



**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA  
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO “MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL”**

**DÉBORAH GAIDO ARAGÃO**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR (DNA *BARCODING*) E VARIABILIDADE  
GENÉTICA EM *Leporinus piau* (CHARACIFORMES: ANOSTOMIDAE) DE  
BACIAS HIDROGRÁFICAS DO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL.**

**SÃO LUÍS/MA  
2015**

Déborah Gaido Aragão

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR (DNA *BARCODING*) E VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Leporinus piau* (CHARACIFORMES: ANOSTOMIDAE) DE BACIAS HIDROGRÁFICAS DO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL.**

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

Área de concentração: Conservação e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Claudene Barros

**SÃO LUÍS - MA  
2015**

A659i Aragão, Déborah Gaido

Identificação molecular (DNA barcoding) e variabilidade genética em leporinus piau (characiformes: anostomidae) de bacias hidrográficas do Estado do Maranhão, Brasil / Déborah Gaido Aragão\_São Luís: UEMA, 2015.

54f.

Orientador: Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Maranhão, Mestrado em Ciência Animal.

1. Peixes. 2. Nordeste. 3. Haplogrupos. 4. Distância genética. 5. Pindaré. I. Aragão, Déborah Gaido II. Título.

CDU 597(812.1)

Déborah Gaido Aragão

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR (DNA *BARCODING*) E VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Leporinus piau* (CHARACIFORMES: ANOSTOMIDAE) DE BACIAS HIDROGRÁFICAS DO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração: Conservação e Reprodução Animal.

APROVADA EM: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**



---

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



---

Profa. Dra. Ligia Tchaicka – Membro  
Doutorado em Genética e Biologia Molecular  
Universidade Estadual do Maranhão - CECEN/UEMA



---

Profa. Dra. Zafira da Silva de Almeida - Membro  
Doutorado em Zoologia  
Universidade Estadual do Maranhão - CECEN/UEMA



---

Profa. Dra. Maria Claudene Barros - Suplente  
Doutorado em Ciências Biológicas  
Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA

**SÃO LUÍS - MA  
2015**

*Dedico esta dissertação aqueles que com muito amor e paciência me servem de exemplo e dão forças a buscar meus sonhos: meu pai Adão Ximenes (in memoriam) e a minha querida mãe Aurea. Amo vocês...*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, e por me conceder a oportunidade e me dar forcas para trilhar este caminho;*

*Ao Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga por ter aceitado orientar esta pesquisa;*

*Ao Prof. Dra. Maria Claudene Barros por suas contribuições e amizade ao longo destes anos;*

*Ao curso de Mestrado em Ciência Animal (CMCA/UEMA) por mais esta formação;*

*À FAPEMA pela bolsa de estudo concedida, tornando possível a realização do curso de mestrado;*

*A minha querida e amada mãe Aurea Gaido Lima, e ao meu estimado pai Adão Ximenes Aragão (in memoriam) por todo apoio, dedicação, pelo amor incondicional, pelo exemplo e por todo ensinamento, o meu muito OBRIGADA!!! Amo vocês;*

*A minha "princesinha" Alice Cattleya, por seu amor e carinho que nos mais singelo gesto de amor demonstrado num afetuoso abraço, e nas mais doces e agradáveis palavras aos meus ouvidos "Mamãezinha linda" me deram forcas a seguir, amenizado os momentos de tristezas;*

*Ao meu esposo Nethonio Bezerra, pelo apoio, carinho e amor, por sempre está comigo nos momentos mais difíceis, me encorajando seguir sempre em frente. Te amo!!!*

*A toda minha família, por estar sempre na torcida para que eu consiga vencer todos os obstáculos no caminho, por me amar e principalmente entender minha ausência;*

*Aos colegas de turma do CMCA pela amizade, companhia e momentos alegres durante nossas aulas;*

*À Nathália Pereira e Cicero Alves pela amizade, carinho, apoio e toda ajuda concedidos, sempre prestativos e disponíveis para qualquer coisa que precisei durante a realização do mestrado. Muito OBRIGA!!!*

*Ao colega Talles Caminha que abriu suas portas e me recebeu sempre de braços abertos, ajudando em minhas idas e vindas;*

*Aos amigos e companheiros do GENBIMOL (Laboratório de Genética e Biologia Molecular) pelos momentos de descontração e alegrias, que tornaram a rotina do laboratório menos cansativa;*

*Ao professor Dr. José Luiz Olivan Birindelli pela oportunidade concedida e orientação durante o estágio desenvolvido no MZUEL, que foi de fundamental importância para o desenvolvimento desta pesquisa. MUITO OBRIGADA, você foi dez;*

*Ao meu amigo Ronsone Oliveira, pelo o apoio concedido durante as coletas realizadas nas bacias do rio Pindaré e Mearim. Muito Obrigada!!!*

*Aos amigos: Andrelina Alves, Adriana Conceição, Daniel Limeira, Maria Histelle, Mauriane Nathalia e Walna Micaelle, pelo auxílio imprescindível nesta etapa. Valeu galera;*

*Não posso esquecer aqueles que acreditaram na realização deste trabalho, me apoiando e dando forças nos momentos em que fracassei.*

*E a todos que de forma direta e indireta colaboraram para o bom desenvolvimento deste trabalho.*

*"Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos (Vinícius de Moraes)."*

*A todos, muito obrigada!!!*



*"A evolução, como mecanismo, pode e deve ser real. No entanto, não nos diz nada acerca da natureza de seu criador. Para quem acredita em Deus, agora existem motivos para ter mais, e não menos, admiração."*

*Francis S. Collins*

## RESUMO

A família Anostomidae compreende 12 gêneros e aproximadamente 140 espécies válidas. Nesta família o gênero *Leporinus* inclui cerca de 90 espécies válidas, agrupando o maior número de táxons dentro da ordem Characiformes e o mais diversificado dentro da família anostomidae. A espécie *Leporinus piau* encontra-se amplamente distribuída em bacias hidrográficas da região Nordeste e apresenta padrões morfológicos bastante similares dificultando sua correta identificação. Portanto, neste estudo sequências do genoma mitocondrial e nuclear foram utilizadas para identificar e estimar os níveis de variabilidade genética de *Leporinus piau* e assim tentar solucionar as incertezas taxonômicas. O DNA foi isolado utilizando o protocolo de Fenol-clorofórmio, as regiões mitocondriais e a região nuclear foram amplificadas por PCR. Os produtos da PCR foram sequenciados usando o método didesoxiterminal no ABI 3500. Um total de 107 espécimes foram sequenciados para o gene rRNA 16S resultando na obtenção de um fragmento de 516 pb, 14 haplótipos e valor de diversidade haplotípica ( $h$ ) de 0.726 e nucleotídica ( $\pi$ ) de 0.012. A rede de haplótipos revelou três haplogrupos, dois formado por haplótipos das bacias dos Rios Itapecuru, Pindaré e Mearim, e outro formado por haplótipos da bacia do Rio Parnaíba. Os índices de distância genética entre os haplogrupos variaram de 1,9 a 2,9%. O resultado da AMOVA revelou alta estruturação entre as populações ( $F_{ST} = 0,648$ ) e entre os haplogrupos (0,951) com valor de  $p$  altamente significativo. Um fragmento de 622 pb do gene COI foi obtido para 103 espécimes resultando em, 17 haplótipos e elevados valores de diversidade haplotípica e nucleotídica ( $h = 0,819$  e  $\pi = 0,025$ ). A rede de haplótipos gerada evidenciou também a formação de três haplogrupos evolutivamente distintos com valores de distância genética variando de 3,6% a 7,5%. A AMOVA indicou que a maior parte da variação molecular (96,59%) ocorre entre os haplogrupos ( $F_{ST} = 0,965$ ) com valor de  $p$  altamente significativo. A análise filogenética obtida pelos dados mitocondriais gerou topologia similar agrupando fortemente os haplotipos em dois clados, o primeiro constituído pelo haplogrupo Parnaíba (haplótipos do Parnaíba) e o segundo formado pelos haplótipos dos Rios Itapecuru, Pindaré e Mearim, subdividido em dois haplogrupos (ITA/PIN/MEA-I e ITA/PIN/MEA-II). A comparação dos dados na plataforma BOLD Systems mostrou um percentual de similaridade de 98,84% com *L. piau* e de 99,16% com *L. friderici* para os espécimes oriundos da bacia do Parnaíba, para os exemplares provenientes das demais bacias, a similaridade encontrada variou de 97,17% a 100% com (*Leporinus* sp04, 06, 10 e 15) e de 99,17% a 99,34% com *L. friderici*. Para a região nuclear TROP foi obtido um fragmento de 250 pb para 120 indivíduos, revelando a ocorrência de 05 haplótipos. A rede de haplótipos evidenciou também a formação de três haplogrupos com valores de distância genética entre os haplogrupos variando de 0,8% a 2,1%. A análise de AMOVA também mostrou que a maior parte da variação molecular (96,54%) ocorre entre os haplogrupos ( $F_{ST} = 0,965$ ,  $P < 0.00001$ ). Nossos resultados confirmam um processo de estruturação genética para *L. piau*, sugerindo a existência de duas linhagens para os Rios Itapecuru, Pindaré e Mearim e uma terceira de ocorrência exclusiva na bacia do Rio Parnaíba.

**Palavras-chave:** Peixes, Nordeste, haplogrupos, Distância genética, Pindaré.

## ABSTRACT

The Anostomidae family comprises 12 genera and approximately 140 valid species. In this Family the genus *Leporinus* includes about 90 valid species, grouping the largest number of taxa within the Characiformes and most diverse in the anostomidae family. The species *Leporinus piau* is widely distributed in watersheds of the Northeast and presents very similar morphological patterns hindering their correct identification. Therefore, on this study sequences of mitochondrial and nuclear genome were used to identify and estimate the genetic variability levels of *Leporinus piau* so try to resolve the taxonomic uncertainties. The DNA was isolated using the Phenol-chloroform protocol, the mitochondrial and nuclear region regions were amplified by PCR. The PCR products were sequenced using the dideoxiterminal method on ABI 3500. A total of 107 specimens were sequenced for the rRNA gene resulting in obtaining of a fragment of 516 pb, 14 haplotypes and value of haplotype diversity (h) of 0.726 and the nucleotide ( $\pi$ ) of 0.012. The haplotype crossroad revealed three haplogroups two haplotypes formed by the basins of the Rivers Itapecuru, Pindaré and Mearim, and another formed by haplotypes of Parnaíba River basin. The rates of genetic distance between the haplogrupos ranged from 1,9 to 2,9%. The results of AMOVA revealed high structuring between the populations ( $F_{ST} = 0,648$ ) and between haplogroups (0,951) with highly significant p value. A fragment of 622 pb of the COI gene was obtained for 103 specimens resulting in 17 haplotypes and high haplotype diversity values and nucleotide ( $h = 0,819$  and  $\pi = 0,025$ ). The haplotypes crossroad generated also showed the formation of three distinct evolutionarily haplogrupos with genetic distance values ranging from 3,6% to 7,5%. The AMOVA indicated that most of the molecular variation (96,59%) occurs between haplogrupos ( $F_{ST} = 0,965$ ) with highly significant p value. The Phylogenetic analysis obtained by the mitochondrial data generated similar topology strongly grouping haplotypes into two clades, the first consisting of the haplogroup Parnaíba (haplotypes from Parnaíba) and the second formed by haplotypes from Rivers Itapecuru, Pindaré and Mearim, subdivided into two haplogroups (ITA/PIN/MEA-I e ITA/PIN/MEA-II). The comparison of the data in the BOLD Systems platform showed a percentage of 98.84% similarity to *L. piau* and 99.16% with *L. friderici* for specimens derived from the Parnaíba Basin, to the copies from the other basins, the found similarity ranged from 97,17% to 100% with (*Leporinus* sp04, 06, 10 e 15) and of 99,17% to 99,34% with *L. friderici*. For TROP core region was obtained a fragment of 250 pb to 120 individuals, showing the occurrence of 05 haplotypes. The haplotype crossroad also showed the formation of three haplogrupos with genetic distance values between haplogrupos ranging from 0,8% to 2,1%. The AMOVA analysis also showed that the most of the molecular variation (96,54%) occurs between haplogrupos ( $F_{ST} = 0,965$ ,  $P < 0.00001$ ). Our results confirm a process of genetic structure to *L. piau*, suggesting the existence of two strains for Rios Itapecuru, Pindaré and Mearim and a third of exclusive occurrence in the basin of Rio Parnaíba.

**Keywords:** Fish, Northeast, haplogroups, Genetic distance, Pindaré.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Espécie <i>Leporinus piau</i> Fowler, 1941.....	15
<b>Figura 2.</b> Localização das bacias hidrográficas onde foram obtidos os espécimes de <i>L. piau</i> .....	20
<b>Figura 3.</b> Porcentagem da frequência de bases nucleótídicas baseado em 516 pb de 107 seqüências do gene mitocondrial rRNA 16S.....	23
<b>Figura 4.</b> Rede de haplótipos gerada para <i>L. piau</i> provenientes de bacias hidrográficas do Maranhão com base no gene rRNA 16S.....	25
<b>Figura 5.</b> Número de transições (s) e transversões (v) versus divergência utilizando o algoritmo de Felsenstein (F84) para o fragmento do gene mitocondrial rRNA 16S.....	26
<b>Figura 6.</b> Árvore de haplotipo obtida através do método de Agrupamento de Vizinhos (NJ) com 1000 réplicas de <i>bootstrap</i> para o gene rRNA 16S através do algoritmo de Kimura 2-parâmetros. Da esquerda para direita seguem os valores de Máxima Parcimônia (MP) Máxima verossimilhança (ME) e Agrupamento de Vizinhos (NJ). Verde: haplogrupo Parnaíba; Azul: haplogrupo ITA/PIN/MEA-I; Vermelho: haplogrupo ITA/PIN/MEA-II.....	27
<b>Figura 7.</b> Porcentagem da frequência de bases nucleótídicas baseado em 622 pb de 104 seqüências do gene mitocondrial COI.....	29
<b>Figura 8.</b> Rede de haplótipos gerada para <i>L. piau</i> provenientes de bacias hidrográficas do Maranhão com base no gene COI.....	31
<b>Figura 9.</b> Número de transições (s) e transversões (v) versus divergência utilizando o algoritmo de Felsenstein (F84) para o fragmento do gene mitocondrial COI.....	32
<b>Figura 10</b> Árvore de haplotipo obtida através do método de Agrupamento de Vizinhos (NJ) com 1000 réplicas de <i>bootstrap</i> para o no gene COI do mtDNA. através do algoritmo de Kimura 2-parâmetros. Da esquerda para direita seguem os valores de Máxima Parcimônia (MP) Máxima verossimilhança (ME) e Agrupamento de Vizinhos (NJ). Verde: haplogrupo Parnaíba; Azul: haplogrupo ITA/PIN/MEA-I; Vermelho: haplogrupo ITA/PIN/MEA-II.....	33
<b>Figura 11</b> Identificação do gênero <i>Leporinus</i> (status taxonômico) baseado no gene COI.....	35
<b>Figura 12.</b> Porcentagem da frequência de bases nucleótídicas baseado em 250 pb de 120 seqüências do gene Nuclear TROP.....	37
<b>Figura 13</b> Rede de haplótipos gerada para <i>L. piau</i> provenientes de bacias hidrográficas do Maranhão com base no gene TROP.....	39
<b>Figura 14</b> Número de transições (s) e transversões (v) versus divergência utilizando o algoritmo de Felsenstein (F84) para o fragmento do gene nuclear TROP.....	39
<b>Figura 15</b> Árvore de haplotipo obtida através do método de Agrupamento de Vizinhos (NJ) com 1000 réplicas de <i>bootstrap</i> para gene nuclear TROP. através do algoritmo de Kimura 2-parâmetros. Da esquerda para direita seguem os valores de Máxima Parcimônia (MP) Máxima verossimilhança (ME) e Agrupamento de Vizinhos (NJ). Verde: haplogrupo Parnaíba; Azul: haplogrupo ITA/PIN/MEA-I ; Vermelho: haplogrupo ITA/PIN/MEA-II.....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Localidades de obtenção dos espécimes de <i>Leporinus piau</i> obtidos em bacias hidrográficas no estado do Maranhão.....	19
<b>Tabela 2.</b> Sequências e referências dos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos fragmentos mitocondriais e nuclear.....	21
<b>Tabela 3.</b> Descrição dos ciclos de cada região mitocondrial e nuclear amplificada na PCR.....	21
<b>Tabela 4.</b> Sequências obtidas do banco de dados GenBank.....	22
<b>Tabela 5.</b> Diversidade genética nos espécimes de <i>L. piau</i> com baseado em 516 pb do gene rRNA 16S.....	24
<b>Tabela 6.</b> Haplótipos de <i>L. piau</i> com suas respectivas frequências e localidades de coleta baseados no rRNA 16S.....	24
<b>Tabela 7.</b> Percentual de divergência nucleotídica baseada nos parâmetros de Kimura 2-Parâmetros e gerado através do programa MEGA para os haplótipos de <i>L. piau</i> através do gene rRNA 16S. com base nos parâmetros da distância <i>p</i> .....	27
<b>Tabela 8.</b> Resultados da AMOVA para populações de <i>L. piau</i> como dois grupos com base em sequências da região 16S.....	28
<b>Tabela 9.</b> Diversidade genética nos espécimes de <i>L. piau</i> baseado em 622 pb do gene Citocromo Oxidase I (COI).....	29
<b>Tabela 10.</b> Haplótipos de <i>L. piau</i> com suas respectivas frequências e localidades de coleta baseados no gene COI. ITA (Itapecuru), PIN (Pindaré), MEA (Mearim) e PAR (Parnaíba).....	30
<b>Tabela 11.</b> Percentual de divergência nucleotídica baseada nos parâmetros de Kimura 2-Parâmetros e gerado através do programa MEGA para os haplótipos de <i>L. piau</i> através do gene COI com base nos parâmetros da distância <i>p</i> .....	33
<b>Tabela 12.</b> Resultados da AMOVA para populações de <i>L. piau</i> como dois grupos com base em sequências da região COI.....	34
<b>Tabela 13.</b> Identificação molecular das amostras de <i>L. piau</i> das bacias Itapecuru, Pindaré, Mearim e Parnaíba realizada através de comparações das nossas sequências com sequências disponíveis na plataforma BOLDsystems para o gene COI.....	36
<b>Tabela 14.</b> Diversidade genética nos espécimes de <i>L. piau</i> baseado em 250 pb do gene TROP.....	38
<b>Tabela 15.</b> Haplótipos de <i>L. piau</i> com suas respectivas frequências e localidades de coleta baseados no gene TROP. ITA (Itapecuru), PIN (Pindaré), MEA (Mearim) e PAR (Parnaíba).....	38
<b>Tabela 16.</b> Percentual de divergência nucleotídica baseada nos parâmetros de Kimura 2-Parâmetros e gerado através do programa MEGA para os haplótipos de <i>L. piau</i> através do gene TROP com base nos parâmetros da distância <i>p</i> .....	40
<b>Tabela 17.</b> Resultados da AMOVA para populações de <i>L. piau</i> como dois grupos com base em sequências do DNA nuclear TROP.....	41

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1.Characiformes.....	14
1.2. Família anostomidae.....	14
1.3. Gênero <i>Leporinus</i> .....	15
1.4. A espécie <i>Leporinus piau</i> Fowler 1941.....	15
1.5. Variabilidade genética em <i>Leporinus piau</i> .....	16
2. Marcadores Moleculares.....	16
2.1. DNA mitocondrial: rRNA 16S, COI e nuclear TROP.....	16
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Geral.....	18
3.2. Específicos.....	18
4. MATERIAL E METÓDOS.....	19
4.1. Locais de coletas e Obtenção das amostras .....	19
4.2. Extração, Visualização e Diluição do DNA genômico.....	20
4.3. Amplificação e Sequenciamento do mtDNA (rRNA 16S, COI e nuclear TROP).....	20
4.4. Análise filogenéticas e Populacionais.....	21
5. RESULTADOS.....	23
5.1. Gene rRNA 16S.....	23
5.1.1. Análise do polimorfismo e Diversidade genética.....	23
5.1.2. Análises filogenéticas e Distância genética.....	26
5.1.3. Análise Molecular de Variança (AMOVA).....	27
5.2. Gene Citocromo Oxidase I (COI).....	28
5.2.1. Análise do fragmento e Diversidade genética.....	28
5.2.2. Análises filogenéticas e Distância genética.....	32
5.2.3. Análise Molecular de Variança (AMOVA).....	33
5.2.4. Análise no BOLD System ( <i>The Barcode of Life Data System</i> ).....	34
5.3. DNA Nuclear (TROP).....	37
5.3.1. Análise do fragmento e Diversidade genética.....	37
5.3.2. Análises filogenéticas e Distância genética.....	40
5.3.3. Análise Molecular de Variança (AMOVA).....	41
6. DISCUSSÃO.....	42
6.1. Gene rRNA 16S.....	42
6.2. Gene Citocromo Oxidase I (COI).....	43
6.3. Gene Nuclear (TROP).....	46
7. CONCLUSÕES.....	48
8. REFERENCIAS.....	49

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Ordem Characiformes**

Entre os Ostariophysi, os peixes da ordem Characiformes, exclusivamente de água doce encontram-se distribuídos nas Américas e na África, atingindo maior diversidade nas principais drenagens neotropicais (BUCKUP, 1998). A ordem Characiformes juntamente com a de Siluriformes, representam 85% da ictiofauna dos rios Neotropicais, na qual há um leve predomínio dos Characiformes. Segundo (NELSON, 2006), esta ordem compreende cerca de 18 famílias, 270 gêneros e aproximadamente 1700 espécies ocorrem na região Neotropical São peixes dominantes em ambientes de água doce da América do Sul ocorrendo mais da metade de suas espécies na Amazônia (SANTOS et al., 2004; CALCAGNOTTO et al., 2005). A ordem Characiformes inclui espécies de grande importância ecológica e econômica para o Brasil. São peixes de hábito predominantemente diurnos que apresentam grande variabilidade de hábitos alimentares (BURGER, 2008). Assim, há muitas espécies utilizadas na pesca comercial, esportiva e na aquicultura como os curimatás (Prochilodontidae), piaparas e pias (Anostomidae), traíras (Erythrinidae), pacus, tambaquis, dourados e matrinhãs. (Characidae). (CHAO et al., 2001).

