



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

ELIZANGELA TAVARES BATISTA

Código de barras de DNA (*DNA Barcode*) de espécies de bagres (Ordem Siluriformes) de valor comercial da Amazônia brasileira

MANAUS
2017

ELIZANGELA TAVARES BATISTA

Código de barras de DNA (DNA *Barcode*) de espécies de bagres (Ordem Siluriformes) de valor comercial da Amazônia Brasileira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais

Orientador: Prof Dra. Jacqueline da Silva Batista

**MANAUS
2017**

ELIZANGELA TAVARES BATISTA

Código de barras de DNA (DNA *Barcode*) de espécies de bagres (Ordem Siluriformes) de valor comercial da Amazônia Brasileira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais

Data da aprovação ___/___/___

Banca Examinadora:

**MANAUS
2017**

Dedicatória.

À minha família, especialmente ao meu filho Miguel.

Nada é tão nosso como os nossos sonhos.

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar e permitir que tudo isso fosse possível.

À Dra. Jacqueline da Silva Batista pela orientação, ensinamentos e pela paciência nesses dois anos.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia MBT/UEA.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia. Ao Prof. Cleiton Fantin, por ser sempre prestativo com os alunos.

Ao Laboratório Temático de Biologia Molecular LTBM/INPA, pela infraestrutura. Ao projeto “PIRADA”, pelo apoio logístico.

Aos meus pais (José e Irene), pelo amor que mesmo distante, sempre me apoiaram e incentivaram nos estudos.

Ao Marcos por todo carinho e apoio, por sempre acreditar mais em mim do que eu mesma.

Aos amigos do MBT/UEA, que conheci durante o curso.

Aos amigos do LTBM/INPA, principalmente ao Antônio Saulo pelas contribuições técnicas e científicas, pela disponibilidade e boa vontade em ajudar.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

A bacia Amazônica apresenta a maior diversidade ictica do Brasil. Dentre a ordem mais abundante na região está incluída a Ordem Siluriformes. A Ordem Siluriformes apresenta uma grande quantidade de espécies de peixes comercializadas na Amazônia. A ferramenta molecular DNA barcode é utilizada para a caracterização de espécies em diversos tipos de animais, inclusive em peixes, por meio do uso de um marcador mitocondrial, região Citocromo Oxidase I. O presente trabalho objetivou-se identificar maior número de espécies da Ordem Siluriformes. Foram obtidas e analisadas 363 sequências do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI), pertencentes a 33 espécies de 21 localidades da Amazônia brasileira. As 33 espécies pertencentes a 22 gênero 7 famílias da Ordem Siluriformes, apresentaram um total de 129 haplótipos. Todas as sequencias foram submetidas aos bancos de dados público (GenBank e Bold). Cerca de 96% foram combinados com sequências das referidas espécies esperadas, de acordo com a identificação morfológica. A distância genética K2P média intraespecífica encontrada foi de 0,003, e a interespecífica foi de 0,13. A maioria das espécies apresentaram baixos valores de divergência genética interespecífica (<2%), porém todas puderam ser corretamente identificadas. O Códigode barra de DNA interage entre a Taxonômia Clássica e Molecular para uma identificação precisa das espécies. Os resultados do presente trabalho demonstraram que como ferramenta taxonômica, o DNA *Barcode* pode ser usado para a identificação molecular de peixes da Ordem Siluriformes.

Palavras-chave: Siluriformes; DNA Barcode; DNA mitocondrial; Citocromo Oxidase subunidade I.

ABSTRACT

The Amazon basin presents the greatest ictic diversity in Brazil. Among the most abundant order in the region is the Order Siluriformes. The Order Siluriformes presents a great amount of species of fish commercialized in the Amazon. The molecular tool DNA barcode is used for the characterization of species in several types of animals, including in fish, through the use of a mitochondrial marker, Cytochrome Oxidase I region. The present work aimed to identify more species of Siluriformes Order. A total of 363 Cytochrome Oxidase subunit I (COI) gene sequences were obtained and analyzed, belonging to 33 species from 21 Brazilian Amazonian locations. The 33 species belonging to 22 genus 7 families of the Order Siluriformes, presented a total of 129 haplotypes. All sequences were submitted to the public databases (GenBank and Bold). About 96% were combined with sequences of said expected species, according to the morphological identification. The intraspecific average K2P genetic distance found was 0.003, and the interspecific genetic distance was 0,13. Most species had low interspecific genetic divergence values (<2%), but all could be correctly identified. The DNA bar code interacts between Classical and Molecular Taxonomy for an accurate identification of the species. The results of the present work demonstrated that as a taxonomic tool, the DNA Barcoding can be used for the molecular identification of fish of the Order Siluriformes.

Keywords: Siluriformes; DNA Barcoding; Mitochondrial DNA; Cytochrome Oxidase I subunit.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 01. Genoma mitocondrial em vertebrados, destacando-se a região do gene citocromo oxidase subunidade I (COI) (Fonte: Pereira, 2000)16
- Figura 02. Analogia entre o DNA Barcode e o código de barras convencional.....17
- Figura 03. Modelo do *barcoding* gap. (A) Distribuições intraespecíficas e interespecíficas não se sobrepõem. (B) Sobreposição dos níveis intraespecífica e interespecífica (Fonte: MEYER E PAULAY 2005)20

CAPÍTULO I

- Figura 01- Localização dos 26 pontos de coleta de exemplares de espécies de peixes Siluriformes de valor comercial para obtenção do código de barras de DNA.....32
- Figura 02- Árvore Neighbour-joining de haplótipos com todas as espécies (morfotipos) do gênero *Hypophthalmus*.....37
- Figura 03. Dendrograma de haplótipos obtido por Neighbour-joining com distância K2P, mostrando as 33 espécies de Siluriformes analisadas.....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Localidades de coleta das espécies de bagres de valor comercial e número de indivíduos amostrados para obtenção do código de barras de DNA.....	33
Tabela 02. Distância genética intra e interespecífica entres os morfotipos do Gênero <i>Hypophthalmus</i>	38
Tabela 03. Resultado ABGD do conjunto de dados estudado revelando grupos na partição 6 (distância máxima P = 0,012915)	39
Tabela 04. Lista das espécies comparadas com sequências provenientes dos Bancos de dados público, usando a pesquisa <i>BLASTN</i> do <i>NCBI</i> e Sistema de identificação <i>BOLD (BOLD-IDS)</i>	50
Tabela 05. Matriz com as distâncias genéticas intraespecíficas e interespecíficas.....	52

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FÍGURAS.	9
LISTA DE TABELAS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 A bacia amazônica e diversidade da ictiofauna.....	13
2.2 A Ordem Siluriformes.....	15
2.3 DNA Mitocondrial.....	15
2.4 Código de Barras de DNA.....	17
2.5 DNA Barcode em peixes	20
3. OBJETIVO GERAL.....	23
3.1 Objetivo específico.....	23
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
CAPÍTULO I.....	29
Código de barras de DNA (DNA Barcode) de espécies de bagres (Ordem Siluriformes) de valor comercial da Amazônia Brasileira.....	29
Resumo.....	30
1. INTRODUÇÃO.....	30
2. MATERIAL e METODOS.....	32
2.1 Amostragem.....	33
2.2 Extração de DNA.....	34
2.3 Amplificação por PCR– reação em cadeia da polimerase.....	34
2.4 Purificação e sequenciamento do DNA.....	34
2.5 Análise de dados	34
3. RESULTADOS.....	35
4. DISCUSSÃO.....	41
5. CONCLUSÃO.....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ANEXOS.....	49

1 INTRODUÇÃO

Os peixes representam o grupo de maior biodiversidade dentre os vertebrados. Atualmente estima-se que existem aproximadamente 33.600 espécies de peixes distribuídos no mundo, tanto marinhos quanto de água doce (FISHBASE, 2017). A região Neotropical abriga uma das maiores ictiofaunas continentais, com cerca de 4,164 espécies (REIS *et al.*, 2003). Tal riqueza para a região Neotropical está estimada na ordem de 8.000 espécies de peixes (VARI & MALABARBA, 1998), e que ocorram entre 2.400 a 3.000 espécies na bacia amazônica (LEVEQUÊ *et al.*, 2008).

A Amazônia ocupa uma área de 6.112.000 Km² e inclui os países: Equador, Colômbia, Venezuela, Guianas, Peru, Bolívia e Brasil; compreendendo cerca de um terço de toda a América do Sul, na qual abriga a maior bacia hidrográfica do mundo (JUNK, *et al.*, 2011). Neste vasto território, os recursos hídricos em especial os peixes são de grande importância. Tanto para fornecer alimento como fonte de proteína, quanto de renda para os moradores locais, sustentando uma captura anual de milhares de toneladas de pescado para a alimentação (FABRÉ & ALONSO 1998; GANDRA, 2010).

Dentre essa ampla variedade de espécies de peixes existentes na Amazônia. A Ordem Siluriformes é grande e diversificada com muitos gêneros e espécies de importância ecológica e econômica (BARTHEM & GOULDING, 2007). Os Siluriformes compreendem os peixes conhecidos como bagres, cascudos, mandis, peixe-gato ou peixes lisos. São mais diversos e amplamente distribuídos do grupo Ostariophysi, com 36 famílias, 477 gêneros e aproximadamente 3.088 espécies (FERRARIS, 2007). Na região Neotropical, os Siluriformes estão representados por 15 famílias e 1.650 espécies válidas, e estima-se que existam mais de 600 espécies ainda não descritas (REIS *et al.*, 2003).

A identificação taxonômica de espécies biológicas com base em caracteres morfológicos, geralmente, é um processo lento que requer a análise por um especialista no táxon (HEBERT, *et al.*, 2003). Devido a dúvidas taxonômicas e outros problemas de identificação de espécies, a análise de genes, é uma alternativa a se considerar para complementar a identificação taxonômica. Diante da necessidade de prover rapidamente informações básicas sobre a biodiversidade visando à conservação das espécies, foi adotada o método de identificação molecular baseado em um marcador genético denominado de DNA *Barcode* ou código de barras de DNA. O grande objetivo do DNA *Barcode*, é fornecer um método rápido, preciso e automático para identificação das espécies utilizando regiões padronizadas do DNA (HEBERT, *et al.*, 2003).

O DNA *Barcode* tem sido eficiente na identificação de espécies em diferentes grupos taxonômicos como peixes, aves, mamíferos, reptéis, anfíbios, invertebrados e fungos (WARD, *et al.*, 2005; PERREIRA, *et al.*, 2013; HEBERT, *et al.* 2004 a; CLARE, *et al.*, 2007; MEGANATHAN, *et al.*, 2013; VENCES, *et al.*, 2005; HEBERT, *et al.*, 2004; ANDREAKIS, *et al.*, 2015).

Vem sendo utilizado para diversas aplicações biológicas, tais como identificação de espécies crípticas, detecção de espécies invasoras no ecossistema, espécies recentemente descritas, revisões taxonômicas, detecção de cadeias alimentares como a relação predador-presa, luta contra o comércio ilegal de espécies ameaçadas de extinção e madeira extraída ilegalmente (COSTION, *et al.*, 2011).

