code-of-zoological-nomenclature/)  
 1165 [nomenclature/](https://www.iczn.org/the-code/the-international-code-of-zoological-nomenclature/)

1166

1167 International Union for Conservation of Nature (IUCN). Standards and  
 1168 petitions subcommittee. Guidelines for using the IUCN Red List categories  
 1169 and criteria. Version 13 [Internet]. Gland; 2017. Available  
 1170 from: <http://cmsdocs.s3.amazonaws.com/RedListGuidelines.pdf>

1171 **Thesis**

1172

1173 Oliveira AG. Predizendo impactos das mudanças climáticas sobre a diversidade  
 1174 funcional de peixes de água doce: um panorama "down under". [PhD Thesis].  
 1175 Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2018. Available from: [http://nou-](http://nou-rau.uem.br/nou-rau/document/?code=vtls000228862)  
 1176 [rau.uem.br/nou-rau/document/?code=vtls000228862](http://nou-rau.uem.br/nou-rau/document/?code=vtls000228862)

1177 **Note:** You must provide a hyperlink when available.

1178

1179 Figueiredo PICC. Decifrando a relação evolutiva entre *Gymnogeophagus*  
 1180 *labiatus* (Hensel, 1870) e *Gymnogeophagus lacustris* Reis & Malabarba 1988  
 1181 (Cichlidae: Geophagini). [Master Dissertation]. Porto Alegre: Universidade  
 1182 Federal do Rio Grande do Sul; 2018.

1183

**Webpages**

1184 Fricke R, Eschmeyer WN, Van der Laan R. Eschmeyer's catalog of fishes:  
 1185 genera, species, references [Internet]. San Francisco: California Academy of  
 1186 Science; 2019. Available

1187 from: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcat>  
 1188 [main.asp](http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcat)

1189

**Taxonomic style instructions**

1190 This summary provides information specific to taxonomic manuscripts. For large  
 1191 taxonomic revisions and reviews, see additional recommendations below. Items

1192 with \* are required, others are recommended whenever applicable.  
 1193 Taxon accounts should be in alphabetical order. For original descriptions, the  
 1194 words “**new genus**” or “**new species**” should appear after the name of the new  
 1195 genus or species, preceded by a comma.  
 1196 The designation also must appear in the caption of the holotype’s figure, in  
 1197 the case of a new species. For species mentioned in the Diagnosis section but for  
 1198 which no comparative material was examined, please formally cite their original  
 1199 descriptions and provide the full references.  
 1200

1201 **Note:** Prior to submitting a description of a new taxon, please register new  
 1202 nomenclatural act(s) and the paper (as unpublished manuscript) at URL:  
 1203 <http://zoobank.org/> and provide both the pub and the nomenclatural act codes  
 1204 just below the new taxon name. *E.g.:*

1205  
 1206 urn:lsid:zoobank.org:pub:XX9XX9XX-X1X2-99XX-9X19-  
 1207 9XXX0XX99X12

1208  
 1209 urn:lsid:zoobank.org:act:XX9XX9XX-X1X2-99XX-9X19-9XXX0XX99X12

1210  
 1211 **Note:** The pub number is only one for each manuscript, but, in case of more  
 1212 than one nomenclatural act, provide all the numbers.

1213  
 1214 **Note:** After publication, you must update the ZooBank article status from  
 1215 unpublished to published. This must be done by the author who made the initial  
 1216 registration.

## 1217 **Generic accounts**

1218  
 1219 Order of presentation:

1220 ***Genus* Author, year (or new genus; do not abbreviate) (bolded and**  
 1221 **centered)**

1222  
 1223 urn:lsid:zoobank.org:act:XX9XX9XX-X1X2-99XX-9X19-9XXX0XX99X12  
 1224 (in case of new genus only) (centered)

1225

1226 **Synonymy. Type species.\*Diagnosis.\* Description.\***

1227 **Etymology.** for new genus only **\*Remarks.**

1228 **Key to species.**

1229  
 1230 Comments on the above:

1231 **Synonymy**

1232  
 1233 Provide a complete synonymy listing all validly published names that have  
 1234 been applied to the genus, including all references in systematic treatments or