### **1.2 Família Anostomidae**

A família Anostomidae compreende 12 gêneros e aproximadamente 140 espécies válidas (NELSON, 2006; BUCKUP et al., 2007), além de outras ainda em fase de descrição (BIRINDELLI & BRITSKI, 2009). Esta família encontra-se amplamente distribuída desde o Sul da América Central até o Norte da Argentina (SANTOS & JEGU, 1996). As espécies do grupo são facilmente reconhecíveis pelo corpo fusiforme, 3 ou 4 dentes grandes no pré-maxilar e dentário (maxilar sem dentes), escamas grandes e pouco numerosas (32 a 46 escamas perfuradas na linha lateral na grande maior das espécies, nadadeira anal curta (com menos de 10 raios ramificados, na grande maior das espécies) (GÉRY, 1977). Apresentam grande variação na posição da boca, como também, no padrão de colorido, composto desde manchas redondas no flanco, a faixas longitudinais, ou barras verticais (GARAVELLO & BRITSKI, 1987). Essas duas características são fortemente influenciadas pela ontogenia sendo possível encontrar formas diferenciadas de

posição da boca e padrão de coloração durante o desenvolvimento de uma mesma espécie (GARAVELLO, 1979; BIRINDELLI & BRITSKI, 2009).

### **1.3 Gênero *Leporinus* Agassiz, 1829**

O gênero *Leporinus* é um dos mais complexos da ordem Characiformes, uma vez que apresenta um grande número de espécies descritas, inclui cerca de 90 espécies válidas (GARAVELLO & BRITSKI, 2003; BIRINDELLI & BRITSKI, 2009; SIDLAUSKAS et al., 2011; FEITOSA et al., 2011). Segundo Géry (1977), *Leporinus* é um dos gêneros que agrupa maior número de espécies dentro da ordem Characiformes e o mais diversificado dentro da família anostomidae, ocorrendo desde a América Central ao Sul da América do Sul.

### **1.4 A espécie *Leporinus piau* Fowler, 1941**

A espécie *Leporinus piau* Fowler, 1941 (Figura 01) encontra-se amplamente distribuída em bacias hidrográficas da região Nordeste, sendo abundante em rios, riachos, lagos, lagoas e açudes do Nordeste brasileiro (BRITSKI et al., 1988). Esta espécie apresenta considerável importância na pesca artesanal e esportiva. É uma espécie bastante ágil de pequeno a médio porte que pode atingir acima dos 400 gramas de peso corporal (SAMPAIO & SATO, 2009). Apresenta hábito alimentar onívoro, sendo assim importante ecologicamente como peixe forrageiro com condições favoráveis para ser utilizada na piscicultura uma vez que aceita ração (GOMES & VERANI, 2003; ALVIM & PERET, 2004).





**Figura 1.** Espécie *Leporinus piau* Fowler, 1941

### 1.5. Variabilidade Genética em *Leporinus*

Estudar variabilidade genética de populações naturais utilizando marcadores moleculares pode contribuir na resolução de incertezas taxonômicas. Neste sentido, vários estudos têm sido realizados na tentativa de resolver problemas taxonômicos em diferentes grupos de peixes (ORTÍ et al., 2008; IERVOLINO et al., 2010; TERCENIO et al., 2012; CHENG et al., 2012; BORBA et al., 2013; TERCENIO et al., 2013; PEREIRA et al., 2013).

Estudos utilizando marcadores moleculares têm sido realizados em *Leporinus* (CHIARI & SODRÉ 1999; MARTINS et al., 2003; CALCAGNOTTO et al., 2005; FRAGA et al., 2014) a partir da análise de marcadores mitocondriais. Calcagnotto et al., (2005) realizaram um estudo com espécies do gênero *Leporinus* utilizando seis genes sendo dois do genoma mitocondrial (16S e Citocromo b) e quatro nucleares (TROP, RAG 2, Fkh e Sia). Em *Leporinus* da bacia do rio Itapecuru elevada diversidade haplotípica foi observada a partir da análise de sequências do gene mitocondrial rRNA 16S com valores moderados de distância genética (0,2 a 1,9%), reforçando a necessidade do esclarecimento desta problemática taxonômica neste grupo de peixes. (FRAGA et al., 2014).

## 2. Marcadores Moleculares

### 2.1 DNA mitocondrial: rRNA 16S, COI e nuclear TROP

O DNA mitocondrial dos animais é constituído de uma molécula circular de fita dupla, na qual são descritos 37 genes dos quais dois codificam RNAs ribossômicos, 13 codificam proteínas e 22 codificam a formação dos RNAs transportadores e uma região não codificadora chamada de região controle ou alça D (*D-loop*) (MEYER, 1993). Seu tamanho é de aproximadamente 16.000 pares de bases (BOORE, 1999).

Entre os marcadores moleculares do DNA mitocondrial, tem sido proposta a utilização de um fragmento do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) (*DNA barcoding*) como um sistema de identificação global (HERBET et al., 2004; HUBERT et al., 2008; WARD et al., 2005). Este gene é uma subunidade do complexo Citocromo Oxidase, que faz parte da cadeia transportadora de elétrons e tem sido utilizado com o objetivo de identificar espécies, possibilitar o estudo comparativo entre espécimes de posição taxonômica desconhecida, aumentar a descoberta de novas espécies e como ferramenta de auxílio em filogenética e catalogação da biodiversidade (ROSA & PAIVA, 2009).

O gene 16S rRNA faz parte da grande subunidade ribossomal do DNA mitocondrial assim como o 12S rRNA (PALUMBI et al., 1996). As sequências desse gene são razoavelmente conservadas, e tem se mostrado como um bom marcador na diferenciação de peixes, como também em estudos comparativos intergenéricos e interespecíficos (SANTOS et al., 2003; CALCAGNOTTO et al., 2005; FRAGA et al., 2007; FRAGA et al., 2014). O uso desses genes tem sido utilizado com sucesso em estudos filogenéticos de diversos grupos de vertebrados, como em peixes, pois existe uma considerável variação em algumas espécies (CALCAGNOTTO et al., 2005).

O gene nuclear  $\alpha$ -tropomiosina é responsável pela produção de uma proteína “tropomiosina” (ALBERTS, et al. 1996). Alguns estudos filogenéticos têm sido realizados mostrando a utilidade e eficácia deste gene em diversos grupos de peixes (ORTÍ & MEYER, 1996; LOVEJOY E COLLETE, 2001; CALCAGNOTTO et al. 2005).

Na presente análise foram utilizados fragmentos de dois genes mitocondriais (16S rRNA e citocromo oxidase I) e um fragmento do gene nuclear (TROP). Portanto, neste estudo sequências do genoma mitocondrial e nuclear foram utilizadas para identificar e estimar os níveis de variabilidade genética de *Leporinus piau* e assim tentar solucionar as incertezas taxonômicas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

A presente proposta visa identificar e determinar os índices de variabilidade e distância genética de *Leporinus piau* visando contribuir para a correta identificação da espécie, deste modo, contribuindo para resolução de questões taxonômicas do grupo.

#### 3.2. Específicos

- Identificar e caracterizar os espécimes de *Leporinus piau* através de sequências do DNA mitocondrial dos genes rRNA e 16S e COI;
- Determinar os índices de variabilidade e distância genética das populações analisadas, utilizando sequências de DNA mitocondrial dos genes mitocondriais (rRNA 16S e COI) e nuclear (TROP);
- Testar a ocorrência de diferenciação e estruturação entre as populações analisadas;

### 4. MATERIAL E METÓDOS

#### 4.1. Locais de coletas e obtenção das amostras

Os espécimes de *Leporinus piau* foram coletados nas principais bacias hidrográficas do Maranhão: Itapecuru, Parnaíba, Mearim e Pindaré (Tabela 1 e Figura 2). Como instrumento de coleta foram utilizadas redes de emalhar de vários tamanhos de malha e tarrafas.

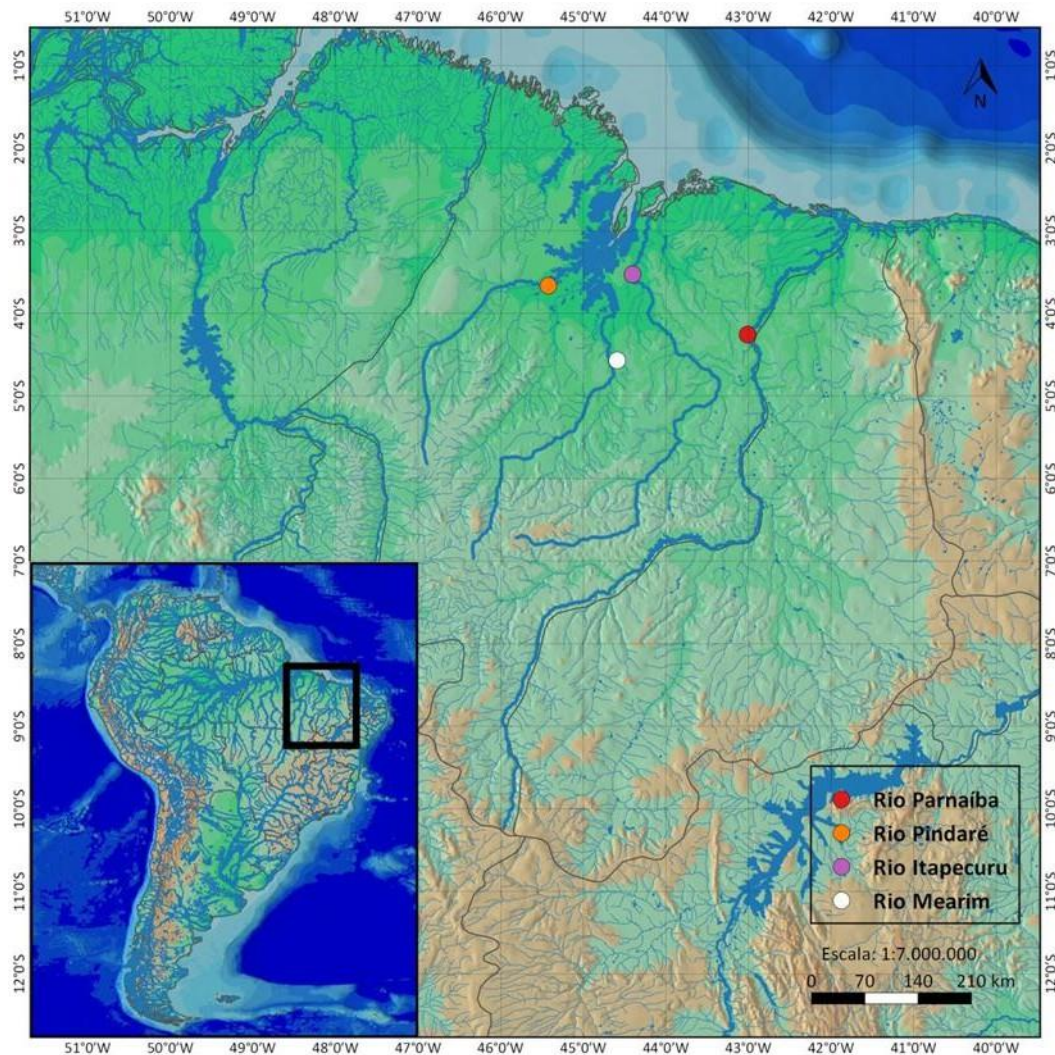
O material coletado foi devidamente triado, etiquetado e conservado em gelo para posterior transporte ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular - GENBIMOL, no Centro de Estudos Superiores de Caxias, Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA.

A identificação dos espécimes foi realizada através de literatura específica (FOWLER, 1941; BRITSKI et al., 1988; BRITSKI et al., 2012) e confirmada por especialista. Exemplares testemunhos foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo – MZUSP (MZUSP 104576) e na Universidade Estadual de Londrina - MZUEL (MZUEL /10530, MZUEL /10531 MZUEL /10534, MZUEL /10535, MZUEL /10532, MZUEL /10533). Amostras de tecido muscular foram retiradas de cada exemplar e conservadas em álcool a 90% para fins de caracterização molecular. Os demais espécimes foram fixados em formol a 10% e

encontram-se depositados no Laboratório de Genética e Biologia Molecular - CESC/UEMA. Todas as coletas foram devidamente autorizadas pelo IBAMA (Autorização nº. 02012.004159/2006, 42119-1/2013 e 46367-1/2014).

**Tabela 1.** Localidades de obtenção dos espécimes de *Leporinus piau* obtidos em bacias hidrográficas no estado do Maranhão.

Bacias hidrográficas	Localidades	Coordenadas Geográficas
Rio Itapecuru	Caxias	03°31'39"S 44°24'19"W
Rio Parnaíba	Teresina	04°15'24"S 43°00'46"W
Rio Mearim	Bacabal	04°34'08"S 44°35'31"W
Rio Pindaré	Pindaré-Mirim	03°39'54"S 45°25'31"W



**Figura 2.** Localização das bacias hidrográficas onde foram obtidos os espécimes

#### 4.2. Extração, Visualização e Diluição do DNA genômico

O DNA total foi extraído utilizando o protocolo de fenol-clorofórmio de Sambrook & Russel (2001) com algumas modificações. A qualidade do DNA extraído foi verificada por meio de uma eletroforese em gel de Agarose a 1%.

#### 4.3. Amplificação e Sequenciamento das regiões genômicas (rRNA 16S, COI e nuclear)

O isolamento e amplificação das regiões genômicas rRNA 16S, COI e TROP foi realizado através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando-se *primers* específicos. As sequências dos *primers* estão descritos na tabela 2. A PCR foi feita em um volume final de 25 µl, com os seguintes reagentes: 4 µl de dNTPs (1.25 M) (nucleotídeos), 2.5 µl de Buffer (10X), 0.5 µl de solução de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µl de DNA (250 ng/µl), 0.25 µl de cada primer (200 ng/µl), 0.2 µl da enzima Taq polimerase (5U/µl) e 16.3 de H<sub>2</sub>O purificada. Os parâmetros de amplificação de cada região encontram-se na tabela 3.

Os produtos das PCRs foram visualizados em gel de Agarose a 1% e purificados com ExoSAP-IT segundo o protocolo sugerido pelo fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada pelo método de Sanger et al. (1977). As amostras foram precipitadas em EDTA-Acetato de Sódio-Etanol e analisadas no sequenciador de DNA automático (ABI 3500/Life Technologies).

**Tabela 2.** Sequências e referências dos *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos mitocondriais. E nuclear

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>	<b>Referências</b>
<b>rRNA 16S</b>		
<b>16SL1 (forward)</b>	„5GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC3“	Palumbi et al. (1991)
<b>16SH2 (reverse)</b>	„5CCGGTCTGAACTCAGATCACGT3“	
<b>Citocromo Oxidase I</b>		
<b>COIF1 (forward)</b>	„5TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3“	Ward et al. (2005)
<b>COIR1 (reverse)</b>	„5TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3“	
<b>TROP</b>		
<b>TROP 1 (forward)</b>	„5GAGTTGGATCGGGCTCAGGAGCG3“	Friesen et al. (1999)
<b>TROP 2 (reverse)</b>	„5CGGTCGGCCTCTTCAGCAATGTGCTT3“	

**Tabela 3.** Descrição dos ciclos de cada região mitocondrial e nuclear amplificada na PCR.

<b>Primers</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Desnaturação</b>	<b>Anelamento</b>	<b>Extensão</b>
rRNA 16S	25	94°C/1 min	50°C/1 min	72°C/2 min
COI	35	94°C/30 s	54°C/30 s	72°C/1 min

TROP	30	95°C/30 s	60°C/30 s	72°C/45 s
------	----	-----------	-----------	-----------

#### 4.4. Análises Filogenéticas e Populacionais

As sequências foram alinhadas no CLUSTAL W 1.4 (THOMPSON et al., 1994) e ditadas no BIOEDIT 7.0 (HALL, 1999). Foram usadas como referência no alinhamento sequências de *L. piau* do GenBank (Tabela 5). As análises filogenéticas de Máxima Parcimônia (MP) foram geradas no programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). A escolha do modelo evolutivo mais adequado aos dados foi realizada pelo teste de razão de verossimilhança no MEGA 6.0, sendo selecionado o modelo evolutivo Kimura 2-parameter modelado pela distribuição gama para os três bancos de dados. O modelo selecionado foi usado para gerar a árvore de Máxima Verossimilhança (ML) e Agrupamento de Vizinhos (NJ), assim como para gerar a matriz de distância genética no programa MEGA 6.0. A significância dos agrupamentos foi estimada pela análise de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985). Foram utilizadas como grupo externo sequências de *Prochilodus nigricans* e *Caenotropus labyrinthicu* obtidas do GenBank (Tabela 4).

As análises populacionais foram realizadas nos softwares DNAsp 5.1 (ROZAS et al., 2010) e ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010). A Análise Molecular de Variância (AMOVA) foi realizada no software ARLEQUIN 3.5 para verificar a existência de diferenciação populacional em diferentes níveis hierárquicos. A divergência nucleotídica entre e dentro dos haplogrupos foram determinadas pela distância *p* não corrigida (rRNA 16S, COI e TROP) e pelos parâmetros corrigidos de Kimura 2-parameter (rRNA 16S e TROP) no MEGA 6.0. A relação entre os haplótipos foi inferida por meio da construção de uma rede de haplótipos não enraizada, obtida através do programa NETWORK 4.5.1.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>) usando o método de mediam-joining (BANDELT et al 1999).

Foi feita a comparação das sequências nucleotídicas obtidas neste estudo com as sequências do banco de dados do BOLD System v.3 (*The Barcoding of Life Data System* - [www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)) (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007) para verificar a identificação correta dos espécimes de *L. piau*.

**Tabela 4.** Sequências obtidas do banco de dados GenBank.

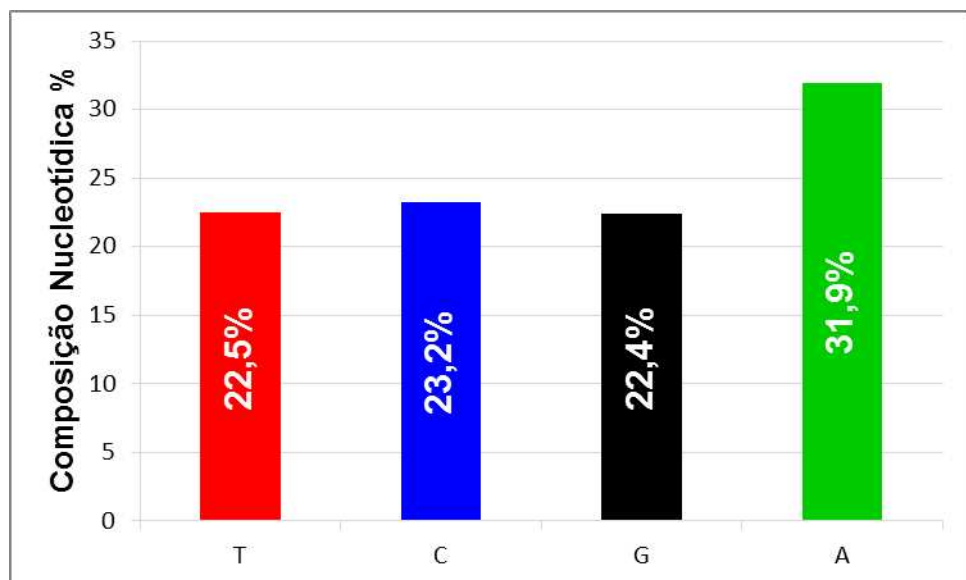
Análises	Espécie	Código de acesso (Genbank)		
		rRNA 16S	COI	TROP
Alinhamento	<i>Leporinus piau</i>	EU181564	HM405030	EU181682
Grupo externo	<i>Caenotropus labyrinthicus</i>	HQ171247	EU185614	EU181704
	<i>Prochilodus nigricans</i>	AY788075	FJA18758	AY817278

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Gene rRNA 16S

#### 5.1.1. Análise do polimorfismo do fragmento e Diversidade genética

Foram obtidas sequências de um fragmento do gene rRNA 16S do DNA mitocondrial para 107 espécimes de *Leporinus piau* distribuídos nas quatro bacias analisadas. O tamanho do fragmento obtido foi de 516 pb, com uma composição nucleotídica média de 31,9% para adenina, 23,2% para citosina, 22,4% para guanina e 22,5% para timina (Figura 03). Dos 516 pb, 488 foram conservados, 27 variáveis e 21 foram filogeneticamente informativos para parcimônia.



**Figura 3** - Porcentagem da frequência de bases nucleotídicas baseado em 516 pb de 107 sequências do gene mitocondrial rRNA 16S.

Um total de 14 haplótipos foi observado na análise conjunta das amostras, com uma diversidade haplotípica de 0,726 e nucleotídica de 0,012. Quando analisado isoladamente as populações observou-se que os maiores valores de

diversidade haplotípica ocorreram para as bacias do Pindaré e Itapecuru com 0,640 e 0,424, respectivamente (Tabela 5).