Em peixes, DNA *Barcode* é uma ferramenta molecular poderosa para a identificação rápida e precisa, na descoberta de novas espécies, na detecção de fraude e substituições dos produtos de pesca, na regulamentação de peixes comercializados ilegalmente e auxilia a pesquisa, visando a conservação de espécies em risco (COSTA & CARVALHO, 2007; ASGHARIAN, *et al.*, 2011; SMITH, *et al.*, 2011; WARD, *et al.*, 2008; BARBUTO, *et al.*, 2010; CARVALHO, *et al.*, 2011; CAWTHORN, *et al.*, 2012; ARDURA, *et al.*, 2010; CARVALHO, *et al.*, 2008).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A bacia amazônica e Diversidade da Ictiofauna

A amazônia brasileira possui uma bacia hidrográfica com cerca de 6.112.000 km², cerca de 68% de sua área de drenagem situa-se em território brasileiro que se estende por nove Estados: Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e Maranhão, sendo o restante distribuído pelos países do norte da América do Sul: Peru, Colômbia, Equador, Bolívia, Venezuela, Guiana Inglesa, Guiana Francesa e Suriname (JUNK, *et al.*, 2011).

Existem aproximadamente 33.600 espécies de peixes no mundo, representando pouco mais da metade de todos os vertebrados conhecidos (FISHBASE, 2017). Destas, 13000 habitam estritamente ambientes de água doce (LÉVÊQUE, *et al.*, 2008).

Nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre há maior abundância de espécies de peixes em relação às demais regiões, sendo que na região equatorial encontra-se a maior diversidade ictíica existente (VARI & MALABARBA, 1998; LEVEQUÊ, *et al.*, 2008). São

descritas cerca de 4.164 espécies somente para a região Neotropical (REIS, *et al.* 2003). Novas espécies são descritas, anualmente, aumentando as estimativas da diversidade de espécies da ictiofauna de água doce neotropical. Desse modo, calcula-se que a fauna de peixes de água doce da Américas do Sul e Central cheguem, atualmente, a um total de 8000 espécies (VARI & MALABARBA, 1998). Maioria dos peixes neotropicais da América do Sul pertence a cinco grupos dominantes: Characiformes (1.500 espécies descritas, com expectativa para 2.000 espécies), Siluriformes (1.400 espécies com probabilidade para 2.000), Gymnotiformes (180 espécies), Cyprinodontiformes (400 espécies) e Perciformes (450 espécies) (LÉVÊQUE, *et al.* 2008).

A formação da bacia amazônica foi um dos fatores responsáveis pela diversidade da fauna de peixes de água doce neotropical (VARI & MALABARBA, 1998). De acordo com Lévêque *et al.* (2008), são estimadas aproximadamente 2.416 espécies, e destas 2.072 são endêmicas da região.

Segundo Buckup *et al.* (2007), o Brasil é líder em número de peixes de água doce, com cerca de 2.122 espécies catalogadas (21% das espécies do mundo). Na região amazônica, tem cerca de 1.300 espécies catalogadas (ANJOS, 2009).

Segundo Lowe-McConnell (1999), a alta diversidade ictica presente na Amazônia é atribuída a fatores como: a idade e o tamanho do sistema de drenagem; a sucessão de habitats oferecidos pelos rios de meandro; os diversos nichos presentes nos rios de planície e lagos adjacentes; a alta proporção da bacia em terras de nível baixo; e a incorporação de rios de outras bacias que geram o intercâmbio de fauna.

2.2 A Ordem Siluriformes

Os Siluriformes, popularmente conhecidos como bagres, peixes lisos, cascudos, mandis e peixe-gato, são os peixes mais amplamente distribuídos dentro da Superordem Ostariophysi. A Ordem é composta por 36 famílias, 477 gêneros e 3.088 espécies (FERRARIS, 2007). Na região Neotropical, os Siluriformes estão representados por 15 famílias e 1.650 espécies válidas, e estima-se que existam mais de 600 espécies ainda não descritas (REIS, *et al.*, 2003).

Os bagres compoem um dos grupos mais abundantes da ictiofauna neotropical, têm sua distribuição geográfica em todas as principais bacias hidrográficas da América do Sul, do centro da Argentina até a Bacia do Orinoco e também se estendendo para a Colômbia e o Panamá (REIS, *et al.*, 2003; FERRARIS, 2007). Apesar da grande maioria dos peixes da Ordem Siluriformes

ocorrer ambientes de água doce, duas famílias, Ariidae e Plostosidae, apresentam uma representação significativa de espécies marinhas (NELSON, 2006).

Os peixes dessa Ordem habitam o fundo dos rios, permanecendo entre as rochas e a vegetação (FERRARIS, 2007). Possuem formas e tamanhos extremamente variados, com hábitos predominantemente crepusculares e noturnos (FERRARIS, 2007). Além disso, vários representantes dessa Ordem realizam extensas migrações incluindo áreas distintas de criação, alimentação e reprodução a fim de realizar o seu ciclo de vida (BARTHEM e GOULDING, 1997).

São caracterizados principalmente por ter o corpo envolto por pele espessa, a qual pode estar total ou parcialmente coberta por placas ósseas (BRITSKI, *et al.*, 1988); nadadeiras raiadas e bem separadas, sendo que o primeiro raio das nadadeiras dorsal e peitoral apresentam um espinho forte e pungente; nadadeira adiposa encontra-se presente e é, em geral, bem desenvolvida, e a nadadeira caudal assume formato variável; presença, geralmente, de três pares de barbilhões sensitivos (MEES, 1974).

2.3 DNA Mitocondrial

A mitocôndria possui um genoma próprio, denominado DNA mitocondrial (DNAm_t) (Fig.1). O genoma mitocondrial é uma molécula circular dupla fita, covalentemente fechada e compacta, cujo tamanho varia de 15 ou 20 Kb. Cerca de 90% do genoma consiste em regiões codificantes, contendo 36 genes que codificam: dois genes para subunidade ribossômica (12S e 16S), vinte e dois para RNA transportadores (tRNA), três para subunidades citocromo oxidase I (COI), citocromo oxidase II (COII) e citocromo oxidase III (COIII), um para o citocromo b, dois para subunidades ATPase (6 e 8) e sete para as subunidades da NADH desidrogenase, além da região controle (não condificante), constituindo-se em uma importante fonte de informação genética extra-nuclear (BILLINGTON & HERBERT, 1991).

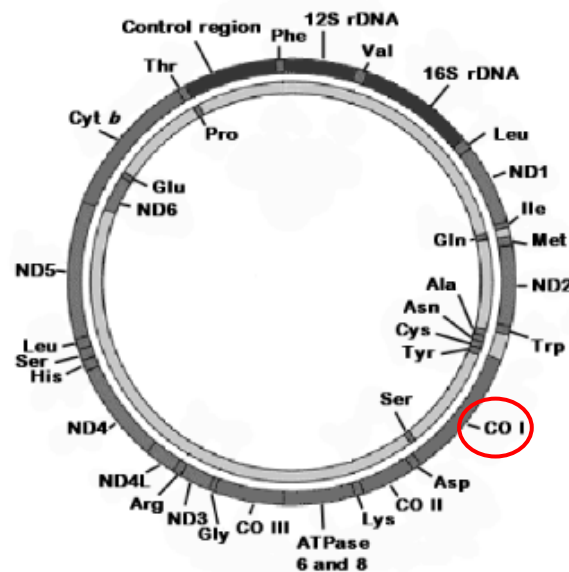


Figura 01. Genoma mitocondrial em vertebrados, destacando-se a região do gene citocromo oxidase subunidade I (COI), adaptado de Pereira, (2000).

Segundo Galtier *et al.* (2009), o DNA mitocondrial tem sido o marcador molecular de diversidade animal mais utilizado ao longo das últimas três décadas. Tem sido alvo preferencial para diagnóstico molecular, pois oferece muitas vantagens em relação ao DNA nuclear, como: **1)** possuir um elevado número de cópias por célula; **2)** apresentar diferenças de sequências entre espécies próximas de 5 a 10 vezes maiores do que em genes nucleares; **3)** possuir variação intraespecífica pequena na maioria das espécies animais; **4)** não apresentar íntrons, o que facilita a obtenção da amplificação de DNA mitocondrial; **5)** possuir herança predominantemente materna e baixo polimorfismo ancestral (HEBERT, *et al.*, 2003; STOECKLE, *et al.*, 2005).

Recentemente, iniciou-se o emprego de uma ferramenta que utiliza uma região do DNA mitocondrial, o gene COI como um marcador genético universal capaz de identificar espécies animais de maneira padronizada e rápida, servindo como um código de barras de DNA (HEBERT, *et al.*, 2003; HEBERT, *et al.*, 2003b)

O COI foi escolhido por possuir sequências nucleotídicas conservadas interspecificamente e variáveis quando se compara as mesmas espécies, possibilitando um estudo compartilhado dessas sequências. Por ser um gene conservado em termos de sequências nucleotídicas, o COI permite desenvolver iniciadores (*primers*) universais com bastante sucesso (PALUMBI, 1996). Outros segmentos gênicos, também, têm sido sugeridos como DNA *Barcode*, como dos genes mitocondriais 16S rRNA e Citocromo B (VENCES, *et al.*, 2005). Porém por questões de padronização e pelo seu aparente melhor desempenho, o CBOL (*Consortium for the Barcode of Life*) adotou como sequência padrão o fragmento do gene COI.

2.4 O Código de Barras do DNA

O método do DNA *Barcode* proposto por Herbert *et al.* (2003a), baseia-se no uso de uma pequena sequência padronizada de aproximadamente 648 pares de bases da extremidade 5' do gene mitocondrial COI. Essa sequência nucleotídica do COI seria suficiente para distinguir indivíduos de uma mesma espécie, devido a variação genética entre espécies ser maior do que a variação dentro das espécies. Sendo um sistema “bioidentificador”, semelhante aos códigos de barras universais (Fig. 2).

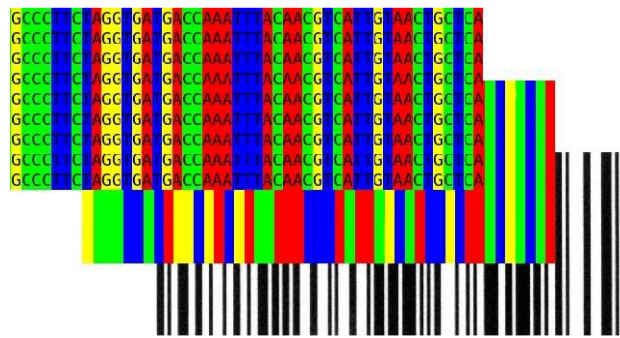


Figura 02. Analogia entre o DNA *Barcode* e o código de barras convencional.

Da mesma forma que são empregados os códigos de barras universal de produtos do mercado, que emprega 10 numeros alternados em 11 posições para gerar 100 bilhões de identificadores únicos. No DNA *Barcode*, há até quatro possibilidades de combinações de nucleotídeos (adenina, timina, guanina, citosina) em cada posição, mas com uma cadeia de sítios mais longa de que 11 posições. A combinação de apenas 15 dessas posições de nucleotídeos, por exemplo, criaria um bilhão de códigos únicos, um número muito maior do que o de espécies conhecidas, aproximadamente 15 milhões. Isso permite que cada táxon seja identificado por apresentar uma sequência única de DNA *Barcode* (HEBERT, *et al.*, 2003).

Entre as principais vantagens da utilização deste método destacam-se: 1) a identificação de espécies mesmo a partir de pequenos fragmentos, em qualquer estágio de vida (ovos, larvas, adultos); 2) a possibilidade de se distinguir espécies aparentemente semelhantes, como em espécies crípticas; e 3) redução de ambiguidades graças à identificação inequívoca das espécies (STOECKLE, *et al.*, 2005).