1235 identification guides that can help link the present concept of the genus to past  
 1236 concepts. The senior synonym is usually the correct and valid name. If  
 1237 applicable, include invalid names and mistakes in identity with suitable  
 1238 annotation to indicate their nature. For each name listed, include minimally:  
 1239 the original form of the name; the author and date of publication; reference and  
 1240 page number; basic information on the genus in the paper cited (modified from  
 1241 Wiley EO, Lieberman BS. *Phylogenetics: theory and practice of Phylogenetic*  
 1242 *Systematics*. 2nd edition. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2011). Provide full  
 1243 references of all listed sources as part of the References section. If applicable,  
 1244 discuss the synonymy and cite relevant literature in the Remarks section. *E.g.*:

1245

1246

**Type-species**

1247

1248

1249

1250

1251

1252

1253

1254

For proposed new genera, the original name of the proposed type- species,  
 followed by author and year of publication (or new species) insufficient. For  
 previously proposed generic names, the following additional information is  
 required (in this order): Nature of type designation (*e.g.*, original designation,  
 monotypy, absolute tautonymy, etc). Whether the type-species was not  
 designated in the original publication, the author, year and page of the  
 subsequent designation should be cited (*e.g.*, Type by subsequent designation by  
 Jordan, 1919: 45).

1255

**Diagnosis**

1256

1257

1258

1259

1260

1261

Diagnosis should NOT be written in telegraphic style (for purposes of clarity). A  
 generic diagnosis should preferably list the unique synapomorphies of the genus,  
 followed by homoplastic derived characters and/or other useful distinguishing  
 characteristics.

1262

1263

1264

**Description**

In telegraphic style (*i.e.*, no verbs nor articles).

1265

1266

1267

1268

1269

1270

**Etymology**

For new names, state the gender, even though it may be obvious from the  
 construction. Do not give an etymology for preexisting names. If it is necessary  
 to discuss the etymology of an old name (for example, to justify an interpretation  
 of its gender), include that in the Remarks section.

1271

1272

1273

1274

1275

**Key to species**

If a key for identification of species is provided and it was not mentioned in the  
 title, add “dichotomous key” or “identification key” as a keyword.

1274

1275

**Specific accounts**

Order of presentation:

1276

1277

1278

1279

1280

**Synonymy.**

**Holotype.\*** for new species only; include full collection data  
 (seed details, below)

**Paratype(s).** for new species only; include full collection data (see  
 details, below)

- 1281 **Non-types.** for new species only; include reduced collection data (see  
 1282 details, below) (Justification for separating non-types from types  
 1283 should be provided in the Material and Methods section)  
 1284 **Diagnosis.\*** see below for instruction on how to prepare a species  
 1285 diagnosis  
 1286 **Description.\***  
 1287 **Coloration in**  
 1288 **alcohol.\***  
 1289 **Coloration in life.**  
 1290 **Sexual dimorphism.**  
 1291 **Geographical**  
 1292 **distribution.\* Ecological**  
 1293 **notes.**
- 1294 **Etymology.** for new species only\*  
 1295 **Conservation status.** for new species  
 1296 only\***Remarks.**
- 1297  
 1298 **Material examined.** for accounts of previously named  
 1299 species  
 Comments on the above:
- 1300 **Synonymy**  
 1301  
 1302 Provide a complete synonymy listing all validly published names that have  
 1303 been applied to the species, including all references in systematic treatments or  
 1304 identification guides that can help link the present concept of the species to past  
 1305 concepts. The senior synonym is usually the correct and valid name. If  
 1306 applicable, include invalid names and mistakes in identity with suitable  
 1307 annotation to indicate their nature. For each name listed, include minimally:  
 1308 the original form of the name; the author and date of publication; reference and  
 1309 page number; country or basin and basic information on the species in the paper  
 1310 cited (modified from Wiley EO, Lieberman BS. *Phylogenetics: theory and*  
 1311 *practice of Phylogenetic Systematics*. 2nd edition. Hoboken:  
 1312 Wiley-Blackwell; 2011). Provide full references of all listed sources as part of  
 1313 the References section. If applicable, discuss the synonymy and cite relevant  
 1314 literature in the Remarks section. *E.g.:*  
 1315  
 1316 *Parodon caliensis* Boulenger, 1895
- 1317  
 1318 *Parodon caliensis* Boulenger, 1895:480 (original description; type- locality:  
 1319 near Cali, Colombia). —Eigenmann, 1922(reprint 1976):109 (*partim*; Paila, río  
 1320 Cauca basin; diagnosis in key). —Miles, 1943:47 (río Cauca; redescription). —  
 1321 Miles, 1947:132 (río Magdalena; meristics). —Roberts, 1974b:416 (osteology;  
 1322 osteological illustrations). —Roberts, 1975:269 (dentition).  
 1323  
 1324 *Parodon saliensis* [sic]. —Roberts, 1975:269 (dentition).