**Tabela 5.** Diversidade genética nos espécimes de *L. piau* baseado em 516 pb do gene rRNA 16S.

Populações	N	NH	S	Índice de Diversidade Molecular	
				H	$\pi$
Itapecuru	41	7	15	0,424	0,005
Pindaré	28	5	13	0,640	0,005
Parnaíba	7	1	0	0	0
Mearim	31	5	11	0,398	0,006
Populações agrupadas	107	14	27	0,726	0,012

**N** = número amostral **NH** = número de haplótipos **S** = sítios polimórficos **h** = diversidade haplotípica e  $\pi$  = diversidade nucleotídica

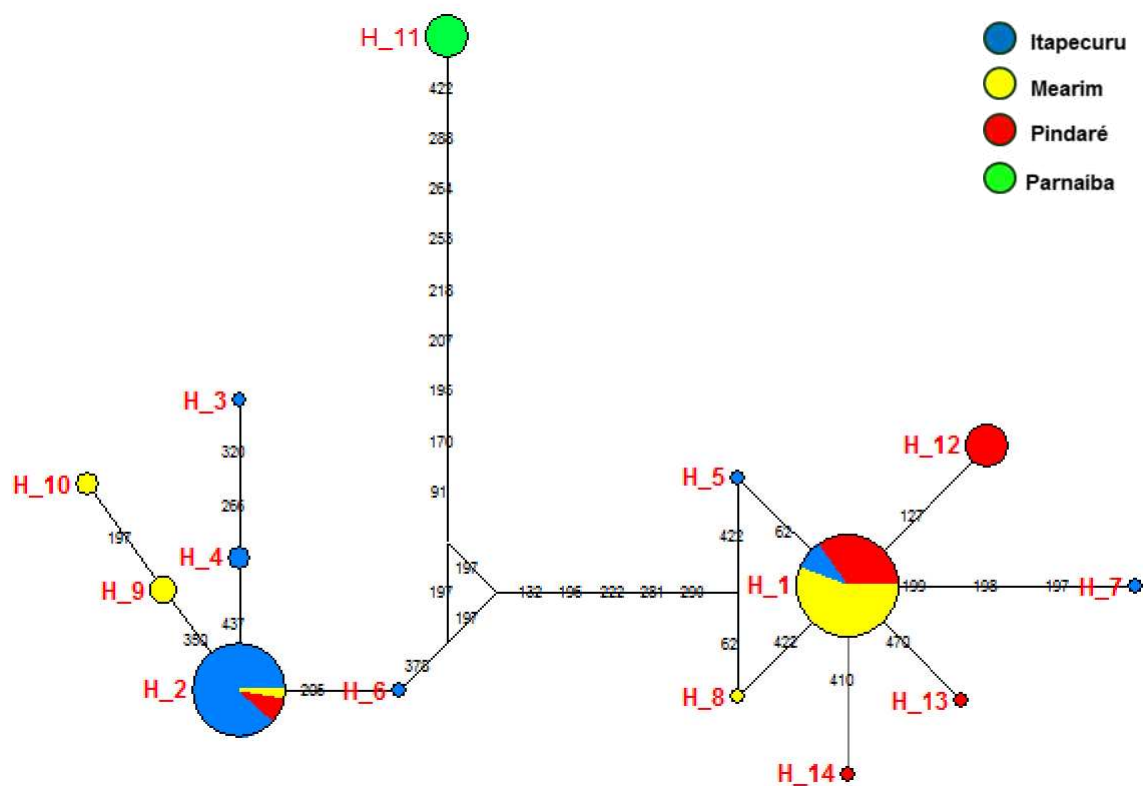
Dos 14 haplótipos encontrados os haplótipos H1 e H2 foram os mais frequente ocorrendo nas populações do Itapecuru, Pindaré e Mearim. Foram observados cinco haplótipos exclusivos para a população do Itapecuru (H3, H4, H5, H6 e H7), três para as populações do Pindaré (H12, H13 e H14) e Mearim (H8, H9 e H10) e um para a população do Parnaíba (H11) (Tabela 6).

**Tabela 6** Haplótipos de *L. piau* com suas respectivas frequências e localidades de coleta baseados no rRNA 16S. ITA (Itapecuru), PIN (Pindaré), MEA (Mearim) e PAR (Parnaíba).

Hap	Sítios informativos	População			
		ITA	PIN	MEA	PAR
	1111111122222222223334444				
	692379999900125668892571237				
	217205678957823461800080270				
H1_Lep147	ATTGACCCATTGGAATATACAATCGGG	04	15	24	-
H2_Lep151	G..A..TT..C..C...C.T..C.A..	31	03	01	-
H3_Lep01	G..A..TT..C..C..TC.TC.C.AA.	01	-	-	-
H4_Lep02	G..A..TT..C..C...C.T..C.AA.	02	-	-	-
H5_Lep30	G.....	01	-	-	-
H6_Lep46	G..A..TT.....C...C.T..C.A..	01	-	-	-
H7_Lep68	.....ATA.....	01	-	-	-
H8_Mea66	.....A..	-	-	01	-
H9_Mea353	G..A..TT..C..C...C.T.GC.A..	-	-	03	-
H10_Mea496	G..A..TA..C..C...C.T.GC.A..	-	-	02	-
H11_Palep12	GC.ATTTA...AACGC.CTT.....	-	-	-	07
H12_Lep122	..C.....	-	08	-	-
H13_Lep131	.....A	-	01	-	-
H14_Lep142	.....A..	-	01	-	-

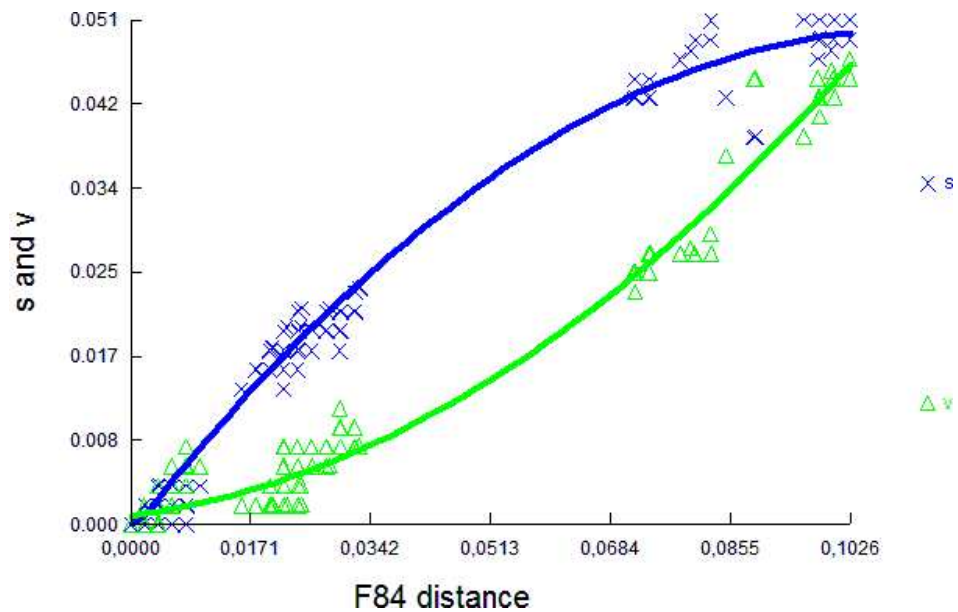


A análise dos haplótipos resultou em uma rede de haplótipos não enraizada, na qual os três haplogrupos foram definidos, sendo que os números representam à posição das mutações que separam os haplótipos, e o tamanho dos círculos é proporcional à frequência com que estes ocorrem. Os haplotipos mais frequentes (H1 e H2) foram compartilhados entre as bacias Itapecuru, Pindaré e Mearim evidenciando a ocorrência de dois haplogrupos diferentes separados por nove passos mutacionais. Observou-se ainda que as amostras do rio Parnaíba representada pelo haplótipo (H11) constituiu um haplogrupo diferenciado dos demais por 15 passos mutacionais (Figura 4).



**Figura 4.** Rede de haplótipos gerada para *L. piau* provenientes de bacias hidrográficas do Maranhão com base no gene rRNA 16S.

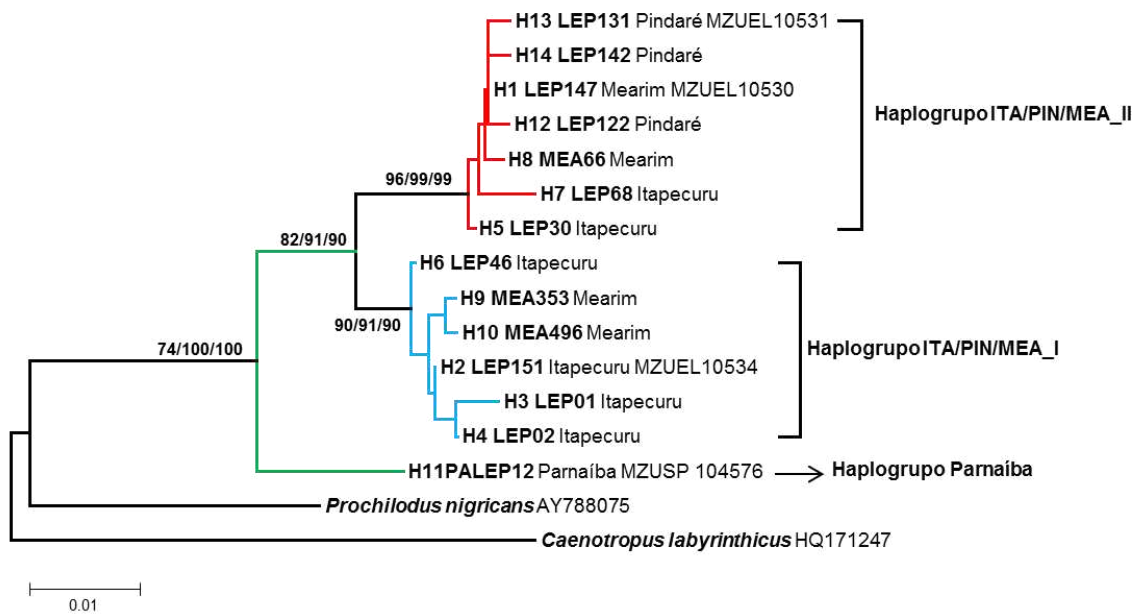
A taxa de transição e transversão versus divergência foi plotada no programa DAMBE e não mostrou saturação dos dados (Figura 5).



**Figura 5.** Número de transições (s) e transversões (v) versus divergência utilizando o algoritmo de Felsenstein (F84) para o fragmento do gene rRNA 16S.

### 5.1.2. Análises filogenéticas e distância genética

A reconstrução filogenética gerada por meio dos métodos de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (ML) e Agrupamento de Vizinhos (NJ) geraram árvores com topologias similares evidenciando três haplogrupos fortemente suportados, onde o clado I agrupou os exemplares da bacia do rio Parnaíba (haplogrupo/Parnaíba). O clado II agrupou os espécimes das bacias do Itapecuru, Pindaré e Mearim. Observou-se ainda que neste clado os espécimes de *L. piau* foram separados em dois haplogrupos (ITA/PIN/MEA-I e ITA/PIN/MEA-II) fortemente suportados, mostrando assim a existência de linhagens diferenciadas de *L. piau* (Figura 6).



**Figura 6.** Árvore de haplotipo obtida através do método de Agrupamento de Vizinhos (NJ) com 1000 réplicas de *bootstrap* para o gene rRNA 16S através do algoritmo de Kimura 2-parâmetros. Da esquerda para direita seguem os valores de Máxima Parcimônia (MP) Máxima verossimilhança (ME) e Agrupamento de Vizinhos (NJ). Verde: haplogrupo Parnaíba; Azul: haplogrupo ITA/PIN/MEA-I ; Vermelho: haplogrupo ITA/PIN/MEA-II

A matriz de distância genética obtida com o algoritmo de Kimura 2-parâmetros para o gene rRNA 16S do DNA mitocondrial é mostrado na tabela 7. A divergência nucleotídica variou de 1,9% a 2,9% sendo os maiores índices observados entre os haplogrupo/Parnaíba, clado I e o haplogrupo ITA/PIN/MEA-II, clado II. A distancia baseado nos parâmetros de distancia  $p$  evidenciou valores que variaram de 1,9% a 2,8%.

**Tabela 7.** Percentual de divergência nucleotídica baseada nos parâmetros de Kimura 2-Parâmetros e gerado através do programa MEGA para os haplótipos de *L. piau* através do gene rRNA 16S. com base nos parâmetros da distância  $p$  (acima do diagonal).

Haplogrupos	Divergência nucleotídica		
	1	2	3
1-Haplogrupo Parnaíba	-	2,4	2,8
2-Haplogrupo ITA/PIN/MEA-I	2,5	-	1,9
3-Haplogrupo ITA/PIN/MEA-II	2,9	1,9	-

### 5.1.3. Análise molecular de Variância (AMOVA)

A diferenciação genética entre as populações de *L. piau* estimada através do índice  $F_{st}$ , para detecção de variação dentro e entre as populações foi testada dois

níveis hierárquicos. O primeiro, considerando cada bacia como uma população. Nesta análise, observou-se maior variação entre as populações, ou seja, bacias analisadas com o  $F_{st}$  de 0,648 e  $p$  altamente significativo, evidenciando um processo de estruturação genética nessas populações (Tabela 8). No segundo considerando os haplogrupos, observou-se também que maior parte da variação genética encontrada está entre os grupos (95,17%) e não dentro dos grupos (4,83%), evidenciando uma forte diferenciação genética entre as amostras de *L. piau* analisadas.

**Tabela 8.** Resultados da AMOVA para populações de *L.piau* como dois grupos com base em sequências da região 16S.

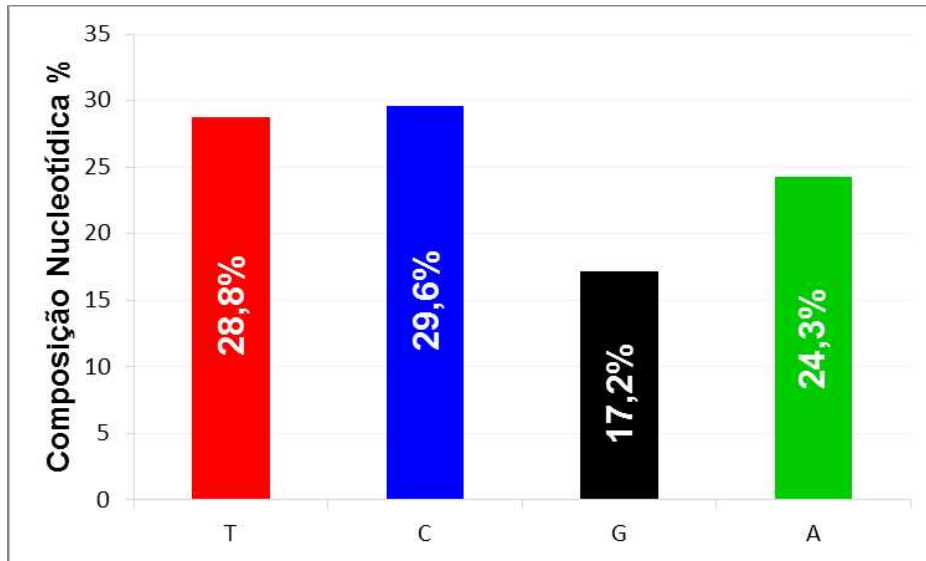
Tipos de Variação	Participação observada		$F_{ST}$	$P^*$
	Comp. de variação	% Variação		
<b>Bacias (rio Itapecuru, Pindaré, Mearim, Parnaíba)</b>				
Dentro das bacias	1,29305	35,10	0,648	<0,00001
Entres as bacias	2,39055	65,90		
<b>Haplogrupos (A, B E C)</b>				
Dentro dos haplogrupos	0,24808	4,83	0,951	<0,00001
Entre os haplogrupos	4,88532	95,17		

\*Valores de P calculados com 1.023 permutações aleatórias

## 5.2. Gene Citocromo Oxidase I (COI)

### 5.2.1. Análise do fragmento e Diversidade genética

O sequenciamento do gene Citocromo Oxidase I (COI) do DNA mitocondrial de 103 indivíduos de *L. piau* resultou em um fragmento de 622 pb com 560 sítios conservados, 62 variáveis e 58 informativos para parcimônia. A composição nucleotídica consistiu de 24.3% de adenina, 29.6% de citosina, 17.2% de guanina e 28,8% de timina (Figura 7).



**Figura 7.** Porcentagem da frequência de bases nucleotídicas baseado em 622 pb de 104 sequências do gene mitocondrial COI

Foi observado um total de 17 haplótipos, uma diversidade haplotípica de 0,819 e nucleotídica de 0,025. Quando analisado isoladamente as populações observou-se que os maiores valores de diversidade haplotípica ocorreram para as bacias do Mearim e Pindaré, com 0,828 e 0,724, respectivamente (Tabela 9).

**Tabela 09.** Diversidade genética nos espécimes de *L. piau* baseado em 622 pb do gene Citocromo Oxidase I (COI).

Populações	N	NH	S	Índice de Diversidade Molecular	
				H	$\pi$
Itapecuru	40	09	28	0,509	0,007
Pindaré	27	07	26	0,724	0,006
Parnaíba	7	01	0	0	0
Mearim	29	07	24	0,828	0,014
Populações agrupadas	103	17	61	0,819	0,025

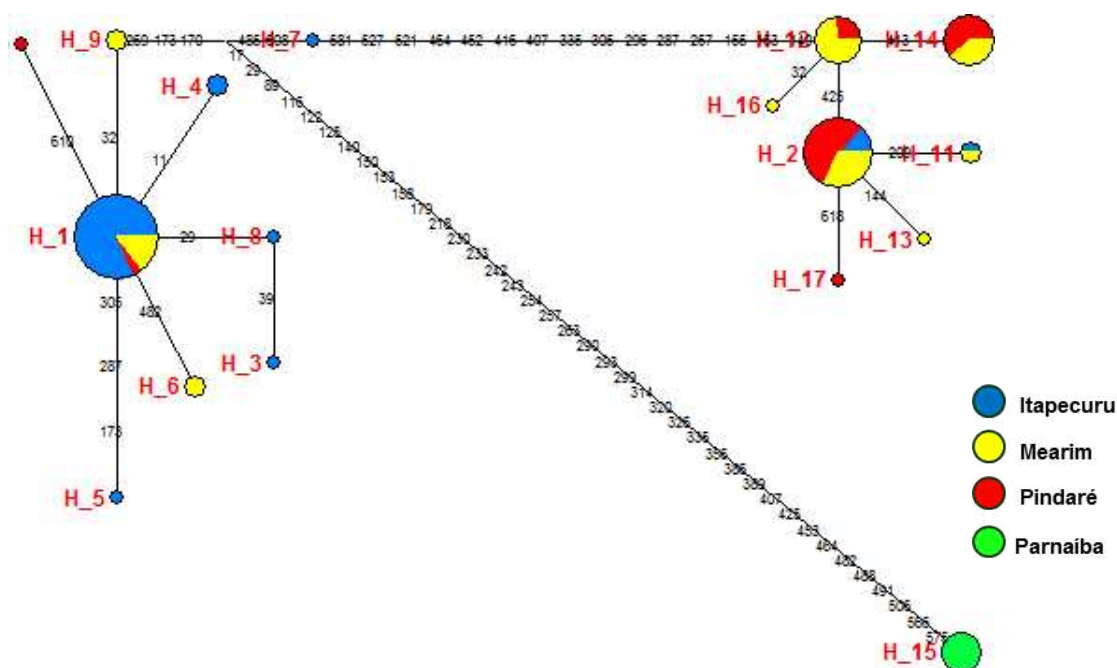
**N** = número amostral **NH** = número de haplótipos **S** = sítios polimórficos **h** = diversidade haplotípica e  **$\pi$**  = diversidade nucleotídica

Dos 17 haplótipos encontrados os haplótipos H1 e H2 foram os mais frequentes ocorrendo nas populações do Itapecuru, Pindaré e Mearim. Foram observados seis haplótipos exclusivos para a população do Itapecuru (H3, H4, H5, H6, H7 e H8), três para a população do Mearim (H9, H13 e H16), dois para a população do Pindaré (H10 e H17) um para a população do Parnaíba (H15) (Tabela 10).

**Tabela 10.** Haplótipos de *L. piau* com suas respectivas frequências e localidades de coleta baseados no gene COI. ITA (Itapecuru), PIN (Pindaré), MEA (Mearim) e PAR (Parnaíba).