O método DNA *Barcode* pode contribuir, como vem sendo demonstrado em vários estudos, com a Taxonomia, Sistemática e Genética de Populações. Na Taxonomia o DNA *Barcode* pode ser utilizado para identificar espécimes atípicos e contribuir para revisão da nomenclatura de vários grupos, assim como pode ser utilizado como método de rotina para

auxiliar na identificação molecular de espécies. Na Sistemática o DNA *Barcode* pode servir como ponto de partida para a seleção de táxons e as sequências de DNA obtidas nos projetos de DNA *Barcode* podem ser adicionadas ao conjunto de sequências utilizadas para elaboração de filogenias. Na Genética de Populações, pode fornecer um primeiro sinal sobre a extensão e natureza das divergências populacionais, o que facilitará os estudos comparativos da diversidade de várias espécies (HAJIBABAEI *et al.*, 2007).

O DNA *Barcode*, ganhou muita relevância por meio do “*Consortium for the Barcode of Life (CBOL)*” no ano de 2004, cuja meta é a criação de um banco de dados de códigos de barra, sequências parciais de DNA do gene COI, da biodiversidade global, para facilitar o processo de automação da identificação de espécies, e já conta com mais de 120 organizações de 45 países (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007).

Foi estabelecido um banco gênico especializado em armazenar especificamente sequências do tipo de DNA *Barcode*, o *BOLD (Barcode of Life Data System – www.barcodeoflife.org)*. Nesse banco de dados podem ser depositadas informações de coleta (local, coletor, data), fotos de espécimens (*voucher*) e a instituição onde estão depositados, dados taxonômicos, informações moleculares (eletroferogramas das sequências) e protocolos e quais *primers* foram utilizados. Para preencher esse banco de dados, têm sido utilizadas preferencialmente amostras de espécies previamente identificadas, por taxonomistas (RATNASINGHAM e HEBERT 2007).

Hebert *et al.* (2003) demonstram que as divergências nas sequências de COI permitem a discriminação regular de espécies próximamente relacionadas em todos os filos (Annelida, Chordata, Echinodermata, Nematoda, Platyhelmintha, Artrópoda, Mollusca), com exceção de cnidários. Os primeiros estudos realizados com essa ferramenta foram extremamente satisfatórios com um grau de resolução taxonômica maior que 95% (HEBERT, *et al.*, 2003a, 2003b).

O DNA *Barcode* tem sido aplicado com sucesso em vários grupos de animais como lepidópteros, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (HEBERT, *et al.*, 2004b; HAJIBABAEI, *et al.*, 2006; WARD, *et al.*, 2005; ZHANG & HANNER, 2011; VENCES, *et al.*, 2005; MEGANATHAN, *et al.*, 2013; HEBERT, 2004 a; CLARE, *et al.*, 2007). Apresentando resultados satisfatórios na identificação de espécies crípticas (HEBERT, *et al.*, 2004; ALLCOCK, *et al.*, 2010; LARA, *et al.*, 2009;) ou de híbridos (CARVALHO, *et al.*, 2008) e também na autenticação de produtos alimentícios de origem animal, prevenindo fraudes na rotulagem de alimentos (BARBUTO, *et al.*, 2010; CARVALHO, *et al.*, 2011).

Apesar do sucesso do método em vários grupos, há controvérsias no uso do DNAm para a identificação de espécies, por adotar uma única sequência como critério taxonômico, sendo que um único fragmento gênico possui uma história única, sujeita a retenção de polimorfismos ancestrais (MORITZ e CICERO, 2004; MEYER e PAULAY, 2005). Este fato faz com que espécies que divergiram recentemente em alguns casos ainda compartilhem os mesmos haplótipos, o que torna difícil sua identificação (BLAXTER, 2004; MORITZ e CICERO, 2004; HEBERT, *et al.*, 2009; LUKHTANOV, *et al.*, 2009). Em híbridos, por exemplo, isso pode gerar dúvidas taxonômicas, devido ao fato de que o DNAm tem origem apenas materna (CARVALHO, *et al.*, 2008).

A variação da taxa evolutiva, dentro e entre grupos de espécies relacionadas pode ocasionar a sobreposição dos níveis de variação intra e interespecífica de alguns táxons, dificultando a identificação de um indivíduo do grupo (MORITZ e CICERO, 2004). Quanto maior for a sobreposição entre a variação genética dentro de uma espécie e a divergência que separa espécies irmãs, menor será a precisão do *Barcode* (MEYER e PAULAY, 2005).

Hebert *et al.* (2004b), propõem que o principal pressuposto para a efetividade do DNA Barcode é de que a diferença genética interespecífica é 10 vezes maior do que intraespecífica. Há um intervalo (“*gap*”) entre as variações intra e interespecíficas que garantem que os valores das distâncias intraespecíficas sejam menores que os valores da distância interespecífica. O intervalo esperado entre os padrões genéticos intraespecíficos e interespecíficos do DNAm é chamado de “*barcode gap*” (Fig. 3), dessa forma quanto maior for o intervalo entre esses padrões, maior será o sucesso da técnica (MEYER e PAULAY, 2005).

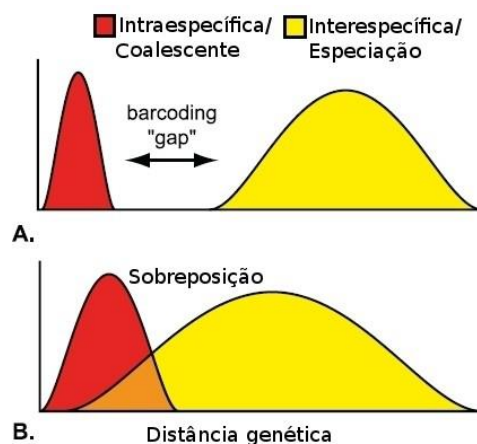


Figura 03. Esquema do *barcode gap*. A distribuição da variação intraespecífica é mostrada em vermelho e da interespecífica em amarelo. (A) Mundo ideal para *DNA Barcode*, com distribuições discretas e sem sobreposição. (B) uma versão alternativa do mundo com significativa sobreposição e sem *gap* (Modificado de Meyer e Paulay, 2005).

Meyer e Paulay (2005) confirmam que a sobreposição pode gerar falsos positivos e negativos, indo contra o principal pressuposto para a efetividade do DNA *Barcode*, de que as divergências intraespecíficas sempre sejam menores que as interespecíficas (HEBERT, *et al.*, 2004a; HEBERT, *et al.*, 2004b). Somente o surgimento do *gap* não é garantia de uma nova espécie, podendo ser erroneamente interpretado os tempos de divergência entre populações recentemente isoladas com linhagens reprodutivamente isoladas (HICKERSON, *et al.*, 2006).

Os maiores obstáculos encontrados na completa aplicação do DNA *Barcode* são: grupos estreitamente relacionados, como espécies-irmãs, híbridas, espécies que divergiram recentemente e crípticas apresentam baixa divergência interespecífica podendo ocorrer sobreposição das divergências (MORITZ e CICERO 2004; MEYER e PAULAY 2005; STOECKLE, *et al.*, 2005).

2.5 DNA *Barcode* em Peixes

Os primeiros resultados bem-sucedidos de DNA *Barcode* para peixes publicados por Ward *et al.* (2005) incentivaram a criação do *Fish Barcode of Life*, o *FISHBOL* (<http://www.fishbol.org/>), que é a iniciativa global em copilar uma biblioteca de sequências do gene COI para todas as espécies de peixes do mundo. Futuramente, esperam-se colaborações de modo a enriquecer os bancos de dados existentes, com sequências que permitam identificar uma gama maior de espécies (WARD, *et al.*, 2005). Os benefícios da criação da plataforma online incluem facilitar a identificação de espécies para todos os usuários, incluindo taxonomistas; destacando espécimes que representam uma grande expansão de espécies conhecidas; sinalizando espécies previamente não reconhecidas; e talvez o mais importante, permitindo identificação em que os métodos tradicionais não são aplicáveis (FISHBOL, 2015).

Desde então, o DNA *Barcode* está sendo utilizado com sucesso na identificação de peixes, com mais de 90% de acerto. Ward *et al.* (2005), ao analisar espécies de peixes australianos, sequenciou uma região de 655 pb do gene COI, utilizando-se múltiplas amostras e com isto, gerou-se 754 sequências. Os autores concluem que o sequenciamento da região do gene COI pode ser utilizado como uma sequência de *Barcode*, possibilitando assim a identificação de espécies no nível molecular. Para peixes de água doce, as distâncias genéticas entre espécies irmãs foram superiores à distância genética intraespecífica máxima, mostrando que o código de barras poderia discriminar 97% das espécies analisadas do rio Paraná (DÍAZ, *et al.*, 2016). No

estudo feito por Frantine-Silva, *et al.* (2015) para identificação de ovos e larvas de peixes o sucesso de identificação foi de 99%.

Em peixes de interesse comercial foi observada uma grande divergência entre espécies, com 100% de identificação para 21 espécies analisadas (ARDURA *et al.*, 2010). Além disso, a aplicação de código de barras de DNA revelou espécies crípticas de peixes ornamentais na Amazônia brasileira (BENZAQUEM *et al.*, 2015)

A validação e a eficácia do método do DNA *Barcode* para bagres foi demonstrado no estudo de Ortiz (2010) em quatro espécies do gênero *Pseudoplatystoma* oriundas de localidades da bacia amazônica, observando alta resolução na identificação. Carvalho *et al.* (2008) utilizaram a técnica de DNA *Barcode* para a identificação de Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.). Os autores salientam que a utilização de marcadores de DNAm para híbridos apresenta limitações, mas pode ser utilizada para indicação de pureza; sendo observado que surubins ditos puros na verdade eram híbridos e o uso do DNAm serviu para indicar a origem materna dos peixes híbridos.

No setor comercial, o COI está sendo usado para a segurança alimentar, com sucesso na identificação de peixe processado, na detecção de substituição e casos de fraude comercial (CARVALHO, *et al.*, 2011; GALIMBERTI, *et al.*, 2013; BRITO, *et al.*, 2015).

De forma geral, esses trabalhos apresentaram altas taxas de sucesso para identificação de peixes, sejam marinhos (WARD, *et al.*, 2009; ZHANG & HANNER, 2011) ou de água doce (ORTIZ, 2010, ARDURA, *et al.*, 2010) utilizando a região 5' do gene COI. Até o momento o DNA *Barcode* é a técnica universal de identificação genética de espécies e tem sido aplicada em todo o mundo, com pelo menos 11358 espécies analisadas (FISHBOL, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Gerar código de barras de DNA, para o maior número de espécies possíveis de bagres de valor comercial (Ordem Siluriformes), da amazônia brasileira, e utilizá-los na identificação molecular destas espécies.