1325  
1326 *Parodon Parodon caliensis*. —Géry, 1977:203 (diagnosis in key).

1327 **Note:** Precede each quotation with an **m-dash** (Type an m-  
1328 dash using **Shift-Option-hyphen** on a Mac. In Windows, use **ALT +0151**).  
1329

### 1330 **Type-material**

1331 For new species, list types separately from other comparative material examined.  
1332 Indicate when you have cleared and stained (c&s) specimens or genetic  
1333 sequences in some online depository. Type specimens for which common  
1334 barcoding sequences are available (*e.g.* COI, Cytb, 12S, 16S) at an online  
1335 depository should be indicated clearly either in a table or in the text of the  
1336 Holotype or Paratype(s) sections. In either case the following should be  
1337 included: The museum acronym and lot number, the maker gene/locus (*e.g.*  
1338 COI), the name of the depository (*e.g.* GenBank), and the depository accession  
1339 number. Studies that include multiple sequences for phylogenetic or other  
1340 analyses should list these along with the depository name and accession number  
1341 in a table or supplementary document (see GENETICSEQUENCES in Author  
1342 Instructions). It is acceptable for authors to indicate sequences in online  
1343 depositories as “pending”, but following acceptance of a manuscript, these  
1344 numbers must be made available as a condition for final publication. *E.g.:*  
1345

1346 Group paratypes by country or basin, in alphanumeric order of museum acronym  
1347 and catalog numbers inside each group. Include full collection data, in the  
1348 following order:

1349  
1350 Museum acronym and catalog number, number of specimens (except for  
1351 holotype), size range separated by an **n-dash** (to automatically create n-dash in  
1352 Word type “something – something” (*number-space-hyphen-space-number*),  
1353 number and size range of measured specimens, if different (in parentheses along  
1354 with size range) locality (country, state, municipality, locality, basin,  
1355 coordinates), date of collection [in dd, Month (3 letter abbreviation) and yyyy],  
1356 and collector(s). *E.g.:*

1357  
1358 Paratypes. LIRP 5640, 25, 38.5–90.3 mm SL (12, 75.0–90.3 mm SL),  
1359 Brazil, São Paulo, Município de Marapoama, rio Tietê basin, ribeirão Cubatão at  
1360 road between Marapoama and Elisiário, 21°11'35"S 49°07'22"W, 10 Feb 2003,  
1361 A. L. A. Melo.

1362  
1363 **Note:** Except in cases where no actively-curated scientific research collection  
1364 exists, Holotypes must be deposited in collections in the country of origin of the  
1365 species. When a species occurs in multiple countries, the holotype must be  
1366 deposited in the country of the type-locality, with paratypes distributed among  
1367 countries in which the species occurs. Even in cases of species endemic to one  
1368 country, we encourage dissemination of paratypes.

### 1369 **Diagnosis**

1370 Do NOT write the diagnosis in telegraphic style (for purposes of clarity). A

1371 species diagnosis is typically a paragraph constructed of full sentences that list  
 1372 the most important traits that allow the reader to unequivocally identify the  
 1373 species. Ideally, the diagnosis includes one or more features that are unique to  
 1374 the species, preferably autapomorphic characters. If unique features were not  
 1375 discovered, thenext best option is a differential diagnosis, within which a series  
 1376 of direct comparisons are made among species and the alternative character  
 1377 states specified by contrasts are stated explicitly (using "vs." followed by the  
 1378 condition found in the species, or group of species, being compared, for each  
 1379 diagnostic feature). Diagnoses that consist only of a combination of characters  
 1380 (*i.e.*, traits listed sequentially  
 1381

1382 which, when considered together, distinguish the species from congeners) should  
 1383 be avoided.