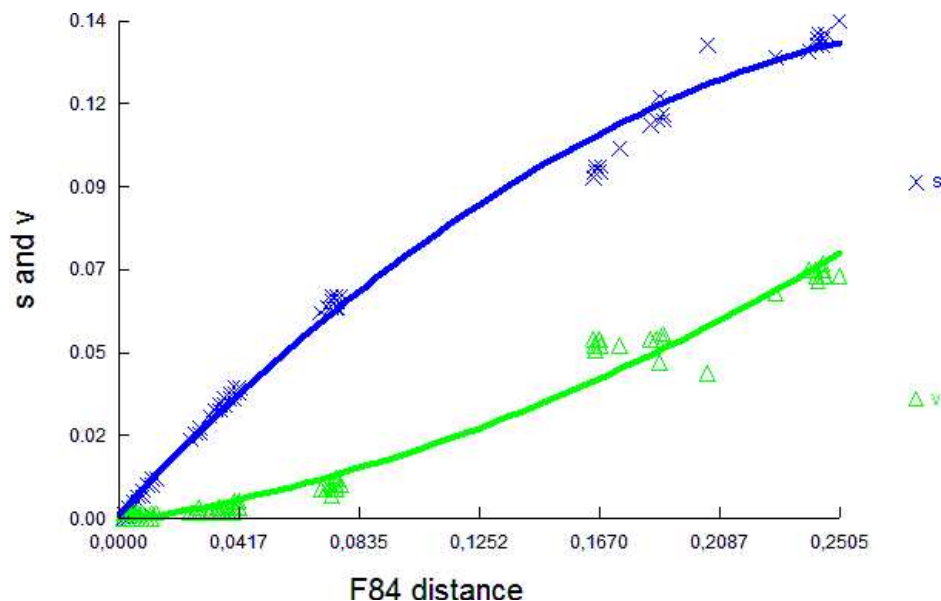
Hap	Sítios informativos	População			
		ITA	PIN	MEA	PAR
	111111111111122222222222222223333333334444444444455555666 1123381224455557770133445566899990122358801125568889022678011 1792996250403580399803234739703695406566973652342581617651808				
H1_Lep151	CTACGCAATTATACATGCCTCTACCAAATATGGTATTTTGTGTCTTTAGACCTATCGAATT	28	01	05	
H2_Lep51	...T...C..GT.CA.....G.GG..A.C...C...A.TCC.G.G...GC..GG..	03	12	07	-
H3_Lep01	..T.A.....	01	-	-	-
H4_Lep23	A.....	02	-	-	-
H5_Lep30	.....A.....C...C.....	01	-	-	-
H6_Lep46	.....A.....	02	-	-	-
H7_Lep67	...T.....CA.....G.....G.....G..	01	-	-	-
H8_Lep80	..T.....	01	-	-	-
H9_Mea58	...T.....	-	-	02	-
H10_Lep140	.....A..	-	01	-	
H11_Lep68	...T...C..GT.CA.T.....G.GG..A.C...C...A.TCC.G.G...GC..GG..	01	-	01	-
H12_Lep131	.T.A.....C..GT.CA.....G.GG..A.C...C...A.T.C.G.G...GC..GG..	-	03	08	-
H13_Lep129	...T.....CT.GT.CA.....G.GG..A.C...C...A.TCC.G.G...GC..GG..	-	-	01	-
H14_Lep147	...T...C..GT.CA.....G.GG..A.C...C...A.T.C.G.G...GC..GG..	-	08	05	-
H15_Palep12	.CTT.TGGCC.CG.GCAT.ATCTTTGGG.CC.A.GCCCAACA..C.CGA.TTC..TA....	-	-	-	07
H16_Lep101	...T...C..GT.CA.....G.GG..A.C...C...A.T.C.G.G...GC..GG..	-	-	01	-
H17_Lep133	...T...C..GT.CA.....G.GG..A.C...C...A.TCC.G.G...GC..GG.A	-	01	-	-

A análise dos haplótipos resultou em uma rede de haplótipos não enraizada, na qual os três haplogrupos foram identificados, sendo que os números representam a posição das mutações que separam os haplótipos, e o tamanho dos círculos é proporcional à frequência com que estes ocorrem nas bacias hidrográficas amostradas. Os haplótipos mais frequentes (H1 e H2) foram compartilhados entre as bacias Itapecuru, Pindaré e Mearim evidenciando a ocorrência de dois haplogrupos diferentes. Observou-se também a ocorrência de dois haplótipos (H12 e H14) exclusivos do sistema Pindaré-Mearim com frequência superior a dez vezes. As amostras do rio Parnaíba constituíram um único haplótipo (H15) resultando em um haplogrupo diferenciado dos demais por 43 passos mutacionais (Figura 8).



**Figura 8.** Rede de haplótipos gerada para *L. piau* provenientes de bacias hidrográficas do Maranhão com base no gene COI.

A taxa de transição e transversão versus divergência foi plotada no programa DAMBE e não mostrou saturação dos dados (Figura 9).

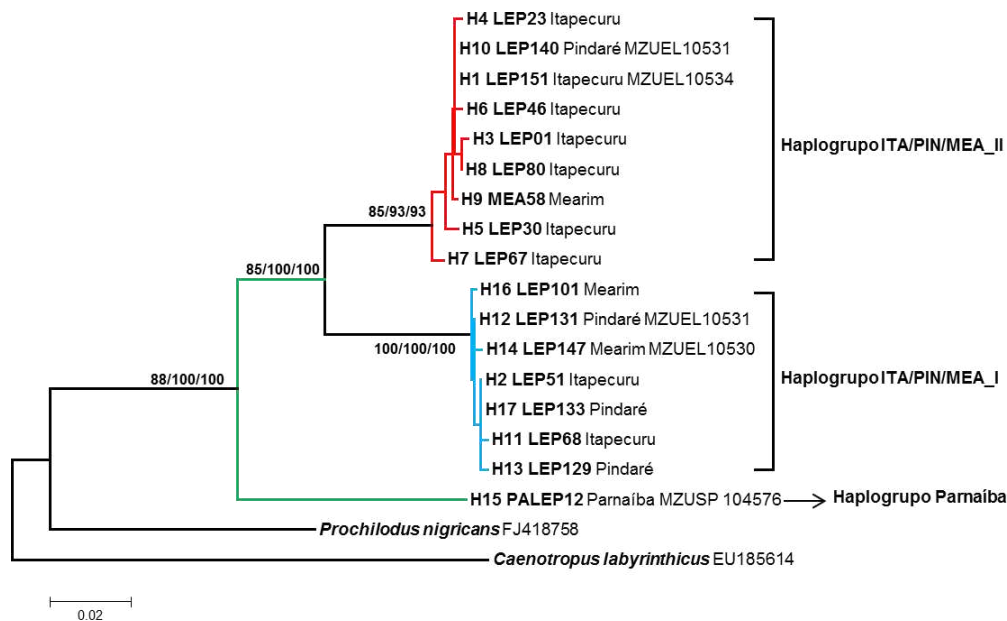


**Figura 9.** Número de transições (s) e transversões (v) versus divergência utilizando o algoritmo de Felsenstein (F84) para o fragmento do gene mitocondrial COI.

### 5.2.2. Análises filogenéticas e distância genética

A reconstrução filogenética gerada por meio dos métodos de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (ML) e Agrupamento de Vizinhos (NJ) geraram topologias similares formando três haplogrupos com fortes valores de *bootstrap*, onde o clado I agrupou os exemplares da bacia do rio Parnaíba (haplogrupo/Parnaíba). O clado II agrupou os espécimes das bacias do Itapecuru, Pindaré e Mearim. Foi observada neste clado uma divisão entre os espécimes de *L. piau* em dois haplogrupos (ITA/PIN/MEA-I e ITA/PIN/MEA- II), mostrando assim a existência de duas linhagens distintas de *L. piau* ocorrendo nestas bacias (Figura 10).





**Figura 10.** Árvore de haplotipo obtida através do método de Agrupamento de Vizinhos (NJ) com 1000 réplicas de *bootstrap* para o no gene COI do mtDNA. através do algoritmo de Kimura 2-parâmetros. Da esquerda para direita seguem os valores de Máxima Parcimônia (MP) Máxima verossimilhança (ME) e Agrupamento de Vizinhos (NJ). Verde: haplogrupo Parnaíba; Azul: haplogrupo ITA/PIN/MEA-I; Vermelho: haplogrupo ITA/PIN/MEA-II

A matriz de distância genética gerada com o algoritmo de Kimura 2-parâmetros para o gene COI do DNA mitocondrial é mostrado na tabela 11. Os valores de distância variaram de 3,6% a 7,5% sendo os maiores índices observados entre os haplogrupo/Parnaíba, clado I e o haplogrupo ITA/PIN/MEA-II, clado II (7,5). Os resultados obtidos utilizando a distancia  $p$  variaram de 3,5 a 7%.

**Tabela 11.** Percentual de divergência nucleotídica baseada nos parâmetros de Kimura 2-Parâmetros e gerado através do programa MEGA para os haplótipos de *L. piau* através do gene COI om base nos parâmetros da distância  $p$  (acima do diagonal).

Haplogrupos	Divergência nucleotídica		
	1	2	3
1-Haplogrupo/Parnaíba	-	6,9	7
2-Haplogrupo/ITA/PIN/MEA-I	7,4	-	3,5
3-Haplogrupo/ITA/PIN/MEA-II	7,5	3,6	-

### 5.2.3. Análise Molecular de Variância (AMOVA)

A diferenciação genética entre as populações de *L. piau* obtida através do índice  $F_{st}$ , para detecção de variação dentro e entre as populações foi realizada em dois níveis hierárquicos. O primeiro, considerando cada bacia

como uma população. Nesta análise, observou-se maior variação entre as populações, ou seja, bacias analisadas com o  $F_{st}$  de 0,721 e  $p$  altamente significativo, evidenciando um processo de estruturação genética nessas populações (Tabela 12). O segundo realizado considerando os haplogrupos formados pelos clados (I e II), mostrou também um elevado índice de variação genética entre os grupos (96,59%), evidenciando uma forte diferenciação genética entre as amostras de *L. piau* analisadas.

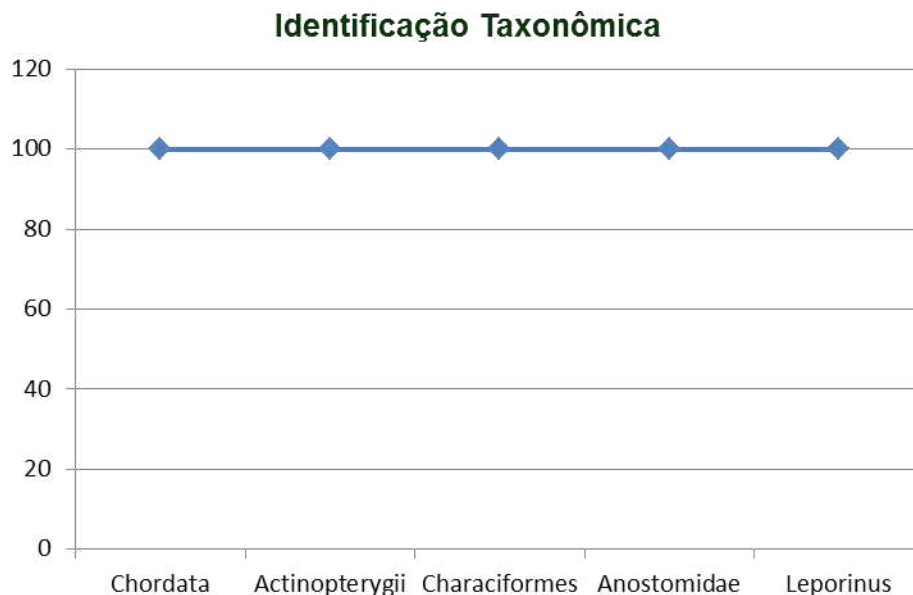
**Tabela 12.** Resultados da AMOVA para populações de *L. piau* como dois grupos com base em sequências da região COI.

Tipos de Variação	Participação observada		$F_{ST}$	$P^*$
	Comp. de variação	%		
<b>Bacias (rio Itapecuru, Pindaré, Mearim, Parnaíba)</b>				
Dentro das bacias	2,76039	27,88	0,721	<0,00001
Entres as bacias	7,13997	70,12		
<b>Haplogrupos</b>				
Dentro dos haplogrupos	0,45561	3,41	0,965	<0,00001
Entre os haplogrupos	12,91446	96,59		

\*Valores de P calculados com 1.023 permutações aleatórias

#### 5.2.4 Análise no BOLDSystems

As sequencias dos haplótipos obtidos nas quatro populações foram plotadas na plataforma BOLDSystems a fim de obter a identificação molecular através da comparação com as sequências do gene COI (DNA *barcoding*) depositadas na plataforma. O resultado revelou que os haplótipos deste estudo pertencem ao filo Chordata, Classe Actinopterygii, Ordem Characiformes, Família Anostomidae e Gênero *Leporinus* (Figura 11).



**Figura 11.** Identificação do gênero *Leporinus* (status taxonômico) baseado no gene COI.

Os índices de similaridade obtidos na identificação molecular de *L. piau*, realizada com os haplótipos que tiveram voucher determinados são mostrados na tabela 13. Os exemplares da bacia do Rio Parnaíba representados pelo Haplótipo15 que constitui o Haplogrupo/Parnaíba revelou maior similaridade com a espécie *Leporinus friderici* (99, 16%) do que com *L. piau* (98,84%). Os indivíduos das bacias dos Rios Itapecuru, Pindaré e Mearim representados pelos Haplótipos 1 e 10 que constituíram o Haplogrupo ITA/PIN/MEA-II revelaram similaridade de 99,34% com *Leporinus* sp04 e de 99,17 com *Leporinus* sp15. Os Haplótipos 12 e 14 que representam o ITA/PIN/MEA-I revelaram similaridade com *Leporinus* sp06 variando de 99,83 a 100%. Observou-se também uma similaridade de 99, 16 a 99, 34% com *L. friderici*. Observou-se ainda, uma alta similaridade com um terceiro táxon *Leporinus* sp10 (99,17 a 99,34%). Portanto, estes resultados divergem da identificação morfológica e reforça a problemática taxonômica na correta identificação de *L. piau*.

**Tabela 13.** Identificação molecular das amostras de *L. piau* das bacias Itapecuru, Pindaré, Mearim e Parnaíba realizada através de comparações das nossas sequências com sequências disponíveis na plataforma BOLDsystems para o gene COI.

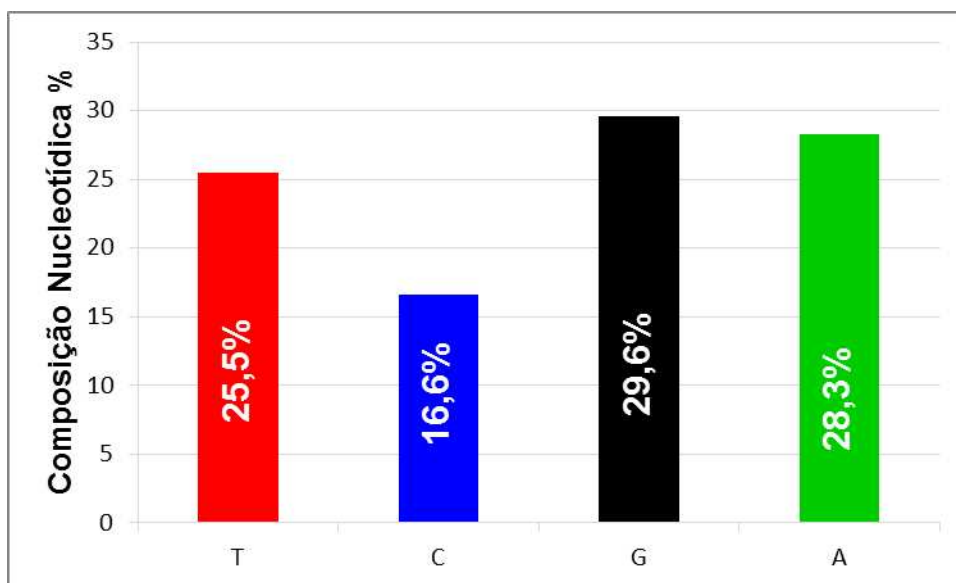
<b>IDENTIFICAÇÃO</b>				
<b>H/Código</b>	<b>Haplogrupo</b>	<b>Voucher</b>	<b>Taxonômica</b>	<b>Molecular: BOLDSystems</b>
H1/Lep_151	ITA/PIN/MEA-II	MZUEL10534	<i>Leporinus piau</i>	<i>Leporinus</i> sp04 ..... (99.34%)
				<i>Leporinus</i> sp15 ..... (99.17%)
H10/Lep_140	ITA/PIN/MEA-II	MZUEL10531	<i>Leporinus piau</i>	<i>Leporinus</i> sp04 ..... (99.34%)
				<i>Leporinus</i> sp15 ..... (99.17%)
H12/Lep_131	ITA/PIN/MEA-I	MZUEL10531	<i>Leporinus piau</i>	<i>Leporinus</i> sp06.....(99.83%)
				<i>Leporinus friderici</i> ..... (99.67%)
				<i>Leporinus</i> sp10 ..... (99.34%)
H14/Lep_147	ITA/PIN/MEA-I	MZUEL10530	<i>Leporinus piau</i>	<i>Leporinus</i> sp06..... (100%)
				<i>Leporinus friderici</i> ..... (99.34%)
				<i>Leporinus</i> sp10 ..... (99.17%)
H15/Palep_12	Parnaíba	MZUSP104576	<i>Leporinus piau</i>	<i>Leporinus friderici</i> ..... (99.16%)
				<i>Leporinus piau</i> . ..... (98.84%)

H – Haplótipo.

### 5.3. DNA Nuclear (TROP)

#### 5.3.1. Análise do fragmento e Diversidade genética

Foram obtidas sequências de um fragmento do gene TROP do DNA nuclear para 120 indivíduos de *Leporinus piau* distribuídos nas quatro bacias estudadas. Dos 250 pb, 244 foram conservados, 05 variáveis e 06 foram filogeneticamente informativos para parcimônia. A composição nucleotídica média de 28,3% para adenina, 16,6% para citosina, 29,6% para guanina e 25,5% para timina (Figura 12).



**Figura 12.** Porcentagem da frequência de bases nucleotídicas baseado em 250 pb de 120 sequências do gene Nuclear TROP.

Um total de cinco haplótipos foi observado com uma diversidade haplotípica de 0,560 e nucleotídica de 0,009 na análise conjunta das populações. Quando analisado isoladamente as populações valor elevado de diversidade haplotípica foi encontrado na bacia do Mearim (0,646) (Tabela 14).

**Tabela 14.** Diversidade genética nos espécimes de *L. piau* baseados em 250 pb do gene TROP.

Populações	N	NH	S	Índice de Diversidade Molecular	
				<i>H</i>	$\pi$
Itapecuru	58	3	5	0,192	0,003
Pindaré	29	2	5	0,246	0,004
Parnaíba	5	1	0	0	0
Mearim	28	3	6	0,646	0,009
Populações agrupadas	120	5	6	0,560	0,009

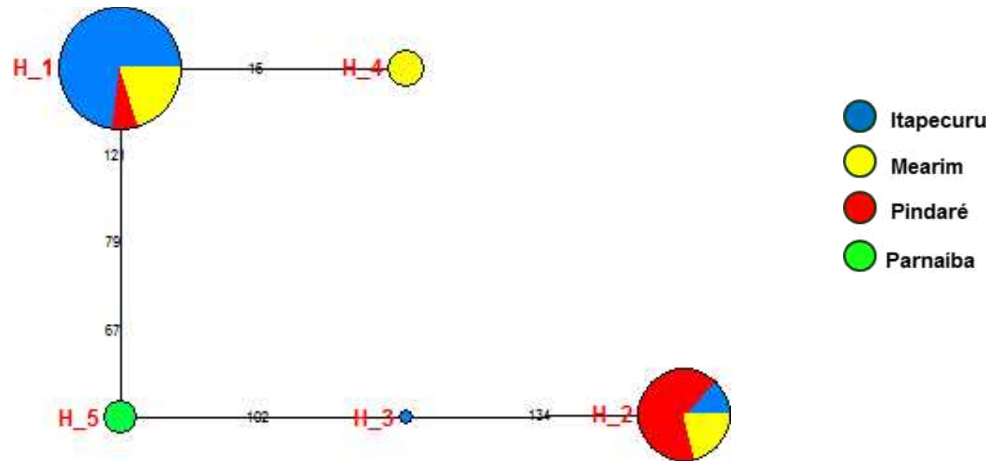
**N** = número amostral **NH** = número de haplótipos **S** = sítios polimórficos ***h*** = diversidade haplotípica e  $\pi$  = diversidade nucleotídica

Dos cinco haplótipos encontrados, os mais frequentes foram os haplótipos H1 e H2 observados nas populações do Itapecuru, Pindaré e Mearim. Foi observado um haplótipo exclusivo para a população do Itapecuru (H3), um para população do Mearim (H4) e outro para população do Parnaíba (H5) (Tabela 15).

**Tabela 15.** Haplótipos de *L. piau* com suas respectivas frequências e localidades de coleta baseados no gene TROP. ITA (Itapecuru), PIN (Pindaré), MEA (Mearim) e PAR (Parnaíba).

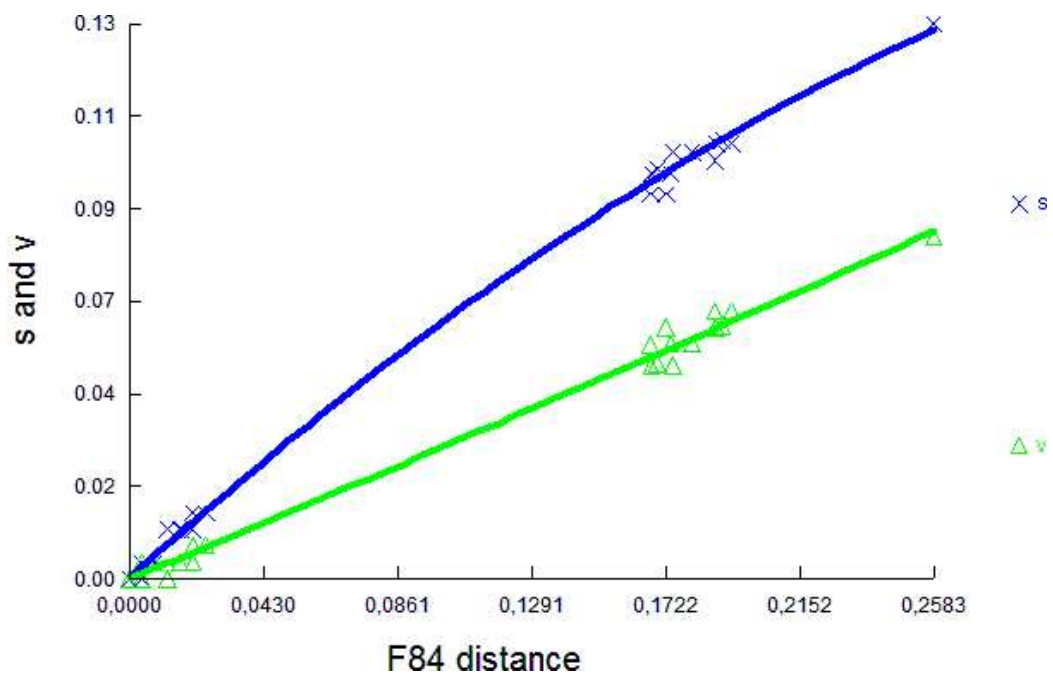
Hap	Sítios informativos	População			
		ITA	PIN	MEA	PAR
	111 167023 679214				
H1_Lep147	CAAGGC	52	04	14	-
H2_Lep131	.GGTAT	05	25	08	-
H3_Lep58	.GGTA.	01	-	-	-
H4_Lep66	A.....	-	-	06	-
H5_Palep12	.GG.A.	-	-	-	05

A rede de haplótipos gerada com base no fragmento do gene TROP do DNA nuclear mostrou a formação de três haplogrupos, como já observado a partir dos dados mitocondriais (Figura 13).