3.2. Específicos

- Obter a sequência nucleotídica do gene mitocondrial COI dos exemplares coletados pertencentes a espécies da Ordem Siluriformes;
- Estimar a distância genética entre as espécies;
- Gerar uma árvore de agrupamento dos vizinhos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREAKIS, N.; HØJ, L.; KEARNS, P.; HALL, M. R.; ERICSON, G.; COBB, R. E.; GORDON, B. R.; Evans-Illidge, E. Diversity of Marine- Derived Fungal Cultures Exposed by DNA Barcodes: The Algorithm Matters. **PLoS ONE** 10(8). 2015.
- ASGHARIAN, H.; SAHAFI, H. H.; ARDALAN, A. A.; SHEKARRIZ, S.; ELAHI, E. Cytochrome oxidase subunit 1 barcode data of fish of the Nayband National Park in the Persian Gulf and analysis using meta-data flag several cryptic species. **Mol Ecol Resour** 11:461–72. 2011.
- ARDURA, A., LINDE, A. R., MOREIRA, J. C.; GARCIA-VAZQUEZ, E. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. **Biological Conservation**, 143(6), 1438-1443. 2010.
- BRITO, M. A.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; SANTOS, S. DNA barcoding reveals high substitution rate and mislabeling in croaker fillets (Sciaenidae) marketed in Brazil: The case of pescada branca (*Cynoscion leiarchus* e *Plagioscion squamosissimus*). **Food Research International** 70, 40-46, 2015.
- BARBUTO, M.; GALIMBERTI, A.; FERRI, E.; LABRA, M.; MALANDRA, R.; GALLI, P.; CASIRAGHI, M. DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (Mustelus spp.). **Food Res Int** 43:376–81. 2010.
- BENZAQUEM, D. C.; OLIVEIRA, C.; BATISTA, J. DA S.; ZUANON, J.; REBELO, P. J. I. DNA Barcoding in Pencilfishes (Lebiasinidae: Nannostomus) Reveals Cryptic Diversity across the Brazilian Amazon. **Plos ONE**. 2015
- BARTHEM, R.; GOULDING, M. **Um ecossistema inesperado: A Amazônia revelada pela pesca**. Sociedade Civil do Mamirauá. Brasília. p. 2410. 2007.
- BUCKUP P.A., MENEZES, N. A. & GHAZZI, M. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Museu Nacional, Rio de Janeiro, BR. 195p. 2007.
- BLAXTER, M.L. “The promise of a DNA taxonomy. ” **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B** (359): 669–679. 2004.
- BARTHEM, R.; GOULDING, M. **Os bagres balizadores. Ecologia, migração e conservação de peixes amazônicos**. Sociedade Civil Mamirauá: MTC-CNPQ-IPAAM, 130 pg. 1997.
- BILLINGTON, N., & HEBERT, P. D. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 48(S1), 80-94. 1991.
- BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual identification of fish Three Marias region (With Key to the fish in the São Francisco Basin)**. 3^a ed. Brasília: CODEVASF, 115p. 1988.

CAWTHORN, D. M.; STEINMAN, H. A.; WITTHUHN, R. C. DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market. **Food Res Int** 46:30–40. 2012,

CARVALHO, D. C.; PIMENTA NETO, D. A.; BRASIL, B. S. A. F.; OLIVEIRA, D. A. A. DNA barcoding unveils a high rate mislabeling. **Mitochondrial DNA**, 22(S1): 97-105, 2011.

CARVALHO, D. C. de; SEERIG, A.; MELO, D. C. de; SOUSA, A. B. de; PIMENTA, D.; OLIVEIRA, D. A. A. Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.). **Revista Brasileira De Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.215-219, 2008.

COSTA, F.; CARVALHO, G. The Barcode of Life Initiative: Synopsis and prospective societal impacts of DNA barcoding of fish. **Gen Soc Pol** 3: 29–40. 2007.

CLARE, E. L.; LIM, B. K.; ENGSTROM, M. D.; EGER, J. L.; HEBERT, P. D. DNA barcoding of neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. **Molecular Ecology Notes**, 7(2), 184-190. 2007.

DÍAZ, J.; VILLANOVA, G. V.; BRANCOLINI, F.; DEL PAZO, F.; POSNER, V.M.; GRIMBERG, A. First DNA Barcode Reference Library for the Identification of South American Freshwater Fish from the Lower Paraná River. **PLoS ONE**, 11(7) p 1-20. 2016.

FISH BARCODE OF LIFE, disponível em (<http://www.fishbol.org/>), acesso em 02 de junho de 2015.

FiSHBASE, 2015. Banco de Dados. Disponível em (<http://www.fishbase.org/>), acesso em 23 de fevereiro de 2016.

FRANTINE-SILVA, W.; SOFIA, S. H.; ORSI, M. L.; ALMEIDA, F. S. DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. **Mol Ecol Resour**, 15:1226–1237. 2015

FERRARIS C. J. **Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types**. *Zootaxa* 1418:1–628. 2007.

FABRÉ, N. N., & ALONSO, J. C. Recursos ícticos no Alto Amazonas: sua importância para as populações ribeirinhas. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, série Zoologia, 14(1), 19-55. 1988.

GALIMBERTI, A.; MATTIA, F. D.; LOSA, A.; BRUNI, I.; FEDERICI, S.; CASIRAGHI, M.; MARTELLOS, S.; LABRA, M. DNA barcoding as a new tool for food traceability. **Food Research International**, 50(1), 55-63. 2013.

GANDRA, A. L. **O mercado de pescado da região metropolitana de Manaus**. Montevideu: Infopesca. 2010.

GALTIER, N.; NABHOLZ, B.; GLÉMIN, S. & HURST, G.D.D. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 4541-4550, 2009.

HAJIBABAEI, M., SINGER, G. A., HEBERT, P. D., & HICKEY, D. A. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **TRENDS in Genetics**, 23(4), 167-172. 2007.

HICKERSON, M. J., MEYER, C. P.; MORITZ, C. DNA barcoding Will Often Fail to Discover New Animal Species over Broad Parameter Space. **Syst. Bio**, 55 (5), 729-739. 2006.

HAJIBABAEI, M., JANZEN, D. H., BURNS, J. M., HALLWACHS, W., & HEBERT, P. D. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 103(4), 968-971. 2006.

HEBERT, P. D., STOECKLE, M. Y., ZEMLAK, T. S., & FRANCIS, C. M. Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS Biol**, 2(10), 312. 2004b.

HEBERT, P. D.; 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 of the United States of America**, 101(41), 14812-14817. 2004a.

HEBERT, P. D. N, CYWINSKA, A.; BALL, S. L; De WAARD J. R. "Biological identifications through DNA Barcode. " **Proc R Soc Lond B** (270):313-322. 2003a.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; De WAARD, J. R. "Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species." **Proc Biol Sci** (270): 96-99. 2003b.

JUNK, W. J. et al. **A Classification of Major Naturally-Occurring Amazonian Lowland Wetlands**. *Wetlands*. v. 31, p. 623-640, jul. 2011.

LUKHTANOV, V. A., SOURAKOV, A., ZAKHAROV, E. V., & HEBER, P. D. DNA barcoding Central Asian butterflies: increasing geographical dimension does not significantly reduce the success of species identification. **Molecular Ecology Resources**, 9, 1302-1310. 2009.

LARA, A. de; LEON, J. L. P.; RODRIGUEZ, R.; CASANE, D.; COTE, G.; BERNATCHEZ, L.; GARCIA-MACHADO, E. DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: Evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. **Mol Ecol Res** 10:421-30. 2009.

LEVEQUE, C.; OBERDORFF, T.; PAUGY, D.; STIASSNY, M.L.J; TEDESCO, P.A. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. **Hydrobiologia**, 595: 545-567. 2008.

LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, (Coleção Base). p.536. 1999.

MEGANATHAN, P. R.; DUBEY, B.; JOGAYYA, K. N.; HAQUE, I. Identification of Indian crocodile species through DNA barcodes. **Journal of forensic sciences**, 58(4), 993-998. 2013.

MEYER, C. P. e PAULAY, G. "DNA barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. " **PLoS Biology** 3, n. 12 (December): p422. 2005.

MORITZ, C.; CICERO, C. DNA Barcoding Promise and Pitfalls. **PLOS Biology**, v.2, n.10, p.1529-1531, 2004.

MEES, G. F. The Auchenipteridae and Pimelodidae of Suriname (Pisces, Nematognathi). **Zool Verhandl.** 132:1-256. 1974.

NELSON, J.S. **Fishes of the World**. Department of Biological Science. University of Alberta. Canada. V.4. p. 601. 2006.

ORTIZ, M. F. **Validação do dna barcoding como identificador de espécies: um estudo de ampla amostragem com o gênero Pseudoplatystoma (SILURIFORMES; PIMELODIDAE) na Amazônia**. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus. Amazonas. Brasil, p. 73. 2010.

PEREIRA, L. H. G.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse neotropical freshwaterfish fauna? **BMC Genetics**.14: 20–34. 2013.

PEREIRA, S. L. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. **Genetics and Molecular Ecology**, vol.23, p. 745-751, 2000.

PALUMBI, S. R. What can molecular genetics contribute to marine biogeography? Na urchin's tale. **J Exp Mar Biol Ecol.** 203: 75-92. 1996.

REIS, R.E., KULLANDER, S.O., FERRARIS, C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA)**, Porto Alegre: Edipucrs. 2003.

SMITH, P. J.; STEINKE, D.; MCMILLAN, P. J.; STEWART, A. L.; MCVEAGH, S. M.; DIAZ, de A.; WELSFORD, D.; WARD, R. D. DNA barcoding highlights a cryptic species of grenadier Macrourus in the Southern Ocean. **J Fish Biol** 78:355–65. 2011.

STOECKLE, M., WAGGONER, P.E., AUSUBEL, J.H. **Barcoding life**, illustrated. Goals, rationale, disponível em (www.barcoding.si.edu). 2005.

VENCES, M.; THOMAS, M.; BONETT, R. M.; VIEITES, D. R. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 185 9-1868.2005.

VENCES, M.; THOMAS, M.; VAN DER MEIJDEN, A.; CHIARI, Y.; VIEITES, D. R. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. **Frontiers in zoology**, 2(1), 1. 2005.

VARI, R. P.; MALABARBA, L. R. **Neotropical ichthyology: an overview**. In: Malabarba, L. R.; Reis, R. E; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C. A. S. (Editors). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre: Edipucrs. 1-11p.1998.

WARD, R. D.; HOLMES, B. H.; YEARSLEY, G. K. DNA barcoding reveals a likely second species of Asian sea bass (Barramundi) (*Lates calcarifer*). **J Fish Biol** 72:458–63. 2008.

WARD R.D.; ZEMLAK T.S.; INNES B.H.; LAST P.R.; HEBERT P.D.N. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360:1847–1857. 2005.

ZHANG, J. B., & HANNER, R. DNA barcoding is a useful tool for the identification of marine fishes from Japan. **Biochemical Systematics and Ecology**, 39(1), 31-42. 2011.

CAPITULO I

Código de barras de DNA (DNA *Barcode*) de espécies de bagres (Ordem Siluriformes) de valor comercial da amazônia brasileira

Código de barras de DNA (DNA *Barcode*) de espécies de bagres (Ordem Siluriformes) de valor comercial da amazônia brasileira

BATISTA, T., E¹.; SAULO-MACHADO, A².; FORMIGA, K. M².; BATISTA, S., J².

1-Universidade do Estado do Amazonas-UEA

2-Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA

Resumo

A Ordem Siluriformes é o segundo grupo de peixes mais abundante na região Neotropical com grande quantidade de espécies comercializadas na Amazônia. A ferramenta molecular DNA *Barcode* é utilizada para a caracterização de espécies, por meio do uso de um marcador mitocondrial, o Citocromo Oxidase I. O presente trabalho objetivou-se identificar o maior número de espécies da Ordem Siluriformes de importância comercial na Amazônia. Foram obtidas e analisadas 363 sequências do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI), pertencentes a 33 espécies de 21 localidades da Amazônia brasileira. As 33 espécies pertencentes a 22 gêneros e 7 famílias da Ordem Siluriformes, apresentaram um total de 129 haplótipos. Todas as sequências foram submetidas aos bancos de dados público (GenBank e Bold), ocorrendo até 96% de consenso entre a identificação tradicional e a molecular. A distância genética K2P média intraespecífica encontrada foi de 0,3, e a interespecífica foi de 0,13 %. A maioria das espécies apresentaram baixos valores de divergência genética interespecífica (<2%), porém todas puderam ser corretamente identificadas no nível molecular. Os resultados da presente pesquisa demonstraram que como ferramenta taxonômica, o DNA *Barcode* pode ser usado para a identificação molecular de espécies. O estudo contribuiu com novos códigos de barras para 8 espécies de peixes da Ordem Siluriformes da amazônia brasileira.