1384  
 1385 **Note:** In the event of listing species in the diagnosis without associated  
 1386 comparative material, please formally cite their original descriptions and provide  
 1387 full references.  
 1388

### 1389 **Description**

1390 Write the description section in telegraphic style (*i.e.*, without verbs and  
 1391 articles). Treat bilaterally paired structures in the singular (*e.g.*, pelvic fin short,  
 1392 not pelvic fins short). Compound adjectives that include a noun should be  
 1393 connected by a hyphen (*e.g.*, pectoral-fin spine, NOT pectoral fin spine). Fin-ray  
 1394 formulae should be reported with unbranched rays in lower case Roman  
 1395 numerals, spines in upper case Roman, and branched rays in Arabic numerals.  
 1396 Transitions between different types of rays should be indicated by a comma (,  
 1397 and not a plus sign (+), or dash (-). We treat the catfish spinelet as a spine, so  
 1398 dorsal fin counts that include a spinelet should be reported as II,6 (or whatever  
 1399 the branched ray count is). *E.g.:*

1400  
 1401 iii,7 or II,9. Not iii-7 or iii+7 (no spaces should be inserted after the comma).  
 1402

1403 **Note:** Do not include space between numerals and % (*e.g.*, 25%, not 25 %).  
 1404

### 1405 **Coloration**

1406 Write this section in telegraphic style (*i.e.*, without verbs or articles). This section  
 1407 may be divided into Coloration in alcohol and Coloration in life.

### 1408 **Geographic distribution**

1409 Geographic descriptors must NOT be translated and should be capitalized or not  
 1410 according to the standard usage in the language in question. English usage  
 1411 typically uses capitals (*e.g.*, Amazon River, Parana River, Paraguay River) while  
 1412 Portuguese and Spanish do not (*e.g.*, rio Solimões, río Magdalena, rio Paraná,  
 1413 río Parana, río Paraguay, rio Paraguai). When referring to a municipality or  
 1414 geopolitical region that includes the names of a water body, capitalize the entity  
 1415 as a proper noun in all languages (*e.g.*, Municipality of Arroio dos Ratos, State  
 1416 of Rio Grande do Sul).

1417

1418

**Etymology**

1419

1420

1421

1422

1423

1424

1425

1426

For new names, state the usage (adjective, noun, patronym, etc.), even though it may be obvious from the construction. For more information, see article 31 of the online International Code of Zoological Nomenclature (<https://www.iczn.org/the-code/the-international-code-of-zoological-nomenclature/the-code-online/>). Do not provide an etymology for preexisting names, unless the etymology is necessary to justify the spelling. In such cases, include this information in the Remarks Section and not as a separate heading.

**Conservation status**

1427

1428

1429

Please consider providing the conservation status, at least for newspecies, based on the IUCN criteria and categories. *E.g.*:

1430

1431

1432

1433

1434

1435

**Conservation status.** Provide information on the conservation status assessment and finalize with... According to the International Union for Conservation of Nature (IUCN) categories and criteria (IUCN Standards and Petitions Subcommittee, 2017 [or later]), *Genus species* can be classified as Category (category abbreviation)].

1436

1437

**Note:** In such case, provide the full reference in the References.

1438

**Material examined**

1439

1440

1441

1442

1443

1444

1445

Provide only taxa, museum acronym, catalog number, number of specimens and size range. Indicate any types by: (Holo- Syn-, etc.) type of *Genus species* Author, date. For lectotypes or neotypes, also cite the source of designation. Specimen lots should be arranged taxonomically, and then by country or basin (in bold), in alphanumeric order of museum acronym and catalog numbers inside each group proposed. *E.g.*:

1446

1447

*Auchenipterichthys coracoideus*: **Peru**: CAS 220574, 2, 104.0–107.0mm SL, syntypes of *Trachycorystes coracoideus* Eigenmann, Allen, 1942).

1448

1449

1450

1451

1452

**Note:** Deviation from this order is permissible only if an alternate arrangement shortens the text. If another arrangement is chosen, its use must be explained and justified in the Material and Methods section.

List material of non-focal species as **Comparative material examined**, using the same rules of arrangement stated above.

1453

**Large taxonomic revisions and reviews**

1454

1455

1456

1457

1458

1459

1460

1461

1462

Before presenting the taxonomic accounts, provide a table at the beginning, cited early, that lists all the species included in the revision that are new and those that are being redescribed. Taxon accounts can be arranged in two ways: presenting the new species descriptions first (in alphabetic order) and then the redescribed species (in alphabetic order), OR reporting all the species in alphabetic order without separating new and redescribed ones. In either case, mentioning the words **new genus** or **new species** after the name of each new taxon presented, preceded by a comma. The chosen order of presentation should focus on brevity and comprehensibility.

1463      **Further information:** Contact the Editor at [neoichth@nupelia.uem.br](mailto:neoichth@nupelia.uem.br).  
1464  
1465  
1466  
1467  
1468  
1469  
1470  
1471  
1472  
1473