**Figura 13.** Rede de haplótipos gerada para *L. piau* provenientes de bacias hidrográficas do Maranhão com base no gene TROP.

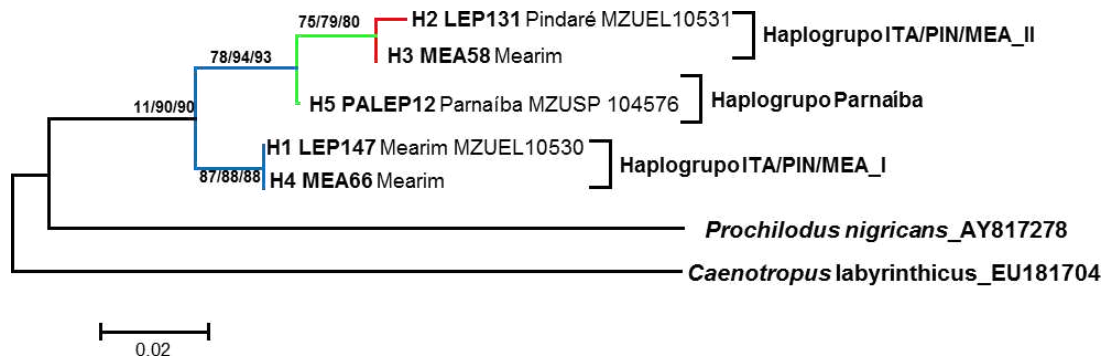
A análise entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo algoritmo de Felsenstein (F84) indica que não há saturação dos dados (Figura 14).



**Figura 14.** Número de transições (s) e transversões (v) versus divergência utilizando o algoritmo de Felsenstein (F84) para o fragmento do gene nuclear TROP.

### 5.3.2. Análises filogenéticas e Distância genética

A reconstrução filogenética gerada por meio dos métodos de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (ML) e Agrupamento de Vizinhos (NJ) mostraram topologias similares formando três haplogrupos fortemente suportados em dois cladogramas, onde o haplogrupo Parnaíba agrupou exemplares da bacia do Parnaíba e os haplogrupos ITA/PIN/MEA I e II agrupou os espécimes das bacias do Itapecuru, Pindaré e Mearim (Figura 15).



**Figura 15.** Árvore de haplotipo obtida através do método de Agrupamento de Vizinhos (NJ) com 1000 réplicas de *bootstrap* para gene nuclear TROP. através do algoritmo de Kimura 2-parâmetros. Da esquerda para direita seguem os valores de Máxima Parcimônia (MP) Máxima verossimilhança (ME) e Agrupamento de Vizinhos (NJ). Verde: haplogrupo Parnaíba; Azul: haplogrupo ITA/PIN/MEA-I; Vermelho: haplogrupo ITA/PIN/MEA-II

A matriz de divergência nucleotídica gerada com o algoritmo Kimura 2-parâmetros para o gene nuclear TROP é mostrado na (Tabela 16). A distância genética entre os haplogrupos variou de 0,8% a 2,1%. A distancia *p* não corrigida revelou valores similares.

**Tabela 16.** Percentual de divergência nucleotídica baseada nos parâmetros de Kimura 2-Parâmetros e gerado através do programa MEGA para os haplótipos de *L. piau* através do gene TROP com base nos parâmetros da distância *p* (acima do diagonal).

Haplogrupos	Divergência nucleotídica		
	1	2	3
1- Haplogrupo/ITA/PIN/MEA-I	-	1,2	2
2- Haplogrupo/Parnaíba	1,3	-	0,8
3- Haplogrupo/ITA/PIN/MEA-II	2,1	0,8	-



### 5.3.3 Análise Molecular de Variância (AMOVA)

Os padrões de variabilidade genética encontrados dentro e entre as populações através da Análise Molecular de Variância (AMOVA) estimada a partir de dois níveis hierárquicos, o primeiro considerando cada bacia como uma população e o segundo os haplogrupos formados. O resultado da AMOVA indicou que a maior parte da variação molecular ocorre entre as populações como o  $F_{st}$  de 0,549 e  $p$  altamente significativo. Na análise dos haplogrupos observou-se que a maior parte da variação genética também encontra-se entre os grupos (96,54%), evidenciando uma forte diferenciação genética entre as amostras de *L. piau* analisadas. (Tabela 17)

**Tabela 17.** Resultados da AMOVA para populações de *L. piau* como dois grupos com base em sequências do DNA nuclear TROP.

Tipos de Variação	Componentes de Variação		$F_{ST}$	$P^*$
	Comp. de variação	% Variação		
<b>Bacias (rio Itapecuru, Pindaré, Mearim, Parnaíba)</b>				
Dentro das bacias	0,66046	45,06	0,549	<0,00001
Entres as bacias	0,80542	54,94		
<b>Haplogrupos</b>				
Dentro dos haplogrupos	0,08103	3,46	0,965	<0,00001
Entre os haplogrupos	2,26134	96,54		

\*Valores de P calculados com 1.023 permutações aleatórias

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Gene rRNA 16S, COI e TROP

Segundo Torres et al (2004), nos últimos anos, diversos estudos foram realizados com a utilização de marcadores moleculares analisando o polimorfismo de DNA. Ainda de acordo com esses autores a região neotropical é a mais diversificada em número de espécies e densidade populacional, no que se diz respeito aos peixes de água doce. Neste contexto a biologia molecular disponibiliza ferramentas capazes de acessar variação molecular existente nesses grupos e relacioná-las a fatores ambientais e antropicos. Com base nisso, marcadores moleculares mitocondriais e nucleares são úteis nos estudos cujo objetivo é a variabilidade e a estrutura genética de uma espécie.

As incertezas taxonômicas encontradas em *Leporinus* sugerem que dados morfológicos nem sempre são suficientemente eficazes na resolução destes problemas, portanto estudos moleculares associados a morfologia podem ser úteis na elucidação desses conflitos. Neste gênero a sistemática é um tanto complexa devido à dificuldade de diferenciar os caracteres morfológicos, dificultando a identificação correta das espécies do gênero (RENNO et al, 1989). Dados moleculares que utilizam sequências do DNA mitocondrial, assim como o nuclear tem sido considerada uma ferramenta importante e eficaz na elucidação de questões taxonômicas, entre elas o diagnóstico de espécies, onde a morfologia sozinha mostrou-se pouco resolutiva (Mitchell e Samways, 2005)

Em nossos resultados com a utilização de dois genes mitocondriais (rRNA 16S e COI) e um nuclear (TROP) para a análise de polimorfismo de DNA revelou alta diversidade haplotípica. Resultados similares foram observado por Fraga et al. (2014) em populações de *L. piau* da bacia do Itapecuru. Martins et al. (2003) também estudando seis populações *L. elongatus* da bacia do rio Paraná utilizando também fragmento de gene mitocondrial encontraram resultados similares.

Os haplótipos H1 e H2 foram os mais frequentes sendo observados em três das quatro bacias estudadas (Itapecuru, Pindaré e Mearim), independente da região genômica utilizada. Para as regiões genômicas COI e TROP o H1 foi mais frequente na bacia do Rio Itapecuru, enquanto que o H2 foi mais

frequente no sistema Pindaré-Mearim, o que possivelmente nos permita inferir quanto à ocorrência de duas linhagens de *L. piau* nestas bacias. De acordo com Piorski (2010) este fato pode ser explicado devido essas bacias posuírem certa conectividades e fluxo gênico ser menos restrito, uma vez que os rios Mearim e Pindaré formam um sistema hidrológico que desemboca na região do Golfão Maranhense.

A bacia do rio Parnaíba apresentou um haplotipo exclusivo e distinto das demais bacias analisadas, o que sugere provalmente a existencia de linhagens diferenciadas geneticamente nas bacais maranhense, o que vem corroborar a hipotese da existencia de identificação erronea ou possivelmente a existencia de espécies cripticas.

A rede de haplótipos evidenciou a presença três haplogrupos onde foi possível observar que os haplotipos de maior ocorrência ocupam uma posição central em relação aos haplótipos de menor frequência. Segundo Kidd e Ritchie (2006) os haplotipos mais frequentes são mais antigos e geralmente encontram-se no interior da rede e os de menor frequência são os mais recentes e ocupam as extremidades. Dessa forma, os haplótipos H1 e H2 deste estudo podem ser considerados como os mais antigos.

Neste estudo, os exemplares analisados formam dois cladros. Onde o primeiro clado foi formado por exemplares provenientes das bacias dos rios Itapecuru, Pindaré e Mearim. O segundo por exemplares exclusivos da bacia do rio Parnaíba. Os haplogrupos I e II (ITA/PIN/MEA) constituem um clado e o haplogrupo Parnaíba outro clado mais basal na árvore de haplótipos para os genes mitocondrias rRNA 16S e COI. Santos (2007) ao estudar 17 espécies do gênero *Leporinus* com base em genes mitocondriais e nucleares observou que as espécies analisadas constituem um grupo monofilético reforçando a monofilia do gênero. Em nossos resultados foi observado que os haplogrupos de *L. piau* foram fortemente agrupados constituindo uma unidade monofilética. Portanto, a separação de espécimes em diferentes haplogrupos sugere a existência de diferentes linhagens ou ocorrência de espécies cripticas, já que a espécie em estudos possui taxonomia complexa, dada similaridade morfológica com outras espécies dentro do gênero *Leporinus*.

Alto polimorfismo genético tem sido retratado em espécies do gênero *Leporinus*, como em um estudo realizado por Chiari & Sodré (1999) ao analisarem espécies *Leporinus* (*L. elongatus*, *L. friderici* e *L. obtusidens*) através de marcadores isoenzimáticos onde foi revelado uma maior proporção de locos polimórficos para *L. friderici* (36,8%) reforçando o status de maior diversificação para esta espécie. Esses mesmos autores em 2001 detectaram elevados índices de polimorfismos para espécie *L. elongatus* (58,7%) em análises de marcadores RAPD. Assim como também Olivatti et al. (2011) observaram resultados similares em *L. friderici* detectando também alto polimorfismo. Morelli et al. (2007) analisando populações de *Leporinus macrocephalus* da bacia do Rio Paraguai encontraram altos índices de heterozigosidade esperada e observada, evidenciando o alto polimorfismo neste gênero independente da região genômica analisada. Como se observa, as espécies deste gênero exibem altos níveis de polimorfismo, como mostra nossos resultados.

A matriz de distância revelou alta divergência genética entre o haplogrupo do Parnaíba e o haplogrupo II (Itapecuru, Pindaré e Mearim) para os genes mitocondriais. Já os haplogrupos I e II (Itapecuru, Pindaré e Mearim) apresentaram uma similaridade genética de 1,9%. Valores de similares foram observados por Fraga et al. (2014) em amostras desta espécie oriundas da bacia do rio tapecuru. Porém para o gene nuclear a maior divergência foi observado entre os haplogrupos I e II (ITA/PIN/MEA). No entanto, índices maiores foram encontrados por Martins et al. (2003) em estudo com populações de *L. elongatus* utilizando a região controle com valores variando de 1,7 a 8,2%. É oportuno ressaltar, que a região utilizada por esses autores é mais variável do o gene utilizado neste estudo.

A AMOVA testada em dois níveis hierárquicos com os diferentes marcadores revelou que a maior diferenciação genética ocorre entre as bacias, como também entre os haplogrupos com o valor de  $p$  altamente significativo ( $<0,0001$ ). Esses  ndices são indicativos de que as populações de *L. piau* das bacias analisadas estão em processo de estruturação genética. Fraga et al. (2014), embora tenham observado índices de diferenciação genética entre populações de *L. piau* da bacia do Itapecuru, os índices da AMOVA não

evidenciaram estruturação genética entre as populações por eles estudadas ( $F_{ST} = -0.02703$ ,  $p > 0,05$ ).

A identificação molecular de *L. piau* das bacias hidrográficas do Itapecuru, Pindaré, Mearim e Parnaíba com base na análise da plataforma BOLD DNA *barcoding* não confirmou status taxonômico de *L. piau* para essas bacias, uma vez que as sequências utilizadas mostraram altos índices de similaridade genética com cinco táxons do gênero *Leporinus* sem definição do status específico: *Leporinus* sp04 e *Leporinus* sp15 exibiram similaridade de 99,34% e 99,17%, respectivamente, com o haplogrupo ITA/PIN/MEA-II (Itapecuru, Pindaré e Mearim), *Leporinus* sp06, *Leporinus* sp10, e *L. friderici* apresentaram similaridade de 100%, 99,34% e 99,67%, respectivamente com o haplogrupo ITA/PIN/MEA-I que é a linhagem mais basal com o haplogrupo Parnaíba. Observou-se também alto valor de divergência entre os haplogrupos, sugerindo um provável erro na identificação morfológicas, o que reforça a problemática existente na taxonomia do gênero *Leporinus*.

É válido ressaltar que as sequências usadas na análise são de espécimes que possuem identificação morfológica confirmada (MZUEL 10534/Itapecuru, MZUEL 10531/Pindaré, MZUEL 10530/Mearim e MZUSP104576/Parnaíba). Embora o haplotipo15 que constitui o haplogrupo Parnaíba tenha mostrado valores significativos de similaridade genética, 98,84% com *L. piau*, a maior similaridade observada foi com *L. friderici* (99,16%). Portanto, nossos resultados confirmam a divergência existente entre a identificação morfológica e molecular, reforçando a problemática na identificação de *L. piau* baseada somente em caracteres morfológicos.

Os espécimes de *L. piau* utilizados neste estudo foram identificados com base em quatro exemplares: um holótipo coletado no rio Salgado, em Icó, CE (ANSP 69502), um parátipo do rio Jaguaribe, em Orós, CE (ANSP 69509) e dois parátipos coletados no rio São Francisco (ANSP 69503 e ANSP 69508). Mais recentemente, Britski et al., (2012) re-examinaram a série tipo de *Leporinus piau* considerando os dois parátipos do rio São Francisco como pertencentes à *L. obtusidens*, indicando que a espécie talvez esteja restrita às bacias dos rios do Nordeste excetuando-se o rio São Francisco. Por outro lado, *L. friderici* é a espécie mais comum e amplamente distribuída do gênero,

presente em todas as grandes bacias Neotropicais (Garavello et al., 1992). Por outro lado, a grande semelhança entre *L. piau* e *L. friderici*, pode ter possibilitado a identificação de exemplares dessas duas espécies erroneamente, o que pode justificar a similaridade dos espécimes de *L. piau* deste trabalho com *L. friderici* da plataforma BOLDSystems.

Um inventário realizado por Piorski et. al (1988) em um trecho inferior da bacia do rio Itapecuru registrou para a família Anostomidae, gênero *Leporinus* a ocorrência de duas espécies *Leporinus friderici* (Bloch, 1794) e *Leporinus* sp. No entanto, Barros et al. (2011) registraram apenas a ocorrência de *Leporinus piau* (Fowler, 1941) para bacia do Rio Itapecuru como uma espécie endêmica da região Nordeste. Para bacia do Rio Mearim Soares (2005) listou também apenas *Leporinus friderici* (Bloch, 1794). Portanto observa-se que apesar da similaridade molecular do haplogrupo ITA/PIN/MEA-I com *Leporinus* sp06, *Leporinus* sp10, e *L. friderici* (100%, 99,34% e 99,67%, respectivamente), não foi possível identificar o verdadeiro *status* específico deste haplogrupo, como também, do outro haplogrupo de ocorrência nos Rios Itapecuru, Pindaré e Mearim (ITA/PIN/MEA-II) reforçando ainda mais a problemática na taxonomia do gênero *Leporinus*.

A existência de variação geográfica entre populações de *L. friderici* foi observada inicialmente por Géry (1977) que detectou diferenças nos padrões morfológicos e de coloração entre populações da Amazônia e da bacia do rio Paraná (Paraguai). Diante da problemática existente nas bacias em estudo é necessário uma análise dos caracteres morfométricos dos espécimes destas bacias na tentativa de fornecer dados que possam elucidar tal problemática.

O presente estudo gerou informação que confirmam um processo de estruturação genética de *L. piau* nas bacias hidrográficas do Itapecuru, Pindaré, Mearim e Parnaíba, como observado em *Pygocentrus nattereri* de ocorrência nestas mesmas bacias por da Luz (2014).

A estrutura genética observada não estar associada com barreiras físicas. No entanto é evidente a formação de três unidades populacionais, duas formadas pelas bacias dos rios Itapecuru, Pindaré e Mearim, e uma terceira unidade conformada pela bacia do rio Parnaíba, agrupamento que é sustentado pelas análises filogenéticas baseadas nas relações dos

haplogrupos para os dois marcadores mitocôndrias (rRNA 16S e COI) e nuclear TROP.

Neste contexto os dados obtidos no presente estudos para *Leporinus piau* de bacias de rios Maranhense poderão ser utilizados na elaboração de projetos de manejo e conservação desse importante recurso pesqueiro.

## 7. CONCLUSÕES

- ❖ Os marcadores moleculares mitocondriais (rRNA 16S, COI) e nuclear (TROP), mostraram altos índices de polimorfismo e forte estruturação genética para *L. piau* nas bacias analisadas;
- ❖ Os espécimes das bacias Itapecuru, Pindaré e Mearim constituíram duas linhagens ou haplogrupos geneticamente diferente;
- ❖ Os espécimes da bacia do rio Parnaíba constituíram uma terceira linhagem ou haplogrupo com índices elevados de divergência genética;
- ❖ A AMOVA mostrou valores de  $F_{ST}$  altamente significativos, com a maior parte da variação ocorrendo entre as populações e haplogrupos, corroborando a forte estruturação genética observada para *L. piau* das bacias hidrográficas maranhenses;
- ❖ As análises filogenéticas baseadas no DNA mitocondrial e nuclear corroboram a formação de três linhagens distintas;
- ❖ A identificação molecular (COI DNA *barcoding*) não confirma o *status* específico de *L. piau*;
- ❖ Os resultados deste estudo geraram informações que confirmam a diferenciação da espécie *L. piau*, e reforça a problemática taxonômica para a espécie.



## 8. REFERENCIA

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. and WATSON, J. D. **Biología Molecular de la Célula**. Tercera Edición. Ediciones Omega. S. A. 1996.1385pp.

ALVIM, M. C. C.; PERET, A. C. **Food resources sustaining the fish fauna in a section of the upper São Francisco River in Três Marias, MG, Brazil**. Brazilian Journal of Biology, São Carlos, v. 64, n. 2, p. 195-202, 2004.

BANDELT H. J.; FORSTER P.; ROHL, A. **Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies**. Mol. Biol. Evol. 16(1):37-48. 1999.

BARROS, M. C.; FRAGA, E. C.; BIRINDELLI, J. L. O. **Fishes from the Itapecuru River basin, State of Maranhão, northeast Brazil**. Brazilian Journal of Biology, v.71, p.375-380, 2011.

BIRINDELLI, J. L. O & BRITSKI, H. A. **New species of the genus *Leporinus* Agassiz (Characiformes: Anostomidae) from the rio Curuá, rio Xingu basin, Serra do Cachimbo, Neotropical Ichthyology, 7(1):1-10, 2009**

BRITSKI, H. A.; BIRINDELLI, J. L. O.; GARAVELLO, J. C. **A new species of *Leporinus* Agassiz, 1829 from the upper Rio Paraná basin (Characiformes, Anostomidae) with redescription of *L. elongates* Valenciennes, 1850 and *L. obtusidens* (Valenciennes, 1837)**. Papéis Avulsos de Zoologia, 52(37), 2012.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação da região de Três Marias: com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco**. Ministério da Irrigação CODEVASF. Brasília, 1988.

BORBA, R. S. et al. **Genetic structure of the ornamental tetra fish species *Piabucus melanostomus* Holmberg, 1891 (Characidae, Iguanodectinae) in the Brazilian Pantanal wetlands inferred by mitochondrial DNA sequences**. Biota Neotropical, v. 13, n. 1, p. 42-46, 2013.

BOORE J. L. **Animal mitochondrial genomes**. Nucleic Acids Research. 27(8):1767- 1780. 1999.

BRITSKI, H.A.; SATO, Y. & ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da Região de Três Marias**. Brasília, Câmara dos Deputados/CODEVASF. 143 p, 1984

BUCKUP, P.A. (1998). **Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophisy)**. Pp. 123-144. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A. (Eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Edipucrs, Porto Alegre. 603 pp.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A. & GHAZZI, M. S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro, Museu Nacional, 2007.

BURGER, R. **Ictiofauna do Baixo São Francisco à Jusante da Barragem de Xingó: Inventário e Caracterização Taxonômica**. Monografia não publicada, Universidade Federal da Bahia, Salvador/BA, 2008.

CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S. A.; De SALLE, R. **Relationships among Characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences**. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36:135-153, 2005.