Palavras-chave: Siluriformes; DNA Barcode; DNA Mitocondrial; Citocromo Oxidase subunidade I.

1. INTRODUÇÃO

A ordem Siluriformes é a segunda maior na região neotropical, considerando o número de espécies descritas, é composta por 36 famílias, 477 gêneros e 3.088 espécies distribuídas pelo mundo (NELSON, 2006; FERRARIS, 2007). Os Siluriformes, popularmente conhecido como bagres, são peixes encontrados em todos os continentes e em muitos países são valorizados como itens alimentares, na pesca esportiva e na ornamentação de aquário (NELSON, 2006). Os peixes dessa Ordem habitam o fundo dos rios, permanecendo entre as rochas e a vegetação, com hábitos predominantemente crepusculares e noturnos (FERRARIS, 2007). Além disso, vários representantes dessa Ordem realizam extensas migrações incluindo áreas distintas de criação, alimentação e reprodução a fim de realizar o seu ciclo de vida (BARTHEM & GOULDING, 1997). No entanto, devido à pressão da pesca não regulamentada para venda comercial

juntamente com outras ameaças humanas e ambientais, algumas espécies de bagres nativas estão ameaçadas (CORDOBA, *et al.*, 2013). Diante de um cenário como este, com eminente perigo de perda da biodiversidade, um método rápido e padronizado que auxilie na caracterização da diversidade biológica é essencial (HEBERT, *et al.*, 2003a).

Para acelerar a descoberta de espécies, foi proposto o DNA *Barcode* ou "código de barra de DNA", que consiste em um sistema único e universal com o objetivo de identificar todos os organismos em nível específico, utilizando-se sequências de regiões específicas do DNA mitocondrial (HEBERT, *et al.*, 2003b). Esse método tem sido aplicado a vários organismos, e muitos trabalhos demonstraram a eficácia para a identificação de espécies, como em borboletas, aves, mamíferos, reptéis e peixes (HEBERT, *et al.*, 2004b; HEBERT, *et al.*, 2004^a; CLARE, *et al.*, 2011; MEGANATHAN, *et al.*, 2013; WARD, *et al.*, 2005).

A aplicação do gene do citocromo oxidase I (COI) para identificação de espécies em peixes desencadeou a iniciativa internacional para códigos de barras de todos os peixes (FISH-BOL; www.fishbol.org) (WARD, *et al.*, 2009). Está sendo utilizado na identificação e filogenia, em revisões taxonômicas e para detectar espécies crípticas (LIMA, *et al.*, 2016; WONG, *et al.*, 2011; WARD, *et al.*, 2009; PERREIRA, *et al.*, 2013; BENZAQUEM, *et al.*, 2015). Além disso, o DNA *Barcode* também tem aplicação na monitoração de produtos de derivados de peixe para a segurança alimentar e na regulamentação da exploração de espécies de peixes (CHANG, *et al.*, 2016; BRITO, *et al.*, 2015; ARDURA, *et al.*, 2010).

A identificação molecular de peixes em nível de espécies esta acima de 92% (WARD, *et al.*, 2005; CARVALHO, *et al.*, 2011; PERREIRA, *et al.*, 2013), e o poder discriminatório de identificação foi de 93% em peixes de água doce e 98% em espécies de peixes marinhos (WARD, *et al.*, 2009). Pois, no estudo de Hubert, *et al.* (2008) de peixes de água doce não revelou divergências intraspecíficas ou interespecíficas mais profundas do que em peixes marinhos, concluindo que código de barras é uma ferramenta poderosa para a discriminação de peixes de água doce.

Dada a importância biológica e econômica dessa Ordem, o presente estudo visa gerar código de barras para espécies de bagres de valor comercial pertencentes à Ordem Siluriformes da amazônia brasileira, e utilizá-los na identificação molecular dessas espécies.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Foram selecionados a priori entre uma a 10 amostras de 33 espécies de peixes Siluriformes de valor comercial (Tabela 1), coletados em desembarques pesqueiros de 21 pontos da amazônia brasileira nos anos de 2003 a 2015 (Fig. 4) (Licença IBAMA 25890). Os indivíduos foram indentificados no momento da coleta através da análise morfológica por taxonomistas e alguns espécimes *vouchers* estão depositados na Coleção de Peixes do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Os tecidos musculares estão armazenados em álcool 95% e depositados na Coleção de Recursos Genéticos do INPA.

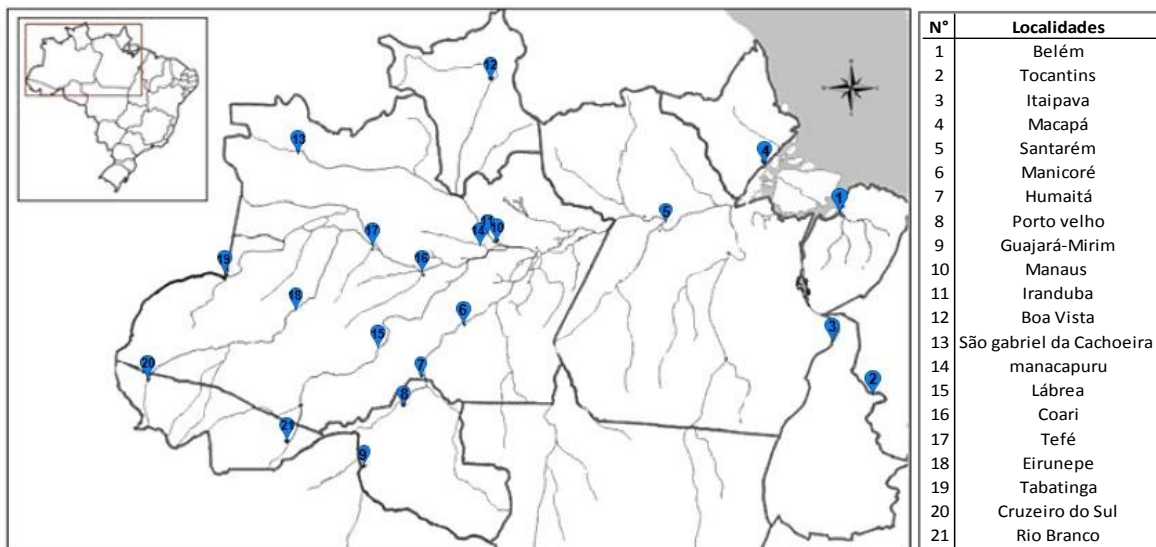


Figura 01- Localização dos 21 pontos de coleta de exemplares de espécies de peixes Siluriformes de valor comercial para obtenção do código de barras de DNA.

Tabela 01. Localidades das espécies de bagres de valor comercial e número de indivíduos amostrados para obtenção do código de barras de DNA. Locais de coleta: Coari (Co), Manaus (Ma), Santarém (Sa), Iranduba (Ir), Tabatinga (Ta), Manicoré (Man), Tefé (Te), Belém (Bl), Boa Vista (BV), Eirunepé (Eir), Cruzeiro do Sul (CS), Humaitá (Hu), Manicoré (Mn), Borba (Bo) Porto Velho (PV), Guajará Mirim (GM), São Gabriel da Cachoeira (SGC), Lábrea (La), Altamira (Alt), Tocantins (To) e Itaipava (Ita).

Nº	Espécie Nome comum		Localidades																			Nº Total				
			Rio	Solimões/Amazonas								Guamá	Branco	Juruá		Madeira			Mamoré	Negro	Purus		Araguaia			
			Familia	Co	Ma	Sa	Ir	Mana	Ta	Mac	Te	Bl	BV	Eir	CS	Mn	Hu	PV	GM	SGC	La		RB	Ita	To	
1	<i>Ageineiosus inermis</i>	mandubé	Auchenipteridae	1	1											1								3		
2	<i>Arius parkeri</i>	ariaçu	Ariidae						1		1													2		
3	<i>Brachyplatystoma capapretum</i>	filhote capapreta	Pimelodidae	5	1																			6		
4	<i>Brachyplatystoma juruense</i>	flamengo	Pimelodidae										1											1		
5	<i>Brachyplatystoma Platynemum</i>	babão	Pimelodidae	1					2							2								5		
6	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	dourada	Pimelodidae	1	2	1																		4		
7	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	piramutaba	Pimelodidae	1																		2		3		
8	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	piraíba, filhote	Pimelodidae	1										2		1					1			12		
9	<i>Brachyplatystoma tigrinum</i>	dourada zebra	Pimelodidae		2				2															4		
10	<i>Calophrys macropterus</i>	piracatinga	Pimelodidae	1	1											2					1			7		
11	<i>Hypophthalmus edentatus</i>	mapará	Pimelodidae	1		8	4	1						1		1		1						18		
12	<i>Hypophthalmus fimbriatus</i>	mapará	Pimelodidae				3											1						4		
13	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	mapará	Pimelodidae	7		15	4	1						2	4			2						36		
14	<i>Hemisorubim platyrhynchos</i>	liro	Pimelodidae											1	1						5			7		
15	<i>Hemisorubim sp.</i>	liro	Pimelodidae																				1	1		
16	<i>Hoplosternum littorale</i>	tamoatá	Callichthyidae			1		2						1										4		
17	<i>Leiarius marmoratus</i>	jandiá, jundiá	Pimelodidae	1	1									2							2			8		
18	<i>Lithodoras sp.</i>	bacu	Doradidae					1													1			2		
19	<i>Oxydoras niger</i>	cuiú cuiú	Doradidae			1		1						2		1		1			2			9		
20	<i>Phractocephalus hemioliopus</i>	Pirarara	Pimelodidae	5																	2			7		
21	<i>Pimelodus blochii</i>	Mandi	Pimelodidae	2		1										1					2			6		
22	<i>Pimelodina flavipinnis</i>	mandi-moela	Pimelodidae											1										1		
23	<i>Pimelodella sp.</i>	chorão	Heptapteridae													1								1		
24	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	surubim	Pimelodidae	1	12	8	1		6	8	21	5	6	5	5	5	6	4	36	7	5	3		139		
25	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	caparari	Pimelodidae	2	7	3		5	1	1	1	3	1		2	1			4	8				38		
26	<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	cachara ?	Pimelodidae															3						3		
27	<i>Platynemichthys notatus</i>	Coroatá	Pimelodidae					1		1						1								3		
28	<i>Pterygoplichthys pardalis</i>	acari-bodó	Loricariidae							1														2		
29	<i>Pirinanpus pirinampu</i>	piranambu, barba	Pimelodidae		3						1	1	3				1							9		
30	<i>Sorubimichthys planiceps</i>	peixe lenha, chicote	Pimelodidae					3				1												4		
31	<i>Sorubim lima</i>	bico de pato	Pimelodidae										1	1		1								4		
32	<i>Trachelyopterus sp</i>	cangati ?	Auchenipteridae											1			1							2		
33	<i>Zungaro zungaro</i>	Pacamón, jaú	Pimelodidae					1	1	1	1												4	8		
	Total			7	4	51	18	28	10	24	2	19	28	21	16	8	5	3	20	14	7	56	15	5	8	363

2.2 Extração, amplificação e sequenciamento do DNA

O DNA Genômico foi extraído pelo método fenol-clorofórmio (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). A amplificação do gene mitocondrial COI foi realizada pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), com volume final de 15 µl, utilizando 2 µl de 10 a 50 ng de DNA e os seguintes reagentes: 1,5 µL de Tampão 10X; 1,2 µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) a 25mM; 3,0 µL de DNTPs a 1mM; 1,5 µL de cada primer a 2uM 0,3/µL de Taq DNA Polimerase a 5U/µL e água milli-Q. Foram utilizados os *primes BOL COI F3*: 5' TCA ACY AAT CAY AAAGAT ATY GGC CAC 3' e *COI R3*: 5' ACT TCY GGG TGR CCR AAR AAT CA 3' na PCR da maioria das amostras e uma combinação de *primes FishF1, FishR1, FishF2, FishR2* (Mafish) para as demais amostras não amplificadas anteriormente, ambos modificados (WARD, *et al*, 2005). A amplificação foi realizada em 35 ciclos com as seguintes temperaturas: desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Depois de amplificado, o produto da PCR foi verificado e quantificado em eletroforese padrão (100V por 1h) visualizado com gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium) por comparação com o marcador *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen), e fotografado no fotodocumentador.

Todos os produtos amplificados foram purificados usando polietilenoglicol 8000 (PEG) e etanol (PAITHANKAR e PRASAD, 1991). As reações de sequenciamento nucleotídico foram realizadas de acordo com Platt *et al.*, (2007) usando o Kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (ThermoFisher). A eletroinjeção de sequenciamento foi realizada no analisador de DNA 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.3 Análise das Sequências Nucleotídicas

As sequências foram editadas e alinhadas nos programas SEQSCAPE versão 2.7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e BIOEDIT 5.0.9 (HALL, 1999) e o alinhamento com o programa ClustalW (THOMPSON, *et al.*, 1994). Uma sequencia consenso para cada espécime foi obtida e em seguida submetida ao programa BLAST (ALTSCHUL, *et al.*, 1997), para confirmação e comparação da região sequenciada com os dados disponíveis através do *National Center for Biotechnology Information* (Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), assim como comparadas com os dados disponíveis no Portal *Barcoding of Life Database* (BOLD) (RATNASINGHAM e HEBERT, 2007). Todas as sequências de DNA foram analisadas utilizando o programa Mega v. 6 (TAMURA, *et al.*, 2013) para verificar presença ou ausência

de stop códon. A identificação dos haplotipos foi realizada usando DnaSP v5.0 (LIBRADO e ROZAS, 2009).

O Número de linhagens biológicas foram verificados com o auxílio da abordagem *Automatic Barcode Gap Discovery Method* (ABGD). O ABGD detecta automaticamente as diferenças significativas entre a divergência intra e interespecífica (*Barcoding Gap*) e define o limite da distância genética entre as divergências intra e interespecíficas baseados no padrão par-a-par da distância genética (PUILLANDRE, *et al.*, 2012). As análises no ABDG foram realizadas na interface web (<http://www.abi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>) utilizando o modelo de Kimura-2-Parâmetros (K2P) de substituição de bases (KIMURA, 1980). O limiar para a diversidade intraespecífica (p-distância) foi definido em um mínimo de 0.001 e máximo de 0.1, sendo que o o valor padrão do *Barcoding Gap* foi $X = 1.0$.

Após a delimitação dos grupos de espécies ou linhagens biológicas por meio do ABGD, foram calculadas as distâncias par-a-par e as distâncias intra e interespecífica, com base no modelo evolutivo de Kimura-2-Parâmetros e Bootstrap com 2.000 replicações para cada uma das espécies com o uso do programa Mega v. 6 (TAMURA, *et al.*, 2013).

Posteriormente, foi feita uma consulta ao banco de dados de sequências públicas (BOLD e GENBANK) para inferir a porcentagem de similaridade entre espécies e confirmar a identificação morfológica realizada.

3. RESULTADOS

Foi gerada uma matriz de dados contendo 363 sequências nucleotídicas com tamanho de 620 pares de bases, representando as 33 Espécies, 22 Gêneros e 7 Famílias de Siluriformes existentes na amazônia. Foram realizadas análises para detectar possíveis códons de parada, mas nenhum foi observado. As 33 espécies da ordem Siluriformes apresentaram 254 sítios constantes, 223 sítios informativos e 268 sítios variáveis.

A composição média das bases nitrogenadas adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G) foi de 26,7%, 27,9%, 27,3% e 18% respectivamente. Um total de 129 haplótipos (1 a 95 para cada espécie) estavam presentes nas 33 espécies.

A identificação das espécies de peixes Siluriformes estudados com base nos bancos de dados *BOLD* e *GenBank* é descrita na Tabela 02 (Anexo1). O estudo ajudou na identificação direta de 33 espécies que apresentaram similaridades específicas de espécies em ambos os bancos de dados. A porcentagem de identificação das espécies variou de 93.57% a 100% de similaridade.

Das 33 espécies identificadas, 8 espécies (*Brachyplatysoma juruense*; *Brachyplatystoma tigrinum*; *Hypophthalmus fimbriatus*; *Hypophthalmus edentatus*; *Hemisorubim sp*; *Pimelodina flavipinis*; *Pimellodela sp*; *Platynemateichthys notatus*) não possuíam registro e nem sequências depositadas no *BOLD* (Anexo 01) até o momento. Sendo então, consideradas os primeiros registros para o banco de Dados públicos em questão. As espécies *Lithodoras sp.* e *Arius parkeri* foram representados usando Nomenclatura de sinônimos no banco de dados, que foram compatíveis com *Pterododras granulatus* 99.21% e *Sciades parkeri* 100%. A espécie *Brachyplatystoma capapretum*, apresentou compatibilidade com outra espécie do mesmo gênero, *Brachyplatystoma filamentosum* (97,21%) (Anexo 01).

Foi possível distinguir algumas espécies com essa ferramenta. Um exemplo foi *Trachelyopterus sp* – semelhança de 99,66% com *Trachelyopterus galeatus*. A espécie *Hemisorubim.sp* apresentou uma baixa porcentagem de semelhança com *Hemisorubim platyrhynchus*, 96%. A distância entre as duas espécies foi de 0,4 (Anexo 02), caracterizando ser outra espécie do mesmo gênero. O mesmo aconteceu com *Sorubim lima*, *Zungaro zungaro*, *Leiarius marmoratus*, *Pimelodus blochii*, indivíduos identificados como sendo da mesma espécie ficaram em clados separados, sustentados com bootstrap 99%, o que sugere ser outra linhagem biológica. As espécies que se separaram em clados diferentes foram parcialmente renomeadas de *Sorubim sp.*, *Zungaro sp.*, *Leiarius sp.*, *Pimelodus sp.* (Figura 03).

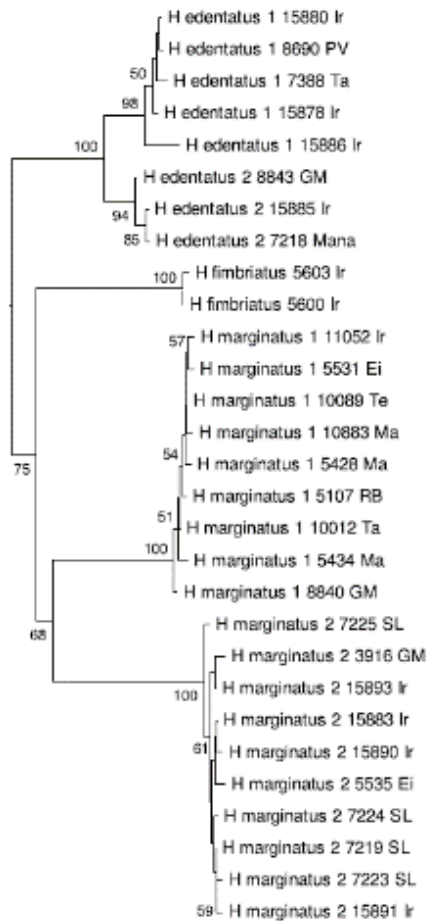
Na árvore *Neighbor-joining* incluindo 33 espécies com todos os haplótipos, mostra que os espécimes da mesma espécie foram agrupados em um único clado. Um total de 7 espécies (*B. rousseauxii*; *B. vaillantii*, *B. juruense*, *P. reticulatum*, *Pimelodina flavipinis*; *Pimellodela sp*, *Lithodoras sp. e.*) não apresentaram variação intraespecífica e foram agrupadas sob um único haplótipo de sua própria espécie (Figura 03). Os números de exemplares (1- 4 indivíduos) nessas espécies não permitiram a observação de uma maior quantidade de haplótipos. Nenhum desvio taxonômico foi detectado em níveis mais altos (Gêneros e Família).

Para o gênero *Hypophthalmus*, houve a formação de clados (morfotipos) bem distintos em cada uma das duas espécies *Hypophthalmus edentatus* e *Hypophthalmus marginatus*, todos eles apoiados por altos valores de *bootstrap* (64-100%). Os morfotipos *H. edentatus* 2 e *H. marginatus* 1 foram os clados que mais se aproximaram do clado formado pela espécie *H. fimbriatus*, enquanto os outros morfotipos ficaram em um ramo mais distante (Figura 02).

As espécies do gênero *Hypophthalmus* foram comparadas com espécies do *BOLD*, e a espécie *H.edentaus* apresentou semelhança com *H. oremaculatus* (Anexo1), apresentando uma porcentagem que variou de 97,67% a 100%. Sendo que as espécies *H. marginatus* e

H.oremaculatus são as únicas espécies que possuem sequências depositadas para esse gênero no banco de Dados.

Figura 02- Árvore NJ de haplótipos com todas as espécies (morfotipos) do gênero *Hypophthalmus*.



O modelo de evolução molecular K2P foi usado para inferir distâncias genéticas em termos de número de substituição de base por sítio. Todos os morfotipos apresentaram baixa divergência intraespecífica de 0 (zero). A divergência interespecífica variou de 0,2 em *H. edentatus* morfotipo-2 e 0,9 em *H. edentatus* morfotipo-1 e *H. marginatus* morfotipo-2. (Tabela 02).

N	Morfotipo	H.fimbriatus	H.marginatus_1	H.edentatus_1	H.edentatus_2	H.marginatus_2
1	H.fimbriatus	0				
2	H.marginatus_1	0,790	0			
3	H.edentatus_1	0,820	0,980	0		
4	H.edentatus_2	0,820	0,920	0,240	0	
5	H.marginatus_2	0,950	0,840	0,940	0,930	0

Tabela 02 – Distância genética intra e interespecífica entres os morfotipos do Gênero *Hypophthalmus*.