CHAO, L.N, PETRY, P., PRANG, G., SONNESCHIEN, L., TLUSTY, M. **Conservation and management of ornamental fish resources of the rio Negro basin, Amazonia, Brazil**. Manaus, Editora da Universidade do Amazonas, 310 pp. (2001).

CHENG, Y. Z. et al. **Universal primers for amplification of the complete mitochondrial control region in marine fish species**. *Molecular Biology*, v. 46, n. 5, p. 727-730, 2012.

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

CHIARI, L.; SODRÉ, L. M. K. **Study of eight species of the Anostomidae family (Pisces, Characiformes) by RAPD analysis**. *Acta Scientiarum*, v.23, n.2, p.445-451, 2001.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. **Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows**. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, p.564-567, 2010.

FEITOSA, F.S.; SANTOS, G.M.; BIRINDELLI, J.L.O.. **Leporinus britskii: a new anostomid species from the Tapajós and Jari drainages, Brazil (Characiformes: Anostomidae)**. *Zootaxa*, 3120:55-62, 2011

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

FOWLER, H. W. **A collection of fresh-water fishes obtained in eastern Brazil by Dr. Rodolpho von Ihering**. *Proc. Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 93: 123-199, 1941.

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

FRAGA, E.;SCHNEIDER, H.;NIRCHIO, M.;SANTA-BRIGIDA, E.;RODRIGUES-FILHO, L. F.; SAMPAIO, I. **Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae, Mugiliformes) based on two mitochondrial genes.** Journal of Applied Ichthyology, v.23, p.598-604, 2007.

FRIESEN, V.L., CONGDON, B.C., KIDD, M.G., BIRT, T.P. **Polymerase chain reaction (PCR) primers for the amplification of five nuclear introns in vertebrates.** Mol. Ecol. 8, 2141-2152. 1999

GARAVELLO, J. C. & BRITSKI, H. A. Family Anostomidae. *In*: REIS, R. E. *et al.* **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America.** Porto Alegre, Editora da Pontifícia Universidade Católica do rio Grande do Sul, 71-84, 2003.

GARAVELLO, J. C.; REIS, S. F. dos; STRAUSS, R. E. **Geographic variation in *Leporinus friderici* (Bloch) (Pisces: Ostariophysi: Anostomidae) from the Paraná-Paraguay and Amazon River basins.** Zoologica Scripta, 21, 2, 197-200, 1992.

GARAVELLO, J. C., BRITSKI, H. A. **Duas novas espécies do gênero *Leporinus* Spix, 1829, da bacia do alto Paraná (Teleostei, Anostomidae).** Com. Mus. Ciênc. PUCRS. Porto Alegre, Nº 44: 153-165, (1987).

GARAVELLO, J.C. **Revisão taxonômica do gênero *Leporinus* Spix, 1829 (ostariophysi, Anostomidae).** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 451 pp, (1979).

GÉRY, J. **Characoids of the world.** T.F.H. Publications, Neptune City, New Jersey, 1977.

GOMES, J. H. C.; VERANI, J. R. **Alimentação de espécies de peixes do reservatório de Três Marias.** In: GODINHO, H. P.; GODINHO A. L. (Org.). Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p. 195-227.

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

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

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, l.6, e2490, 2008.

IERVOLINO, F.; RESENDE, E. K.; HILSDORF, A. W. S. **The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management.** *Fisheries Research*, v. 101, n. 1-2, p. 27-31, 2010.

KIDD, D.M & RITCHIE, M. G. **Phylogeographic information systems putting the geography into phylogeography.** *Journal of Biogeography*. 33, 1851- 1865. 2006.

LIBRADO, P. & ROZAS, J. **DnaSPv5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.** *Bioinformatics*, 25: 1451-1452, 2009.  
LUZ, L. A. **Estrutura Genética de populações da Piranhas Vermelha, *Pygocentrus nattereri* (Characiformes: Serrasalminae) com base no DNA Mitochondrial e Nuclear.** 2014. 89f. Dissertação (mestrado em Ciências Animal ) - Universidade Estadual do Maranhão. 2014.

LOVEJOY, N.R., COLLETE, B.B. **(Phylogenetic relationships of new world needlefishes (Teleostei: Belontiidae) and the biogeography of transitions between marine and freshwater habitats.** *Copeia*,: 324-338. 2001

MARTINS, C.; WASKO, A. P.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. **Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin.** *Genet. Mol. Biol.*, v.26, n.1, p.33- 38, 2003.

MEYER, A. **Evolution of mitochondrial DNA in fishes.** *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, v. 2, p. 1-38, 1993.

MORELLI, K. A.; REVALDAVES, E.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. **Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes: Anostomidae) and cross-species amplification.** *Molecular Ecology Notes*, v.7, p.32-34, 2007

NELSON, J.S. **Fishes of the World.** 4. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006.

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

ORTÍ, G. et al. **Phylogeny of the Serrasalminidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences.** *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, n. 1, p. 343-351, 2008.

ORTI, G., Petry, P., Porto, G.I.R., Jégu, M., Meyer, A., **Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA rates genes and the phylogeny of piranhas**. J. Mol. Evol. 42, 169-182. 1996.

PALUMBI, S. et al. **The simple fool's guide to PCR ver. 2.0**. University of Hawaii, Honolulu, 1991.

PALUMBI, S. R. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. p. 205-247. In: HILLS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. (Eds.). Molecular Systematics 2nd. ed., Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, 1996. 655 p.

PEREIRA, L. H. G. et al. **Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?**. Genetics, v. 14, p. 1-14, 2013.

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

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

RENNO, J. F.; GUYOMARD, R.; BOUJARD, T.; BASTIDE, C. Evidence for genetic isolation among four morphological species of *Leporinus* (Anostomidae, Pisces) in French Guiana. **Aquatic Living Resources**, v.2, p.127-134, 1989.

RENNO, J.F.; BERREBI, P.; BOUJARD, T.; GUYOMARD, R. **Intraspecific genetic differentiation of *Leporinus friderici* (Anostomidae, Pisces) in French Guiana and Brazil: a genetic approach to the refuge theory**. The Journal of Fish Biology, v.36, p.85-95, 1990.

RENNO, J. F.; MACHORDOM, A.; BLANQUER, A.; BOURSOT, P. **Polymorphism of mitochondrial genes in populations of *Leporinus friderici* (Bloch, 1794): intraspecific structure and zoogeography of the Neotropical fish**. Genetica, v. 84, p.137-142, 1991.

ROSA, A. J. M.; PAIVA, S. R. **Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico**. Planaltina: Embrapa, 2009.

ROZAS, J. et al. DNAsp v5.1: **A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data**. Bioinformatics, v. 25, p. 1451-1452, 2010.

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

SANGER, F.; NICHLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA Sequencing with chaintermination inhibitors**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74: 5463-5468, 1977.

SAMPAIO, E. V. & SATO, YOSHIMI. **Aspectos reprodutivos de *Leporinus piau* FOWLER, 1941 (Osteichthyes, Anostomidae) da bacia do rio São Francisco, submetido à desova induzida.** *Ciência Animal Brasileira.*, 1:157-165, 2009.

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

SANTOS, G. M. dos; MÉRONA, B. de; JURAS, A. A.; JÉGU, M. **Peixes do Baixo Rio Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidrelétrica Tucuruí.** Eletronorte, Brasília, 2004.

SANTOS, M. C. F.; RUFFINO, M.L.; FARIAS, I. P.; **High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River.** *Journal of Biology*, 71,33-44, 2007.

SANTOS, G. M. & JEGU, M. **Inventário Taxonômico dos Anostomídeos (Pisces, Anostomidae) da Bacia do Rio Uatumã - AM, Brasil, com descrição de duas Espécies Novas.** *Acta Amazônica*, Manaus, v. 26, 1996.

SANTOS, S.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. **Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis.** *Genetic Molecular Biology*, v. 26, p. 151-161, 2003.

SIDLAUSKAS, B.L.; MOL, J.H.; VARI, R.P. **Dealing with allometry in linear and geometric morphometrics: a taxonomic case study in the *Leporinus cylindriciformis* group (Characiformes: Anostomidae) with description of a new species from Suriname.** *Zoological Journal of the Linnean Society*, 162:103-130, 2011.

SOARES, E. C. **Peixes do Mearim.** São Luiz: Editora Instituto Geia, 2005.

SWOFFORD, D. L. PAUP\*. **Phylogenetic analysis using parsimony and other methods.** Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2003.

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

TERENCIO, M. L.; SCHNEIDER, C. H.; PORTO, J. I. R. **Molecular signature of the D-loop in the brown pencilfish *Nannostomus eques* (Characiformes, Lebiasinidae) reveals at least two evolutionary units in the Rio Negro basin, Brazil.** *Journal of Fish Biology*, v. 81, p. 110-124, 2012.

TERENCIO, M. L. et al. **Structure and organization of the mitochondrial DNA control region with tandemly repeated sequence in the Amazon ornamental fish.** *Mitochondrial DNA*, v. 24, p. 74-82, 2013.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBONS, T. J. **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Research*, v.22, p. 4673-4680, 1994.

WARD, R. D. et al. **DNA barcoding Australia's fish species.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, n.360, p. 1847-1857, 2005.



# The DNA barcode reveals cryptic diversity and a new record for the genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae) in the hydrographic basins of central northern Brazil

Maria Histelle Sousa Nascimento<sup>1,2</sup>, Deborah Gaído Aragão<sup>1</sup>,  
Jordânia Leticia Nascimento Silva<sup>1</sup>, Renato Correia Lima<sup>3</sup>,  
José Luis Oliván Birindelli<sup>4</sup>, Elmary Costa Fraga<sup>1</sup> and Maria Claudene Barros<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry and Biology, Maranhão State University, Caxias, Maranhão, Brazil

<sup>2</sup> Graduate Network Program in the Biodiversity and Biotechnology of Legal Amazonia, Biological Sciences Institute, Belem, Pará, Brazil

<sup>3</sup> Graduate Program in Genetics, Conservation, and Evolutionary Biology, National Amazonian Research Institute, Manaus, Amazonas, Brazil

<sup>4</sup> Department of Animal and Plant Biology, Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil

## ABSTRACT

*Leporinus* is one of the most speciose genera of the order Characiformes, with 81 valid species distributed throughout much of Central and South America. The considerable diversity of this genus has generated extensive debate on its classification and internal arrangement. In the present study, we investigated the species diversity of the genus *Leporinus* in central northern Brazil, and conclude that six valid species—*Leporinus maculatus*, *Leporinus unitaeniatus*, *Leporinus affinis*, *Leporinus venerei*, *Leporinus* cf. *friderici*, and *Leporinus piau*—are found in the hydrographic basins of the Brazilian states of Maranhão, Piauí, and Tocantins. We analyzed 182 sequences of the Cytochrome Oxidase subunit I gene, of which, 157 were obtained from *Leporinus* specimens collected from the basins of the Itapecuru, Mearim, Turiaçu, Pericumã, Peria, Preguiças, Parnaíba, and Tocantins rivers. The species delimitation analyses, based on the ABGD, ASAP, mPTP, bPTP, and GMYC methods, revealed the presence of four distinct molecular operational taxonomic units (MOTUs), identified as *L. maculatus*, *L. unitaeniatus*, *L. affinis*, and *L. piau* (from the Parnaíba River). The bPTP method restricted *L. venerei* to a single MOTU, and confirmed the occurrence of this species in the rivers of Maranhão for the first time. The separation of *L. cf. friderici* into two clades and the subsequent formation of different operational taxonomic units was consistent with polyphyly in this species, which indicates the existence of cryptic diversity. The arrangement of *L. cf. friderici* and *L. piau* in two different clades supports the conclusion that the *L. piau* specimens from Maranhão were misidentified, based on their morphological traits, reflecting the taxonomic inconsistencies that exist among morphologically similar species. Overall, then, the species delimitation methods employed in the present study indicated the presence of six MOTUs—*L. maculatus*, *L. unitaenitus*, *L. affinis*, *L. cf. friderici*, *L. venerei*, and *L. piau*. In the case of two other MOTUs identified in the present study, one (*L. venerei*) is a new record for the state of

Submitted 28 November 2022

Accepted 15 March 2023

Published 25 May 2023

Corresponding author  
Maria Claudene Barros,  
mbdene@yahoo.com.br

Academic editor  
Jörg Oehlmann

Additional Information and  
Declarations can be found on  
page 15

DOI 10.7717/peerj.15184

© Copyright  
2023 Nascimento et al.

Distributed under  
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS



Maranhão, and we believe that the other represents a population of *L. piau* from the basin of the Parnaíba River.

**Subjects** Aquaculture, Fisheries and Fish Science, Genetics, Molecular Biology, Zoology, Freshwater Biology

**Keywords** Molecular identification, Freshwater fish, Leporinus, Neotropical biodiversity, Systematics

## INTRODUCTION

The family Anostomidae is a prominent group of Neotropical fish that includes 15 genera and approximately 151 valid species ([Ramirez et al., 2016](#); [Britski & Birindelli, 2019](#); [Ramirez et al., 2020](#)). The most speciose genus is *Leporinus*, which has approximately 81 valid nominal species ([Fricke, Eschmeyer & Laan, 2021](#)). [Géry \(1977\)](#) concluded that *Leporinus* is one of the most diverse genera of the order Characiformes, which is distributed between Central America and southern South America.

The considerable diversity found in the genus *Leporinus* has led to numerous attempts to classify its species and determine its internal arrangement. A number of studies have proposed subdivisions based on the position of the mouth, and the shape and arrangement of the teeth ([Borodin, 1929](#); [Myers, 1950](#); [Garavello, 1979](#)). [Britski & Garavello \(1978\)](#) divided the genus into three groups based on coloration patterns, that is, banding, spots, and longitudinal lines, although these proposals have been contradicted by more comprehensive studies, such as those of [Sidlauskas & Vari \(2008\)](#) and [Ramirez et al. \(2016\)](#). In their cytogenetic study, [Galetti, Lima & Venere \(1995\)](#) confirmed the existence of a well-defined ZZ/ZW sex chromosome system in six *Leporinus* species. These authors proposed that the presence of the ZW system represents a synapomorphy, and that the six species with this system form a monophyletic group. This conclusion is reinforced by morphological traits, such as coloration patterns, relatively large body sizes, and the number of teeth, as confirmed by [Ramirez et al. \(2016\)](#), which led to the allocation of this group to a new genus, *Megaleporinus*, by [Ramirez, Birindelli & Galetti \(2017\)](#).

Using osteological markers, [Sidlauskas & Vari \(2008\)](#) evaluated the phylogenetic relationships of the anostomids, and concluded that this family is monophyletic, although they were unable to confirm the monophyly of the genus *Leporinus*. [Ramirez et al. \(2016\)](#) used nuclear and mitochondrial molecular markers to confirm the paraphyly of the genus *Leporinus*, and concluded that the recuperation of the monophyly of the group would depend on further taxonomic reviews, including the creation of new genera and the description of new species.

Traditional taxonomic approaches have been essential for the delimitation of anostomid species based on morphological traits, although this does not necessarily resolve some natural groups, given that morphologically similar species may be assigned to the same nominal taxon ([Bickford et al., 2007](#)). Deciphering and defining cryptic diversity accurately is fundamental to the understanding of the ecological, biogeographic, and evolutionary

patterns of a group of organisms, in addition to its other biological features (Kress et al., 2015).

Hebert et al. (2003) proposed the use of a DNA barcode, based on a standard sequence of the mitochondrial Cytochrome Oxidase subunit I (COI) gene, as the basis for a global species identification system. This approach has been widely-used for the identification of species and the resolution of cryptic diversity within genera and, in particular, in species complexes. A species complex consists of a group of closely-related taxa that have typically undergone recent speciation, which means that their taxonomic differences are still incipient, as observed in the case of the *Leporinus* cf. *friderici* species complex, in which Silva-Santos et al. (2018) confirmed the presence of eight distinct Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs) arranged in three clades.

*Leporinus* is not only one of the most diverse fish genera, but its species also play an important ecological role in many freshwater ecosystems, as well as having considerable economic and social importance for local fisheries. Given this, we compiled a dataset of the mitochondrial COI gene of 182,179 *Leporinus* specimens, which included specimens from the hydrographic basins of the Brazilian state of Maranhão to verify the potential intrageneric diversity of this genus, *i.e.*, the presence of different putative species for the study region.

Here we present the diversity of *Leporinus* from hydrographic basins of central northern Brazil. We used integrative taxonomy tools to assess the species diversity of *Leporinus* based on (i) morphological identification from external characters, (ii) morphological identification from dentary characters, and (iii) molecular identification from COI gene fragment.

## MATERIAL AND METHODS

### Sampling

The present study was based on the analysis of a total of 185 sequences, of which 182 were of *Leporinus* species, with the other three representing the outgroup. The vast majority (157) of these 182 *Leporinus* sequences were collected during the present study, being extracted from specimens collected from basins in the Brazilian states of Maranhão (Itapecuru, Mearim, Turiaçu, Pericumã, and Peria rivers), Piauí (Parnaíba River), and Tocantins, that is, the Tocantins River (Fig. 1 and Table S1). The other 25 sequences were obtained from GenBank (Table S2).

The samples from the rivers of Maranhão, Piauí and Tocantins were obtained during extensive fieldwork, which has been ongoing since 2006. This research was authorized by the Brazilian Institute of the Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) through license 02012.004159/2006, and licenses ICMBio/MMA 42119-1/2013, ICMBio/MMA 46367-1/2015, ICMBio/MMA 83138-1/2022, ICMBio/MMA 73790-6/2022 issued by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation.

After collection, the specimens were taken to the Genetics and Molecular Biology Laboratory (GENBIMOL) of the Advanced Studies Center of Maranhão State University (CESC/UEMA), where they photographed and registered using a coding system. Samples



**Figure 1** Sample localities. Each data point indicates the location where *Leporinus* samples were collected.

Full-size DOI: [10.7717/peerj.15184/fig-1](https://doi.org/10.7717/peerj.15184/fig-1)

of muscle tissue were extracted from the specimens for the genetic analyses. The specimens were then fixed in 10% formaldehyde and conserved in 70% alcohol, before being sent to the Museum of Zoology at Londrina State University (MZUEL) in Londrina, Paraná, Brazil, for morphological identification and cataloguing. The study of wild animals was approved by the Regulatory Committee for the Ethical Treatment of Animals of Maranhão State University (protocol 47/2022) and by the Committee for the Ethical Use of Animals of the National Institute for Amazonian Research, registered under protocol number 006/2021, SEI 01280.000116/2021-45.

The total DNA was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification kit from Promega, following the maker's instructions. The genomic region was isolated and amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR), using the universal primers COI FishF1 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGCCAC-3' and COI FishR1 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3', described by *Ward et al. (2005)*. The samples

were sequenced by the *Sanger, Nicklen & Coulson (1977)* method, using the Big Dye kit in an ABI Prism™ 3500 automatic sequencer (Applied Biosystems, EUA).

The sequences were aligned and edited in the Clustal W (*Thompson, Higgins & Gibson, 1994*) application of the Bioedit 7.2.5 program (*Hall, 1999*). All newly generated sequences (175) were deposited in GenBank under accession numbers [OP781850–OP781884](#), [OP782222–OP782283](#), [OP782350–OP7882375](#) and [OP782385–OP782418](#) (Table S1). The haplotypes were delineated in DnaSP 5.1 (*Librado & Rozas, 2009*). The mean genetic distances and the Maximum Likelihood (ML) tree were obtained in MEGA X (*Kumar et al., 2018*), using the Kimura 2-Parameter and Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) models, respectively, with the trees being reconstructed using 1,000 bootstrap replicates.

The optimum evolutionary model for the construction of the Bayesian Inference (BI) and Maximum Likelihood (ML) trees was generated in JModelTest2 (*Darriba et al., 2012*), which is available at CIPRES Science Gateway v3.3 (*Miller, Pfeiffer & Schwartz, 2010*), using the Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G+I) algorithm. The BI tree was generated in BEAST v.1.10.4 (*Drummond et al., 2012; Suchard et al., 2018*), using the relaxed lognormal clock (*Drummond et al., 2006*) and the birth-death speciation model (*Gernhard, 2008*).

This analysis was based on 40,000,000 generations with the log files being verified in Tracer v1.6 (*Rambaut et al., 2014*) to evaluate convergence and the most adequate burn-in, with the convergence being considered adequate when the Effective Sample Size (ESS) was over 200. The trees generated in BEAST were summarized in TreeAnnotator v.10.4 (*Suchard et al., 2018*) to obtain the consensus tree, which was then visualized and edited in Fig Tree v1.4.2 (*Rambaut, 2014*) and the Inkscape image editing system. Clades with a bootstrap percentage of at least 85% or posterior probability of at least 0.95 were considered to be well supported.

The delimitation analyses of the MOTUs of the COI gene were run using the following models: the Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD), Assemble Species by Automatic Partitioning (ASAP), Poisson Tree Process (PTP), and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) model. The ABGD test (*Puillandre et al., 2012*) was run in <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/> using the dataset of aligned sequences, while the ASAP test (*Puillandre, Brouillet & Achaz, 2020*) was implemented in <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/asapweb.html> using the matrix of genetic distances, extracted using MEGA X, as the input. The PTP (*Zhang et al., 2013*) was run on the web server <https://species.h-its.org/>. In this case, the input was the Maximum Likelihood phylogenetic tree produced in RaxML v.8.29 (*Stamatakis, 2014*), which is available in the CIPRES Science Gateway v3.3 (*Miller, Pfeiffer & Schwartz, 2010*). The GMYC (*Fujisawa & Barraclough, 2013*) was based on the ultrametric consensus tree constructed in BEAST v1.10.1, which was processed in the Ape (*Paradis & Schliep, 2019*), Splits (*Ezard, Fujisawa & Barraclough, 2009*), Paran (*Dinno, 2009*), and Mass (*Venables & Ripley, 2002*) packages available in the R v. 4.1.0 software (*R Core Team, 2021*).