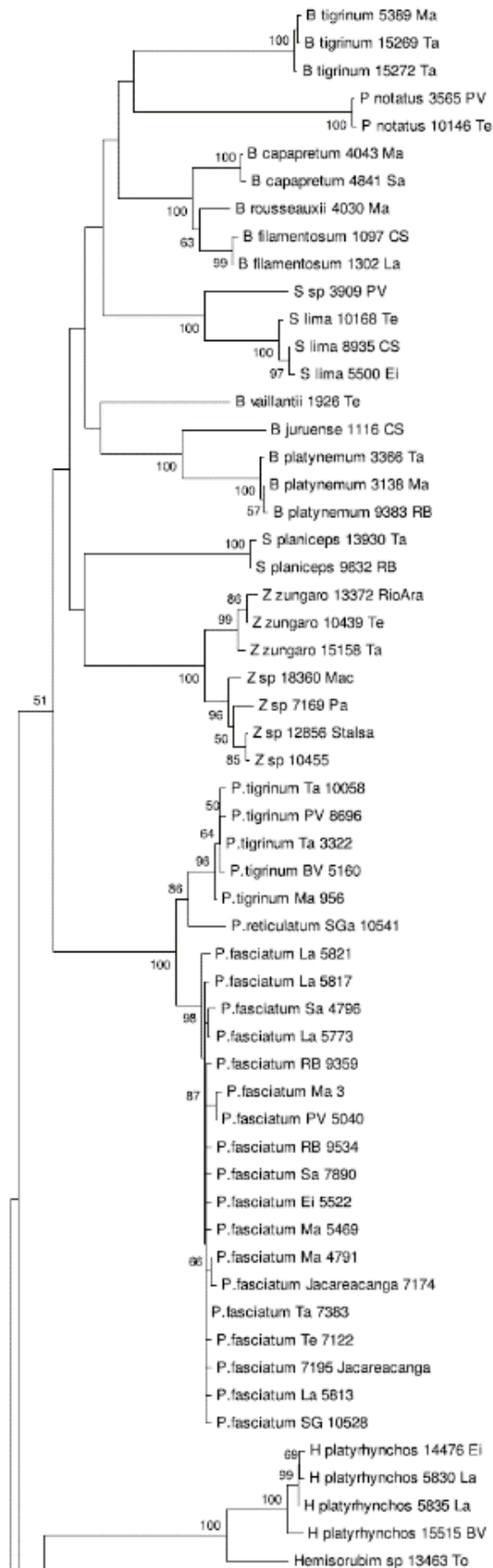
A divergência interespecífica das 33 espécies variou de 0,2 a 2,6. A intraespecífica variou de 0 a 0,2 (2%) sendo o maior valor encontrado na espécie *Trachelyopterus sp* (dois indivíduos). A média das distâncias intergenérica e intragenérica foram 0,13 (13%) e 0,003 (0,3%) respectivamente. Não houve sobreposição na árvore de NJ e as espécies foram diferenciadas de acordo com o gênero com um valor bootstrap de 96-99%.

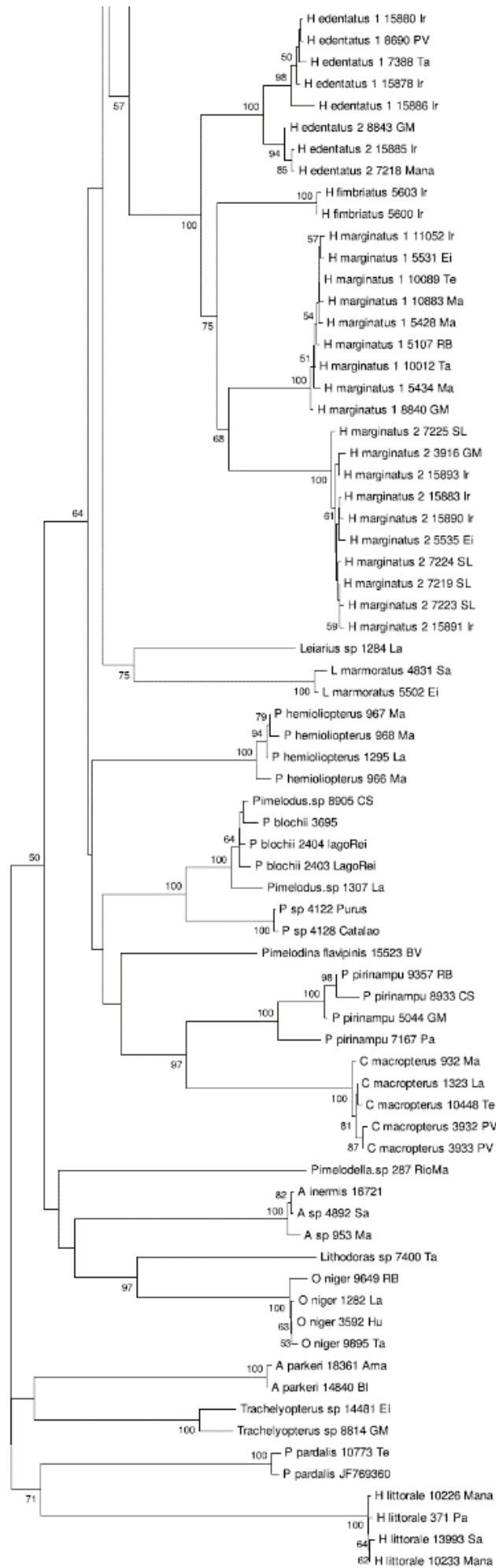
Na árvore de NJ, bem como a previsão de agrupamento do resultado ABGD (Tabela 03) mostraram agrupamento semelhante dos congêneres estudados no conjunto de dados.

Grupos	Nº	Espécies
1	1	<i>Hemisorubim sp.</i>
2	1	<i>Trachelyopterus sp.</i>
3	5	<i>Zungaro zungaro</i>
4	1	<i>Pinirampus pirinampu</i>
5	1	<i>Sorubim lima</i>
6	2	<i>Pimelodus blochii</i>
7	5	<i>Leiarius marmoratus</i>
8	10	<i>Hypophthalmus edentatus (morfotipo 1)</i>
9	8	<i>Hypophthalmus edentatus (morfotipo 2)</i>
10	17	<i>Hypophthalmus marginatus (morfotipo1)</i>
11	18	<i>Hypophthalmus marginatus (morfotipo 2)</i>

Tabela 03. Resultado ABGD do conjunto de dados estudado revelando grupos na partição 6 (distância máxima P = 0,012915).

Figura 03. Dendrograma Neighbour-joining com base no modelo K2P, usando os haplotipos das 33 espécies de Siluriformes analisadas.





4. Discussão

O presente estudo demonstrou a eficácia da técnica do DNA *Barcode* para identificação das espécies de Siluriformes da Amazônia brasileira. O tamanho das sequências obtida é consistente com o fragmento esperado para a região mitocondrial COI observado em estudos de códigos de barras realizados em peixes (LIMA, *et al.*, 2016; QUILANG & YU, 2013). Assim como, a composição média das bases nitrogenadas encontradas (LAKRA, *et al.*, 2015).

Na categoria de identificação ao nível de espécie das sequências consultadas nos bancos de Dados público, o *BOLD* indicou como incapaz de combinar a sequência com o banco de dados existente, ou seja, não indicou a sequência de DNA de outra espécie presente no banco de dados, sendo confiável para identificação neste nível. O *GenBank* sozinho mostrou similaridade específica de espécies. O sistema de identificação baseado em DNA só funciona se todas as espécies já descritas tiverem suas sequências no banco de dados (DAYRAT, 2005). Entretanto, uma das sequências de *B. capapretum* foi identificada no *BOLD* como um congênere *B. filamentosum*. Isso demonstra a importância da análise correta dos *vouchers*, para não haver conflito entre as publicações científicas e de sequências depositadas no banco de dados.

Dentre as 33 espécies estudadas, 8 são até o momento sequências inéditas no *BOLD* e esta pesquisa visa também à complementação deste banco com sequências de Siluriformes.

Nos dados observados no presente trabalho, as distâncias interespecíficas encontradas para as duas espécies de jaús aceitas taxonomicamente como distintas (*Zungaro zungaro* e *Zungaro jahu*), evidenciam baixa divergência interespecífica para o gene COI, com o valor de 0,2 o que é considerado insuficiente para separar espécies segundo a abordagem do DNA *Barcode*. Esses valores de divergência foram semelhantes encontrados por Pires (2014). Segundo o estudo de Boni *et al.*, (2011), a taxonomia do grupo que compreende os jaús está ainda pouco resolvida, com muitas incertezas e muitas espécies sinônimas à *Zungaro*. Segundo Lundberg e Littmann (2003) há duas espécies morfológicamente distintas atualmente válidas, sendo *Zungaro zungaro* de ocorrência na bacia Amazônica-Orinoco e a espécie *Zungaro jahu* de ocorrência na bacia do Paraná-Paraguai. No entanto, Graça e Pavanelli (2007), realizando análises morfológicas, sugerem a existência de uma única espécie para o grupo dos jaús.

A diversidade interespecífica do gene COI foi observada em *L. marmoratus* na árvore NJ-K2P (Figura 03) com a separação de clados diferentes. As sequências nomeadas como *Leaurius sp.* foram compatíveis com *L. marmoratus* no banco de dados *NCBI* com 88% de similaridade. Esta espécie apresentou níveis de distância genética interespecífica variando de 1,6 a 1,4 (Anexo 02). Embora esses valores possam sugerir que existam mais de uma linhagem biológica para *L. marmoratus*, nossos resultados não suportam esta hipótese. Estudos tem mostrado que

linhagens diversificam mais rapidamente dentro de espécies do que entre espécies (PONS, *et al.*, 2006). Isto se deve ao fato de que a diversificação dentro de espécies é impulsionada por mutações a uma taxa superior a encontrada entre espécies.

Foram alcançados níveis significativos 100% de compatibilidade de sequência no *BOLD*, para a espécie *P. blochii* com espécies de *P. maculatus*. A espécie *P. blochii* descrita na bacia amazônica, possui características morfológicas distintas das outras espécies encontradas em bacias diferentes. Semelhanças moderadas foram encontradas para sequências das duas espécies no estudo de Lima *et al.* (2016) o que pode sugerir a divergência na identificação, mas também podem indicar uma diferenciação das espécies do Pantanal em relação a outros haplótipos encontrados em diferentes bacias hidrográficas do Brasil. Ribeiro e Lucena (2006) relataram uma ampla variação na morfologia e na cor dos indivíduos no gênero *Pimelodus*, que poderia ser responsável por causar erros de identificação morfológica.

Sugerimos a realização de novas análises nesses grupos para haver consenso em relação se realmente caracterizam como mais de uma espécie.

Considerando a facilidade de diferenciação morfológica do gênero *Hypophthalmus*, a partir dos dados encontrados no presente trabalho foi observada a presença de pelos menos duas linhagens biológicas. O gênero foi recentemente inserido na Família *Pimelodidae* e há uma grande divergência entre os autores, sobre as espécies que compõem esse Gênero. Segundo Cutrim Leony & Batista (2005) o gênero possui três espécies, *H. edentatus*; *H. fimbriatus* e *H. marginatus*. Outros estudos apontam que há quatro espécies descritas até o momento (*H. oremaculatus*, *H. edentatus*, *H. fimbriatus* e *H. marginatus*) (OLIVEIRA, *et al.*, 2008; BRAGA. L. 2009; LUNDBERG & LITTMANN, 2003; FERRARIS JR., 2007).

As espécies são distribuídas pela América do Sul, sendo que três das quatro espécies descritas ocorrem na bacia amazônica. *H. edentatus* e *H. marginatus* ocorrem nas bacias do Orinoco e Amazonas, e em alguns rios da Guiana, Guiana Francesa e Suriname, *H. fimbriatus* distribui-se do Brasil até a Venezuela apenas na bacia do rio Negro e áreas de influência desse rio e *H. oremaculatus* distribui-se apenas na bacia do Paraná (LUNDBERG & LITTMANN, 2003; FERRARIS JR., 2007).