## RESULTS

The present study focused on 182 sequences of the COI gene of *Leporinus*, each consisting of 620 base pairs (bps). The phylogenetic trees generated by the ML and BI analyses were

highly congruent and well-supported at both the intra- and interspecific levels (Figs. 2–4), except in the case of *Leporinus piau*, which grouped with either *Leporinus cf. friderici* or *Leporinus venerei*. The ABGD analysis delimited 12 MOTUs, while the ASAP defined 15, the mPTP and bPTP each delimited nine, and the GMYC, six MOTUs (Fig. 2).

The results of the five delimitation methods applied in the present study had three species in common—*L. maculatus*, *L. unitaeniatus*, and *L. affinis*—as well as differentiating two specimens (PALEP01 and PALEP09) from the basin of the Parnaíba River in a distinct molecular taxonomic unit, which indicates the occurrence of a fourth species, which we believe to be *L. piau*.

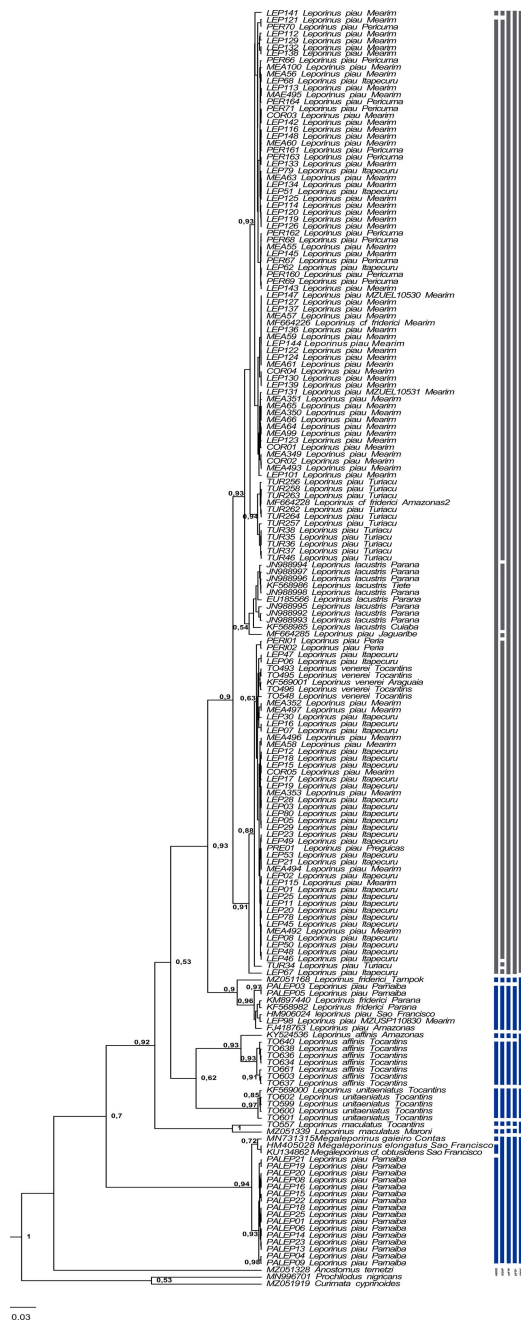
In the present study, the five delimitation methods had three species in common—*L. maculatus*, *L. unitaeniatus*, and *L. affinis*—and differentiated specimens from the basin of the Parnaíba River in a distinct molecular taxonomic unit, which is more basal than the other *Leporinus* species, and groups with the the *Megaleporinus* species that were previously assigned to *Leporinus*.

Clade VI (Fig. 3) was strongly supported, and includes *L. venerei*, *L. lacustris*, *L. piau*, and *L. cf. friderici*, with *L. piau* occurring in Maranhão, in the Mearim, Itapecuru, Pericumã, Turiaçu, Preguiças and Periaá basins. In this case, the clade was formed by *L. venerei* from the Tocantins basin, *L. lacustris* from the basin of the Paraná River, *L. piau* from the Jaguaribe, Itapecuru, Mearim, Pericumã, Turiaçu, Preguiças and Periaá basins, and *L. cf. friderici* from the Amazon and Mearim basins, which all share a single molecular taxonomic unit. Only the bPTP analysis separated *L. venerei* from *L. lacustris*, *L. piau*, and *L. cf. friderici*, which together formed a single MOTU in the ABGD, ASAP, mPTP, and GMYC models (Fig. 2).

The BI and ML analyses identified the formation of subclades within clade VI (Figs. 2 and 3), in which the *L. piau* from Maranhão, in the Itapecuru, Turiaçu, Mearim, and Periaá basins, grouped with *L. venerei* from the Tocantins basin, with genetic distances ranging from only 0.16% to 1.54% (Table S3). Other *L. lacustris* and *L. piau* subclades were identified in the Jaguaribe basin, where the genetic distances ranged from 0.0% to 3.5% (Table S3). The *L. piau* subclade from Maranhão, found in the Itapecuru, Mearim, Pericumã, and Turiaçu basins, grouped with *L. cf. friderici* from the Mearim (Maranhão) and Amazon basins (Amazonas state), with genetic distances of between 0.16% and 5.88% (Table S3). All three groups were supported by significant posterior probability (BI) and bootstrap(ML) values (Figs. 2 and 3).

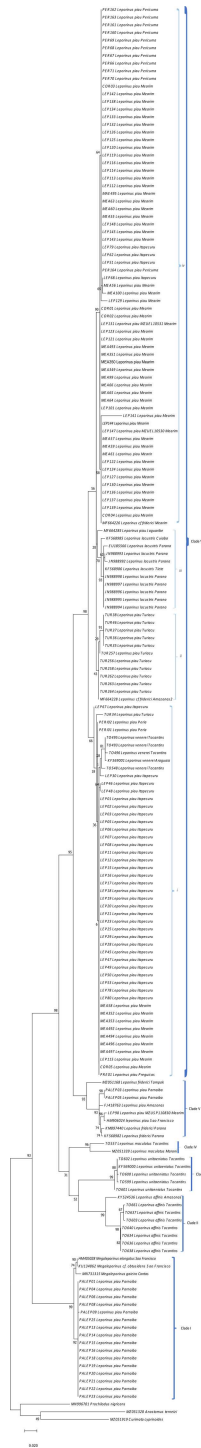
*Leporinus cf. friderici*, whose type locality is the basin of the Tampok River in French Guiana, formed a group together with *L. piau* from the basins of the São Francisco, Amazon, and Mearim rivers, an arrangement found in both the species delimitation models and the BI and ML trees. In the ABGD, ASAP mPTP, and bPTP delimitation models, however, *L. cf. friderici* was differentiated in its own operational unit (Fig. 2).

The genetic distance matrix derived from the molecular taxonomic units revealed relatively high values for both the intra- and inter-MOTU distances. The highest mean intra-MOTU distance was 5.9%, in *L. maculatus*, while the lowest mean was 0.4%, in *L. unitaeniatus*, whereas the mean inter-MOTU distances ranged from 7.8% to 17.4%. The MOTUs formed by *L. venerei*, *L. lacustris*, *L. piau*, and *L. cf. friderici* were separated by a mean genetic distance of 2.2% (Table 1). In this context, it is important to note the genetic



**Figure 2** Bayesian Inference tree showing the arrangement of the MOTUs of the *Leporinus* species analyzed in the present study. This arrangement was obtained using the ABGD, ASAP, mPTP, bPTP, and GMYC species delimitation approaches for the analysis of the mitochondrial COI gene, based on the Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G+I) algorithm, generated in BEAST. The species delimited by the specific estimates are shown by the vertical bars, with the color representing the current status of the species. The blue bars correspond to valid species, while the gray bars indicate the species delimited differently from the current classification.

Full-size  DOI: 10.7717/peerj.15184/fig-2



**Figure 3** Maximum Likelihood tree of the *Leporinus* species. Maximum Likelihood tree showing the arrangement of the *Leporinus* species based on the analysis of 185 samples of the mitochondrial COI gene using the Hasegawa-Kishino Yano (HKY+G+I) algorithm, generated in MEGA X. The node support, that is, is given by the Bayesian posterior probability/ML bootstrap values, respectively. Each clade and its subdivisions (when present) are demarcated by the brackets. The Roman numerals in upper case represent the clades, while those in lower case indicate the subclades.

Full-size  DOI: 10.7717/peerj.15184/fig-3

distance of 7.8% between *L. piau* (MOTU 1) and *L. cf. friderici* (MOTU 2), which may be the result of an error in the identification of the species of one of the groups.

Given the levels of congruence identified in the different delimitation analyses applied in the present study, the ASAP method appeared to be the most effective interpretation, in biological terms, of the dataset considered here, given that it identified 10 MOTUs, which distinguished four of the seven nominal species, including *L. venerei*, in a distinct MOTU. This confirmed the occurrence of this species the Itapecuru, Mearim, Turiaçu, Preguiças and Peria basins, which constitutes the first record of *L. venerei* in the Brazilian state of Maranhão.

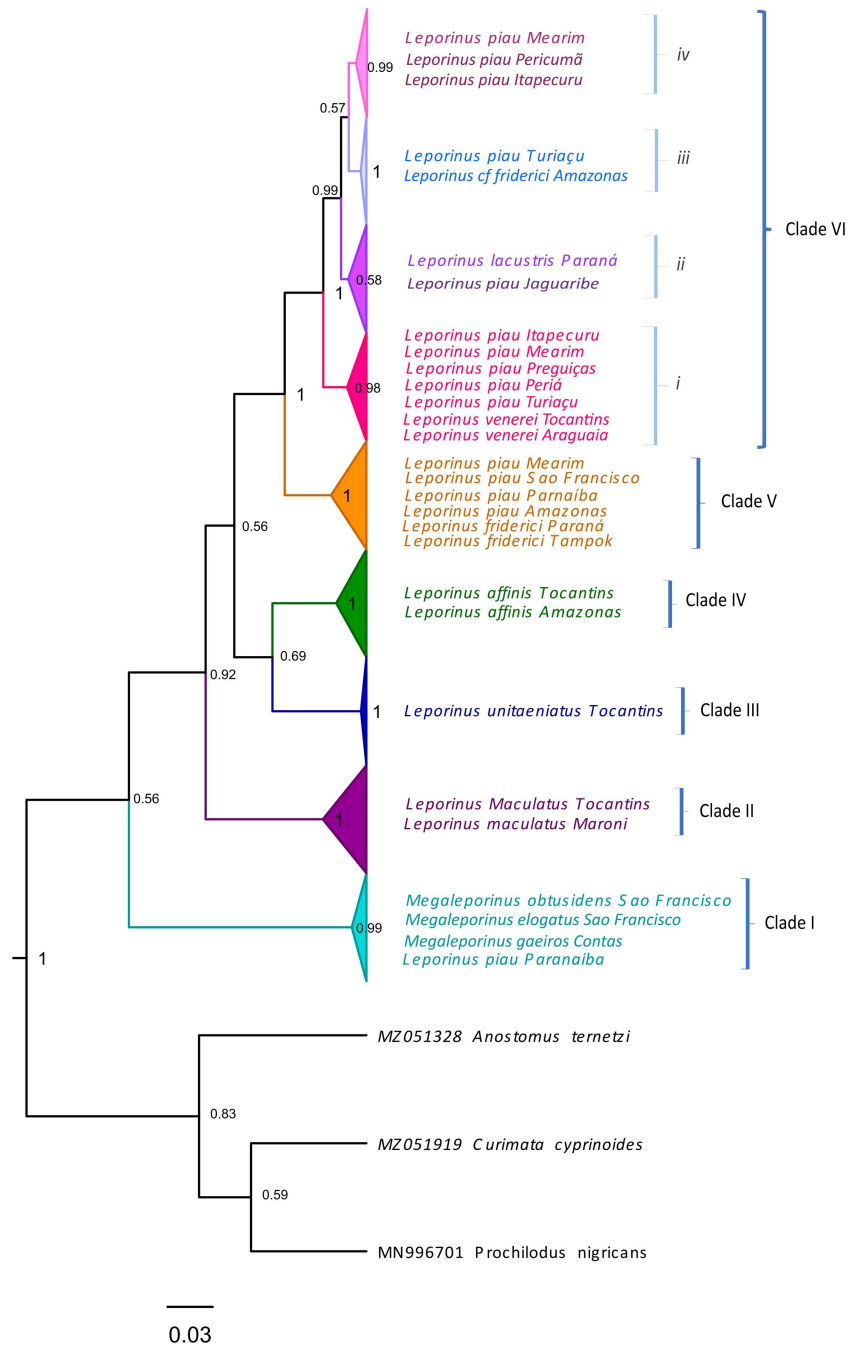
## DISCUSSION

An adequate taxonomic assessment is fundamental for the success of many types of biological research, and DNA data have provided additional insights for the resolution of taxonomic questions in many groups of organisms, including elements of the megadiverse Neotropical fish fauna, such as the anostomids. The COI barcode proved to be an extremely valuable tool for the identification and separation of the species assessed in the present study, based on the analysis of genetic distances and species delimitation, which identified evidence of the potential presence of more than one taxon in some nominal species.

In many previous studies of DNA barcoding and molecular diversity, the number of species or lineages delimited by the analysis has tended to exceed the number of nominal taxa or even the morphospecies analyzed (*Carvalho et al., 2018*). A similar tendency was observed here, in addition to the opposite pattern, given that, in some species delimitation analyses, more than one valid species was allocated to the same MOTU, as in the case of *L. venerei*, *L. lacustris*, *L. cf. friderici*, and *L. piau*.

In the present study, the *L. venerei*, *L. lacustris*, *L. cf. friderici*, and *L. piau* specimens were assigned to a single molecular taxonomic unit by the ABGD, ASAP, mPTP, and GMYC methods, reflecting their similar morphological characteristics, such as their coloration pattern, dental formula, and meristic parameters (*Table 2*), although the intra-MOTU analyses revealed mean genetic distances of 2.7% (*Table 1*), ranging from 0.0% to 6.11% (*Table S3*). This is consistent with the current classification of the valid nominal species (BI and ML analyses: *Figs. 2–4; Table 1*). All the species of clade VI shared the same morphological pattern, which is considered to be diagnostic of *L. friderici*, such as the number of spots along the lateral line (1–3) and the 4/4 dental formula, except for *L. venerei*, which has four teeth in the pre-maxilla and three in the dentary row. *Leporinus lacustris* and *L. venerei* are highly similar morphologically, given their relatively tall body, terminal mouth, long, dark anal fin, and three spots on the lateral line (*Britski & Birindelli, 2008; Silva-Santos et al., 2018*). *Leporinus piau* presents the D-type coloration pattern described by *Garavello (1979)*, which consists of three well-defined black spots on the lateral line, and four teeth in both rows, with a dental formula of 4/4. The *L. venerei*, *L. lacustris*, *L. cf. friderici*, and *L. piau* MOTU was subdivided into three subclades (*i, ii, iii* and *iv*—*Fig. 3*). Subclade *i* includes *L. piau* from Maranhão and *L. venerei* from the Tocantins basin, while subclade *ii* has *L. cf. friderici* from the Amazon and *L. piau* from the Turiaçu





**Figure 4** Collapsed Bayesian inference tree of the MOTUs of the *Leporinus* species. Collapsed Bayesian inference tree showing the arrangement of the MOTUs of the *Leporinus* species based on 185 samples of the mitochondrial COI gene analyzed using the Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+G+I) algorithm, applied in BEAST. The groups were defined by observing the congruence between the MOTUs generated in the species delimitation analyses based on the ABGD, ASAP, mPTP, bPTP, and GMYP methods.

Full-size DOI: [10.7717/peerj.15184/fig-4](https://doi.org/10.7717/peerj.15184/fig-4)

**Table 1** Mean genetic distance of the *Leporinus* and *Megaleporinus*. Mean genetic distance, based on the Kimura 2-Parameter algorithm, generated by MEGA X for the MOTUs defined by the ABGD, ASAP, mPPT, bPPT, and GMYC analyses.

MOTU	Genetic Distance					
	1	2	3	4	5	6
1. <i>Leporinus lacustris</i> + <i>Leporinus venerei</i> + <i>Leporinus piau</i> + <i>Leporinus cf friderici</i>	2.7					
2. <i>Leporinus piau</i> + <i>Leporinus friderici</i>	7.91	2.2				
3. <i>Leporinus maculatus</i>	10.89	10.58	5.9			
4. <i>Leporinus affinis</i>	12.61	11.26	11.05	1.8		
5. <i>Leporinus unitaeniatus</i>	13.04	13.49	11.97	11.27	0.4	
6. <i>Leporinus piau</i>	15.49	16.24	15.64	17.45	14.53	0.5

basins. Subclade *iii* groups *L. lacustris* and *L. piau* from the Jaguaribe basin, and subclade *iv* groups *L. piau* from Maranhão and *L. cf. friderici* from the Mearim. The composition of subclade *i* (*L. piau* and *L. venerei*—Fig. 3), together with the diagnostic morphological features of the species, indicates that the specimens from the basins of Maranhão identified as *L. piau* may in fact be *L. venerei*, which would be the first record of this species from this Brazilian state.

The *L. venerei*, *L. lacustris*, *L. cf. friderici*, and *L. piau* MOTU was subdivided into three subclades (*i*, *ii*, *iii* and *iv*—Fig. 3). Subclade *i* includes *L. piau* from Maranhão and *L. venerei* from the Tocantins basin, while subclade *ii* has *L. cf. friderici* from the Amazon and *L. piau* from the Turiaçu basins. Subclade *iii* groups *L. lacustris* and *L. piau* from the Jaguaribe basin, and subclade *iv* groups *L. piau* from Maranhão and *L. cf. friderici* from the Mearim. The composition of subclade *i* (*L. piau* and *L. venerei*—Fig. 3), together with the diagnostic morphological features of the species, indicates that the specimens from the basins of Maranhão identified as *L. piau* may in fact be *L. venerei*, which would be the first record of this species from this Brazilian state.

One other clade, formed by *L. friderici* from French Guiana and Paraná with *L. piau* from the Mearim, São Francisco, Parnaíba, and Amazon basins, is also well supported (Fig. 3). This raises two important points: (1) the clear polyphyly of *L. friderici* and *L. piau*, which, in the latter case implies a possible error of identification based on the type specimen, and (2) the existence of cryptic diversity in the genus *Leporinus*, in particular in *L. friderici*. *Silva-Santos et al. (2018)* concluded that the samples identified morphologically as *L. friderici* are in fact a polyphyletic group, given that the specimens collected from the basins of the Brazilian Shield are different from those of *L. friderici* from the type locality. The polyphyly of *L. cf. friderici* was also confirmed in the present study, which is consistent with *Silva-Santos et al. (2018)*, in which a species complex is revealed by the genetic differentiation of the populations present in distinct hydrographic basins. In this case, individuals identified consistently as *L. cf. friderici* may not in fact be conspecific with *L. friderici* from the type locality, that is, they represent different species. *Ramirez, Birindelli & Galetti (2017)* confirmed the presence of cryptic diversity in this taxon, which may represent a typical scenario of recent diversification, when closely-related taxa may be

**Table 2 Meristic traits of the adult *Leporinus* species.** Meristic traits of the adult *Leporinus* used to identify the samples analyzed in the present study, following Garavello (1979), Garavello (1989), Garavello & Santos (2007), Britski, Sato & Rosa (1984), and Britski & Birindelli (2008).

Species	Body	Coloration	Number of scales around the peduncle	Dental formula	Number of scales in the lateral line	Fin coloration
<i>L. affinis</i> Günther (1864)	Pre-dorsal somewhat convex; dorsal inclined slightly between the dorsal and adipose fins, and concave between the adipose and caudal fins.	Body yellowish, with 7 dark transversal stripes on the body and 3–4 on the head.	16	4/4	*	Peitoral and pelvic fins light yellow; all other fins hyaline.
<i>L. friderici</i> Bloch (1794)	Body tall and robust; large, with Standard Length (SL) of ca. 40 cm; body height 26–30% of SL, head length 27–29% of SL; mouth terminal.	Body brownish chestnut, with 2–4 dark spots, rounded or oval, on the lateral line.	16	4/4	38 to 40	Anal fin dark gray; all other fins yellowish-gray.
<i>L. lacustris</i> Campos (1945)	Body elongated, with a maximum standard length of 20 cm; mouth terminal; incisors truncated.	2–3 dark, rounded, mediolateral spots on the dorsal fin, the first larger and more conspicuous.	16	4/4	33 to 36	All fins yellowish, except the adipose and anal fins, which are darkened.
<i>L. maculatus</i> Müller and Troschel (1844)	Body small, with Standard Length (SL) of ca. 10 cm; body height 22–26% of SL, head length 23–25% of SL; mouth subterminal.	Body with 4 black, rounded spots connected by 3 transversal stripes, which cross the lateral line.	16	4/4	39 to 40	*
<i>L. piau</i>	Body relatively tall.	Body with 3 black spots on the flank, which are elongated horizontally.	16	4/4	35 to 37	*
<i>L. unitaeniatus</i> Garavello & Santos (2007)	Body elongated and fusiform; small, with maximum standard length of 12 cm; relatively low body (23% of the standard length); mouth subterminal.	Body yellowish, with a conspicuous black longitudinal streak running along the lateral line; 11–13 dark chestnut transversal stripes separated from the lateral line by two rows of scales.	16	4/4	40 to 44	Hyaline.

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Species	Body	Coloration	Number of scales around the peduncle	Dental formula	Number of scales in the lateral line	Fin coloration
<i>L. veneri</i> <i>Britski &amp; Birindelli</i> (2008)	Body tall; mouth terminal; anal fin long and dark.	3 small, dark spots on the lateral line, of which, the last 2, in particular, the last, are typically faded.	16	4/3	36 to 37	*

## Notes.

\*Data not available.

poorly-distinguished morphologically, creating predictable taxonomic uncertainties, such as those observed in the populations of *L. friderici*.

In the present study, the relationship found among *L. piau*, *L. friderici*, and *L. cf. friderici* (Figs. 2–4) alludes to a possible taxonomic inconsistency derived from *Fowler's* (1941) description of *L. piau*, as well as the geographic origin of the specimen analyzed in the present study, which was from the São Francisco basin. *Fowler* (1941) described *Leporinus piau* based on a type specimen from the Salgado River in the Jaguaribe basin of the Brazilian state of Ceará, but included a paratype from the Jatobá River, in the São Francisco basin, which led to the subsequent identification of most *Leporinus* specimens from the São Francisco River as *L. piau* (*Garavello & Britski, 2003; Carvalho et al., 2011*). However, *Silva-Santos et al. (2018)*, who analyzed nuclear and mitochondrial genetic markers, including COI, noted that the *Leporinus* specimens from the São Francisco basin represent a species distinct from *L. piau* from the type locality in the Jaguaribe basin. Clearly, *Fowler's* (1941) inclusion of a paratype from a distinct hydrographic basin have contributed fundamentally to the taxonomic uncertainties surrounding *L. piau*.

In the present study, *L. maculatus*, *L. unitaeniatus*, and *L. affinis* are valid nominal species, which presented considerable congruence between the traditional and molecular taxonomies. These three species constitute distinct MOTUs, which reflect their arrangement in different clades (BI and ML analyses: Figs. 2–4). All these species present easily distinguished diagnostic traits, such as the numerous spots dotting the body of *L. maculatus*, the single longitudinal stripe of *L. unitaeniatus*, and the lateral bands with no subdivisions observed in *L. affinis* (*Britski & Garavello, 2005; Sidlauskas & Vari, 2012*).

The samples from the Parnaíba basin identified here as *L. piau* and defined as a single MOTU by all the species delimitation models were grouped in a single clade with a genetic distance of 0.5%. These samples were delimited clearly as a more basal species separate from all the others, with evidence that they had been wrongly identified, and are in fact representatives of the genus *Megaleporinus*. This genus was described recently by *Ramirez, Birindelli & Galetti (2017)*, based on a combined morphological, chromosomal, and molecular approach, which assigned the large-bodied *Leporinus* to a monophyletic clade, which was denominated *Megaleporinus*. In the present study, these samples were delimited clearly as a single, basal species well separated from all the others, although a more detailed analysis would be necessary to better determine their taxonomic status.

The samples from the basins of Maranhão and Piauí, together with those from the Tocantins River collected for the present study revealed the cryptic diversity found in *Leporinus*, given that the specimens from the basins of the Itapecuru, Mearim, Pericumã, Turiaçu, Peria, and Preguiças rivers in Maranhão, and the Parnaíba River in Piauí were identified as *L. piau* based on their morphological traits. The study of the DNA barcode and the analytical tools employed here confirmed that *L. friderici* likely constitutes a polyphyletic species complex, leading to the frequent misidentification of specimens as *L. piau*. It will only be possible to resolve this scenario definitively with a systematic re-evaluation of the specimens collected from the hydrographic basins of the states of Maranhão and Piauí.

In the specific case of subclade *i* (Fig. 3; Tables S3-S4), which groups *L. piau* from Maranhão with *L. venerei* from the Tocantins basin, the most parsimonious interpretation of the results of this analysis, together with the diagnostic traits of the two species, would be to consider them to be a single taxon, that is, *L. venerei*. This would thus be the first record of *L. venerei* from the basins of the Itapecuru, Mearim, Turiaçu, and Peria rivers, in the state of Maranhão.

Prior to the present study, three *Leporinus* species were considered to be present in the hydrographic basins of the Brazilian state of Maranhão—*L. affinis*, in the Itapecuru basin (Abreu et al., 2019), *L. friderici* in the Itapecuru, Mearim, Maracaçumé, Munim, Peria, and Parnaíba basins (Piorski et al., 1998; Soares, 2005; Ramos, Ramos & Ramos, 2014; Melo et al., 2016; Abreu et al., 2019; Brito et al., 2019; Brito et al., 2020; Guimarães et al., 2021a; Guimarães et al., 2021b; Guimarães et al., 2021c), and *L. piau* in the basins of the Itapecuru, Mearim, Turiaçu, and Parnaíba rivers (Barros, Fraga & Birindelli, 2011; Ramos, Ramos & Ramos, 2014; Ribeiro et al., 2014; Assega & Birindelli, 2019; Abreu et al., 2019). Based on analyses of molecular data, however, Fraga et al. (2014) and Nascimento et al. (2016) found evidence of two distinct lineages in the *L. piau* group from the Itapecuru basin, while in the present study, *L. piau* was assigned to three different clades, being associated strongly with *L. cf. friderici* in two clades and with *L. venerei* in one. This leads us to conclude that *L. piau* is, in fact, absent from the basins of Maranhão, which are instead populated by *L. cf. friderici* and *L. venerei*, with the latter being recorded in Maranhão for the first time. This restricts *L. piau* to the basin of the Parnaíba River.

## CONCLUSIONS

The molecular analyses presented here, including the different species delimitation approaches, identified the presence of four *Leporinus* species in the hydrographic basins of central northern Brazil—*L. maculatus*, *L. unitaenitus*, *L. affinis*, and *L. venerei*. However, the species delimitation analyses also assigned *L. cf. friderici* and *L. piau* to two different molecular operational units, which leads us to believe that an additional species, morphologically indistinguishable from *L. cf. friderici*, may be present. The analyses also revealed a distinct group of two of the specimens, which indicates emphatically the presence of *L. piau* in the basin of the Parnaíba River, which indicates the presence of a total of six nominal species in the hydrographic basins of central northern Brazil. The confirmation of the presence of *L. venerei* in the Itapecuru, Mearim, Turiaçu, Preguiças and Peria basins

represents a new record for the state of Maranhão, amplifying the known distribution of this species in Brazil.

## ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

### Funding

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão and Banco do Nordeste do Brazil. The Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão and Banco do Nordeste do Brazil had a role in the study design, data collection and analysis.

### Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:

Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão.

Banco do Nordeste do Brazil. The Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão.

Banco do Nordeste do Brazil.

### Competing Interests

The authors declare there are no competing interests.

### Author Contributions

- Maria Histelle Sousa Nascimento conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.
- Deborah Gaído Aragão performed the experiments, prepared figures and/or tables, and approved the final draft.
- Jordânia Leticia Nascimento Silva performed the experiments, prepared figures and/or tables, and approved the final draft.
- Renato Correia Lima performed the experiments, prepared figures and/or tables, and approved the final draft.
- José Luis Olivan Birindelli performed the experiments, analyzed the data, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.
- Elmary Costa Fraga conceived and designed the experiments, analyzed the data, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.
- Maria Claudene Barros conceived and designed the experiments, analyzed the data, authored or reviewed drafts of the article, and approved the final draft.

### Animal Ethics

The following information was supplied relating to ethical approvals (*i.e.*, approving body and any reference numbers):

Committee for the Ethical Treatment of Animals of Maranhão State University (protocol 47/2022) and by the Committee for the Ethical Use of Animals of the National Institute for

Amazonian Research, registered under protocol number 006/2021, SEI 01280.000116/2021-45.

### Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:

The data is available at NCBI GenBank: [OP781850](#) to [OP781884](#), [OP782222](#) to [OP782283](#), [OP782350](#) to [OP7882375](#) and [OP782385](#) to [OP782418](#).

### Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.15184#supplemental-information>.

## REFERENCES

- Abreu JMS, Craig JM, Albert JS, Piorski NM. 2019. Historical biogeography of fishes from coastal basins of Maranhão State, northeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 17(2):e180156 DOI 10.1590/1982-0224-20180156.
- Ardura A, Linde AR, Moreira JC, Garcia-Vazquez E. 2010. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. *Biological Conservation* 143:1438–1443 DOI 10.1016/j.biocon.2010.03.019.
- Assega FY, Birindelli JLO. 2019. Taxonomic revision of the genus *Anostomoides* (Characiformes: Anostomidae). *Zootaxa* 4646(1):124–144 DOI 10.11646/ZOOTAXA.4646.1.7.
- Barros MC, Fraga EC, Birindelli JLO. 2011. Fishes from the Itapecuru River basin, State of Maranhão, Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 71(2):375–380 DOI 10.1590/S1519-69842011000300006.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22:148–155 DOI 10.1016/j.tree.2006.11.004.
- Birindelli JLO, Britski HA, Ramirez JL. 2020. A new endangered species of *Megaleporinus* (Characiformes: Anostomidae) from the Rio de Contas basin, eastern Brazil. *Journal of Fish Biology* 96(6):1349–1359 DOI 10.1111/jfb.14299.
- Borodin NA. 1929. Notes on some species and subspecies of the genus *Leporinus* Spix. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoölogy* 50:269–290.
- Brito OS, Guimarães EC, Ferreira BRA, Ottoni FP, Piorski NM. 2019. Freshwater fishes of the Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses and adjacent areas. *Biota Neotropica* 19(3):e20180660 DOI 10.1590/1676-0611-BN-2018-0660.
- Brito OS, Guimarães EC, Ferreira BRA, Santo SJP, Amaral YT, Ottoni FP. 2020. Updated and supplementary data on Brito et al. (2019): Freshwater fishes of the PN dos Lençóis Maranhenses and adjacent areas. *Ichthyological Contributions of Pecescriollos* 73:1–17.
- Britski HA, Birindelli JLO. 2008. Description of a new species of the genus *Leporinus* Spix (Characiformes: Anostomidae) from the rio Araguaia, Brazil, with comments

- on the taxonomy and distribution of *L. parae* and *L. lacustris*. *Neotropical Ichthyology* 6:45–51 DOI 10.1590/S1679-62252008000100005.
- Britski HA, Birindelli JL. 2019.** Description of a new species of *Leporinus* (Characiformes: Anostomidae) from the Rio Tapajós basin, Brazil. *Zootaxa* 4603(1):183–191 DOI 10.11646/zootaxa.4603.1.10.
- Britski HA, Garavello JC. 1978.** Sobre *Leporinus octofasciatus* steindachner da bacia do Paraná (Pisces, Anostomidae). *Papéis Avulsos de Zoologia* 31(16):237–250.
- Britski HA, Garavello JC. 2005.** Uma nova espécie de *Leporinus* Agassiz, 1829, da Bacia Amazônica (Ostariophysi: Characiformes: Anostomidae). *Comunicações do Museu de ciências e Tecnologia da PUCRS: Série Zoologia* 18(2):75–83.
- Britski HA, Sato Y, Rosa ABS. 1984.** *Manual de identificação de peixes da Região de Três Marias*. Brasília: Câmara dos Deputados/CODEVASF, 143.
- Burns MD, Chatfield M, Birindelli JLO, Sidlauskas BL. 2017.** Systematic assessment of the *Leporinus* desmotes species complex, with a description of two new species. *Neotropical Ichthyology* 15(2):e160166 DOI 10.1590/1982-0224-20160166.
- Carvalho APC, Collins RA, Martínez JG, Farias IP, Hrbek T. 2018.** From shallow to deep divergences: mixed messages from Amazon Basin cichlids. *Hydrobiologia* 832:317–329 DOI 10.1007/s10750-018-3790-x.
- Carvalho DC, Oliveira DA, Pompeu PS, Leal CG, Oliveira C, Hanne R. 2011.** Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the Sao Francisco River basin. *Mitochondrial DNA* 22(Supp 1):80–86 DOI 10.3109/19401736.2011.588214.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012.** JModelTest2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9:772.
- Dinno A. 2009.** Exploring the sensitivity of horn's parallel analysis to the distributional form of simulated data. *Multivariate Behavioral Research* 44(3):362–388 DOI 10.1080/00273170902938969.
- Drummond AJ, Simon YW, Phillips MJ, Rambaut A. 2006.** Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLOS Biology* 4(5):e88 DOI 10.1371/journal.pbio.0040088.
- Drummond AJ, Suchard AM, Xie D, Rambaut A. 2012.** Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29(8):1969–1973 DOI 10.1093/molbev/mss075.
- Ezard T, Fujisawa T, Barraclough TG. 2009.** SPLITS: SPecies' Limits by Threshold Statistics. R package version 1.0-18/r45. Available at <http://R-Forge.R-project.org/projects/splits/>.
- Fowler HW. 1941.** Academy of natural sciences a collection of fresh-water fishes obtained in Eastern Brazil by Dr. Rodolpho Von Ihering. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 93:123–199.
- Fraga E, Silva LMM, Schneider H, Sampaio I, Barros MC. 2014.** Variabilidade genética em populações naturais de *Leporinus piau* (Anostomidae, Characiformes) da bacia do Rio Itapecuru. *Revista Trópica* 8(2):28–40.



- Frantine-Silva W, Sofia SH, Orsi ML, Almeida FS. 2015.** DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. *Molecular Ecology Resources* **15**(5):1226–1237 DOI [10.1111/1755-0998.12385](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12385).
- Fricke R, Eschmeyer W, Laan RVanDer. 2021.** CAS - Eschmeyer's Catalog of Fishes - Species by Family. 2021. Available at <https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> (accessed 13 September 2021).
- Fujisawa T, Barraclough TG. 2013.** Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed yule coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulated datasets. *Systematic Biology* **62**:707–724 DOI [10.1093/sysbio/syt033](https://doi.org/10.1093/sysbio/syt033).
- Galetti Jr PM, Lima NRW, Venere PC. 1995.** A monophyletic ZW sex chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). *Cytologia* **60**:375–382 DOI [10.1508/cytologia.60.375](https://doi.org/10.1508/cytologia.60.375).
- Garavello JC. 1979.** *Revisão taxonômica do gênero Leporinus Spix, 1829 (ostariophysii, Anostomidae)* Tese de Doutorado. São Paulo: Universidade de São Paulo..
- Garavello JC. 1989.** *Leporinus microphthalmus* sp.n. Bacia do Rio Paranaíba, Alto Paraná (Pisces, Anostomidae). *Revista Brasileira de Biologia* **49**(2):497–501.
- Garavello JC, Britski HA. 2003.** Family Anostomidae. REIS and others, RE. Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre, Editora da Pontifícia Universidade Católica do rio Grande do Sul. 71–84.
- Garavello JC, Santos GM. 2007.** Two news species of *Leporinus* Agassiz, 1829 from Araguaia-Tocantins system, Amazon basin, Brazil (Ostariophysii, Anostomidae). *Brazilian Journal of Biology* **69**(1):109–116.
- Gernhard T. 2008.** The conditioned reconstructed process. *Journal of Theoretical Biology* **253**(4):769–778 DOI [10.1016/j.jtbi.2008.04.005](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.04.005).
- Géry J. 1977.** *Characoids of the world*. Neptune City: T.F.H. Publications.
- Guimarães EC, Brito OS, Oliveira RF, Aguiar RG, Ottoni FP, Guimarães KLA, Santos JP, Rodrigues LRR. 2021a.** *Peixes do rio Pindaré e suas potencialidades ornamentais*. São Luís: IMESC.
- Guimarães EC, Brito OS, Santos JP, Oliveira FR, FP Ottoni. 2021c.** Supplementary material to Guimarães others (2020): Peixes, Fauna de vertebrados ao longo da Estrada de Ferro Carajás. *Ichthyological Contributions of PecesCriollos* **1**:1–10.
- Guimarães EC, Oliveira RF, Brito OS, Vieira LO, Santos JP, Oliveira ES, Aguiar RG, Katz AM, Lopes DF, Nunes JLS, Ottoni FP. 2021b.** *Biodiversidade, potencialidades ornamentais e guia ilustrado dos peixes da Mata Itamacaoca município de Chapadinha-MA*. São Luis: IMESC.
- Hall TA. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**:95–98.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, De Waard JR. 2003.** Biological 58 identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **270**(1512):313–321 DOI [10.1098/rspb.2002.2218](https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218).

- Kress WJ, García-Robledo C, Uriarte M, Erickson DL. 2015.** DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **30**:25–35 DOI [10.1016/j.tree.2014.10.008](https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.10.008).
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyar C, Tamura K. 2018.** MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* **35**:1547–1549 DOI [10.1093/molbev/msy096](https://doi.org/10.1093/molbev/msy096).
- Librado P, Rozas J. 2009.** DNAsp v5: a software for comprehensive analyses of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**:1451–1452 DOI [10.1093/bioinformatics/btp187](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187).
- Melo FAG, Buckup PA, Ramos TPA, Souza AKN, Silva CMA, Costa TC, Torres AR. 2016.** Fish fauna of the lower course of the Parnaíba river, northeastern Brazil. *Boletim do Museu de Biologia* **38**(4):363–400.
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. 2010.** Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: *Proceedings of the gateway computing environments workshop*. 1–8.
- Myers GS. 1950.** Studies on South American fresh-water fishes. II. The genera of Anostominae Characids. *Stanford Ichthyological Bulletin* **3**:184–198.
- Nascimento MHS, Almeida MS, Veira MNS, Limeira Filho D, Lima RC, Barros MC, Fraga EC. 2016.** DNA barcoding reveals high levels of genetic diversity in the fishes of the Itapecuru Basin in Maranhão, Brazil. *Genetics and Molecular Research* **15**(3):1–11 DOI [10.4238/GMR.15038476](https://doi.org/10.4238/GMR.15038476).
- Papa Y, Bail PYLE, Covain R. 2021.** Genetic landscape clustering of a large DNA barcoding data set reveals shared patterns of genetic divergence among fresh-water fishes of the Maroni Basin. *Molecular Ecology Resources* **21**(6):2109–2124 DOI [10.1111/1755-0998.13402](https://doi.org/10.1111/1755-0998.13402).
- Paradis E, Schliep K. 2019.** Ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* **35**:526–528 DOI [10.1093/bioinformatics/bty633](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633).
- Pereira LH, Hanner R, Foresti F, Oliveira C. 2013.** Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genomic Data* **14**:20 DOI [10.1186/1471-2156-14-20](https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-20).
- Piorski NM, Castro ACL, Pereira LG, Muniz MEL. 1998.** Ictiofauna do trecho inferior do Rio Itapecuru, nordeste do Brasil. *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia* **11**:15–24.
- Puillandre N, Brouillet S, Achaz G. 2020.** ASAP: Assemble Species by Automatic Partitioning. *Molecular Ecology Resources* **21**:609–620.
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G. 2012.** ABGD, Automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology* **21**(8):1864–1877 DOI [10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x).
- R Core Team. 2021.** R: A language and environment for statistical computing. Version 4.1.0. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available at <https://www.r-project.org>.

- Rambaut A.** 2014. FigTree v1.4.2. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ.** 2014. Tracer v1.6. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>.
- Ramirez JL, Birindelli JLO, Galetti PM.** 2017. Um novo gênero de Anostomidae (Ostariophysi: Characiformes): diversidade, filogenia e biogeografia com base em dados citogenéticos, moleculares e morfológicos. *Molecular Phylogenetic Evolution* 107:308–323 DOI 10.1016/j.ympev.2016.11.012.
- Ramirez JL, Carvalho-Costa LF, Venere PC, Carvalho DC, Troy WP, Galetti PM.** 2016. Testing monophyly of the freshwater fish Leporinus (Characiformes, Anostomidae) through molecular analysis. *Journal of Fish Biology* 88(3):1204–1214 DOI 10.1111/jfb.12906.
- Ramirez JL, Santos CA, Machado CB, Oliveira AK, Garavello JC, Britski HA, Galetti PM.** 2020. Molecular phylogeny and species delimitation of the genus *Schizodon* (Characiformes, Anostomidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 153:106959 DOI 10.1016/j.ympev.2020.106959.
- Ramos TPA, Ramos RTC, Ramos SAQA.** 2014. Ichthyofauna of the Parnaíba river basin, northeastern Brazil. *Biota Neotropical* 14(1):1–8 DOI 10.1590/S1676-06020140039.
- Ribeiro MFR, Piorski NM, Almeida ZS, Nunes JLS.** 2014. Fish aggregating known as moita, an artisanal fishing technique performed in the Munim River, State of Maranhão, Brazil. *Boletim Instituto de Pesca* 40(4):677–682.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(12):5463–5467 DOI 10.1073/pnas.74.12.5463.
- Sidlauskas BL, Vari RP.** 2008. Phylogenetic relationships within the South American fish family Anostomidae (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). *Zoological Journal of the Linnean Society* 154(1):70–210 DOI 10.1111/j.1096-3642.2008.00407.x.
- Sidlauskas BL, Vari RP.** 2012. Diversity and distribution of anostomoid fishes (Teleostei: Characiformes) throughout the Guianas. *Cybium* 36(1):71–103.
- Silva-Santos R, Ramirez JL, Freitas PD, Galetti Jr PM, Freitas PD.** 2018. Molecular evidences of a hidden complex scenario in *Leporinus cf. friderici*. *Frontiers in Genetics* 9:47 DOI 10.3389/fgene.2018.00047.
- Soares EC.** 2005. *Peixes do Mearim*. São Luís: Instituto Geia.
- Stamatakis A.** 2014. RAxML Version 8: a tool for phylogenetic analysis and postanalysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30(9):1312–1313 DOI 10.1093/bioinformatics/btu033.
- Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A.** 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution* 4(1):vey016 DOI 10.1093/ve/vey016.

- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**:4673–4680 DOI [10.1093/nar/22.22.4673](https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673).
- Venables WN, Ripley BD. 2002.** *Modern Applied Statistics with S*. Fourth edition. New York: Springer. Available at <https://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4/>.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. 2005.** DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* **360(1462)**:1847–1857 DOI [10.1098/rstb.2005.1716](https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716).
- Zhang J, Kapli P, Pavlidis P, Stamatakis A. 2013.** A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* **29(22)**:2869–2876 DOI [10.1093/bioinformatics/btt499](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt499).