Em estudos realizados por López-Fernández e Winemiller (2000) foram encontradas variações morfológicas entre exemplares de *H. fimbriatus* que ocorrem no rio Negro e na Venezuela, havendo assim uma necessidade de uma revisão detalhada. Além disso, análises morfológicas de *H. edentatus* e *H. marginatus* sugerem que essas duas espécies sejam subdivididas em dois grupos cada uma, e que a espécie. *H. oremaculatus*, de ocorrência restrita à bacia do Paraná, seria na verdade um dos subgrupos de *H. edentatus* (BRAGA. L. 2009).

Os valores de divergência interespecífica mínima foi de 0,2 e máxima de 0,9 para o gênero *Hypophthalmus*. Baixos valores de divergência interespecíficos podem sugerir que provavelmente não houve um acúmulo de mutações suficientes em um período considerado, capaz de permitir a diferenciação entre as espécies após sua divergência (HEBERT, *et al.*, 2003). É importante ressaltar que, valores de divergência interespecífica que variam de 0,3 a 1,0 também são encontrados em espécies que pertencem ao gênero *Brachyplatystoma*. Este é um grupo melhor representado neste trabalho, com características morfológicas distintas (LUNDBERG & PARISI, 2002; LUNDBERG & AKAMA, 2005).

Ward *et al.* (2005), ao analisar o gênero *Thunnus*, que incluem indivíduos com características morfológicas diferentes, verificou que as distâncias genéticas foram muito baixas, comparadas com outros gêneros no mesmo estudo, com uma média da divergência dentro do gênero *Thunnus* de 1,11%, os autores concluíram que as espécies de atuns podem possivelmente terem divergido recentemente.

Os valores de divergência encontrados na presente pesquisa, é consistente com Hebert *et al.* (2003), que os limites taxonômicos devem ser estabelecidos de acordo com o grupo em estudo, ou seja, que os valores de divergências intraespecíficas e interespecíficas podem variar de acordo com a espécie e a região geográfica.

Pereira *et al.* (2011), demonstrou que valores baixos de divergência interespecífica confirmam o mencionado acima, que 2% como valor de corte devem ser usados apenas como ponto de partida para delimitar espécies. Assim, sugere que, para esses casos, um novo valor de corte deve ser calculado com base nos valores de divergência genética observados dentro do gênero.

As médias das distâncias intraespecífica e interespecífica (0,003 e 0,13, respectivamente) de COI de Siluriformes estão dentro dos padrões anteriormente relatados para peixes de água doce (HUBERT, *et al.*, 2008). Todas as sequências da mesma espécie formaram clusters com alto suporte de bootstrap (>96), sem sobreposição entre espécies, mesmo em espécies dentro dos mesmos gêneros.

Desse modo o presente estudo confirma a presença do “*barcoding gap*”, na maioria dos taxons aqui analisados, estando de acordo com Meyer & Paulay (2005), o comprimento do ramo entre as espécies tende a ser maior do que entre indivíduos de uma mesma espécie, levando a uma lacuna na distribuição da distância entre pares, e a distância média intraespecífica, foi geralmente menor do que a média de distância interespecífica.

Semelhantes resultados já foram demonstrados em estudos de peixes Siluriformes do rio Paraguai, os dados médios de distância K2P observados (espécies 0,2%, congêneres 1,6% e

famílias 4,2%) (LIMA, et al., 2016). Pereira et al. (2013) observaram uma média de K2P de 1,3%, 6,8% e 20,1% em 253 espécies de peixes de água doce na América do Sul entre indivíduos da mesma espécie, congêneres e famílias, respectivamente. Neste estudo, os valores mais baixos observados podem estar relacionados à proximidade dos táxons avaliados, como relatado por Rosso et al. (2012).

Hubert *et al.* (2008) obtiveram as sequências barcode para 190 espécies de peixes de água doce do Canadá, discriminando corretamente 93% das espécies analisadas. Em outro estudo, Valdez-Moreno et al. (2009) avaliaram 61 espécies de peixes de água doce do México e Guatemala discriminando corretamente 93% das espécies. Lara *et al.* (2010) obtiveram as sequências barcode de 27 espécies de peixes de água doce de Cuba conseguindo uma resolução de 96%. Ward (2009) analisando as sequências barcode de 1088 espécies de peixes que se encontravam depositadas no *BOLD* encontrou uma eficácia de discriminação de 97,5%. Recentemente, o DNA *Barcode* serviu de ferramenta para identificação de 86 espécies larvas de Siluriformes na amazônia (MAGGIA et al., 2017).

Por outro lado, ficou claro que as espécies com problemas de separação pela técnica de barcode foram exatamente algumas espécies pertencentes a grupos com histórico de problemas taxonômicos, como é o caso dos gêneros *Hypophtalmus* e *Pimelodus*. Em alguns casos, só conseguimos identificar ao nível do gênero como de *Pimelodella.sp.* e *Hemisorubim sp.*

A presente pesquisa permitiu a identificação de 33 espécies analisadas (96%) por meio dos dois métodos de análises empregadas (ABGD e NJ). Esses resultados são condizentes aos encontrados na literatura sobre a identificação molecular de ictiofaunas pelo método do DNA *Barcode* (LASKAR, *et al.*, 2016; DIAZ, *et al.*, 2016). Apesar dos altos valores de distâncias genéticas não terem sido observados entre a maioria das espécies, o não compartilhamento de haplótipos indicam diferenciação.

5. CONCLUSÃO

Este estudo corrobora a adequação da abordagem do DNA *Barcode* em discriminar e identificar, sem ambiguidade, a grande maioria das espécies da Ordem Siluriformes. O DNA *Barcode* não se concentra em realizar taxonomia baseado somente no DNA, mas em produzir informações de identificação molecular universal a partir do conhecimento taxonômico já existente. O combinado de diferentes abordagens de análises para os dados de DNA *Barcode* foi eficiente, permitindo a discriminação de espécies mesmo com valores de divergência genética baixos. Por outro lado, os presentes resultados apontam para uma necessidade de realização de novos estudos taxonômicos dos Gêneros *Hypophthalmus* e *Pimelodus*, para uma melhor caracterização desses grupos.

Foi possível discriminar cerca 96% das espécies analisadas concordando com a análise taxonômica e morfológica. Além disso o estudo contribuiu com novos códigos de barras para oito espécies de peixes da Ordem Siluriformes da amazônia brasileira. Finalmente, nosso estudo faz uma contribuição importante para a ictiofauna da bacia amazônica, colaborando para o conhecimento e facilitando o manejo e a conservação das espécies estudadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDURA, A., LINDE, A. R., MOREIRA, J. C.; GARCIA-VAZQUEZ, E. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. **Biological Conservation**, 143(6), 1438-1443. 2010.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, 25: 3389-3402. 1997.
- BENZAQUEM, D. C.; OLIVEIRA, C.; BATISTA, J. DA S.; ZUANON, J.; REBELO, P. J. I. DNA Barcoding in Pencilfishes (Lebiasinidae: Nannostomus) Reveals Cryptic Diversity across the Brazilian Amazon. **Plos ONE**. 10, e 0112217. 2015.
- BRITO, M. A.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; SANTOS, S. DNA barcoding reveals high substitution rate and mislabeling in croaker fillets (Sciaenidae) marketed in Brazil: The case of pescada branca (*Cynoscion leiarchus* e *Plagioscion squamosissimus*) .**Food Research International** 70, 40-46, 2015.
- BHATTACHARJEE, M. J.; LASKAR, B. A.; DHAR, B.; GHOSH, S. K. Identification and Re-Evaluation of Freshwater Catfishes through DNA Barcoding. **Plos One** 7(11): e 49950. 2012.
- BONI, T. A. et al. Molecular differentiation of species of the genus *Zungaro* (Siluriformes, Pimelodidae) from the Amazon and Paraná-Paraguay river basins in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, 10 (4): 2795-2805. 2011.
- BRAGA, L. **Análise citogenética das espécies do gênero *Hypophthalmus* (Siluriformes, Pimelodidae) da região do Lago Catalão, Amazonas, Brasil.** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 72 pp. 2009.
- CARVALHO, D. C.; PIMENTA NETO, D. A.; BRASIL, B. S. A. F.; OLIVEIRA, D. A. A. DNA barcoding unveils a high rate mislabeling. **Mitochondrial DNA**, 22(S1): 97-105, 2011.
- BARTHEM, R.; GOULDING, M. **Os bagres balizadores. Ecologia, migração e conservação de peixes amazônicos.** Sociedade Civil Mamirauá: MTC-CNPQ-IPAAM, 130 pg. 1997.
- CORDOBA, E. A.; LEON, A. V. J, BONILLA-CASTILLO C. A.; PETRERE JUNIOR, M.; PELAEZ, M.; DUPONCHELLE, F. Breeding, growth and exploitation of *Brachyplatystoma rousseauxii* Castelnau, 1855 in the Caqueta River, Colombia. **Neotropical Ichthyol**; 11:637±47. 2013.
- CLARE, E.L; LIM, B. K.; FENTON, M.; HEBERT, P. D. N. Neotropical Bats: Estimating Species Diversity with DNA Barcodes. **PLoS One** e22648. 2011.
- CUTRIM, L.; BATISTA, V. L. Determinação de idade e crescimento do mapará (*Hypophthalmus marginatus*) na Amazônia Central. **Acta amazônica**, 20: 244-255. 2005.

DÍAZ, J.; VILLANOVA, G. V.; BRANCOLINI, F.; DEL PAZO, F.; POSNER, V.M.; GRIMBERG, A. First DNA Barcode Reference Library for the Identification of South American Freshwater Fish from the Lower Paraná River. **PLoS ONE**, 11(7) p 1-20. 2016.

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

FERRARIS C. J. **Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types.** Zootaxa 1418:1–628. 2007.

GALIMBERTI, A.; MATTIA, F. D.; LOSA, A.; BRUNI, I.; FEDERICI, S.; CASIRAGHI, M.; MARTELLOS, S.; LABRA, M. DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International*, 50(1), 55-63. 2013.

HUBERT, N.; HANNER, R.; HOLM, E.; MANDRAK, N. E.; TAYLOR, E.; BURRIDGE, M.; Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. **PLoS ONE**; 3:e2490. 2008.

HEBERT, P. D. N.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S. and FRANCIS, C. M. "Identification of Birds through DNA Barcode. " **PLoS BIOLOGY** (2), no. 10: 1657-1663. 2004a.

HEBERT, P. D.; 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 of the United States of America**, 101(41), 14812-14817. 2004b.

HEBERT, P. D. N, CYWINSKA, A.; BALL, S. L; De WAARD J. R. "Biological identifications through DNA Barcode. " **Proc R Soc Lond B** (270):313-322. 2003a.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; De WAARD, J. R.. "*Barcoding* animal life: cytochrome C oxidase subunit 1 divergences among closely related species." **Proc Biol Sci** (270): 96-99. 2003b.

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

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** 16: 111 - 120. 1980.

LIMA, T. P. DE C.; EGITO, A. A. D. O.; FEIJÓ, G. L. D.; MAURO, R. DE A.; FERRAZ A. L. J. Molecular identification and phylogenetic analysis of siluriformes from the Paraguay River basin, Brazil. **Mitochondrial DNA**, 2470-1408. 2016.

LASKAR, B. A.; KUMAR, V., DARSHAN, A.; KUNDU, S.; DAS, D. N. DNA barcoding of *Amblyceps* congeners (Siluriformes: Amblycipitidae) from Brahmaputra drainage in northeast India. **Mitochondrial DNA**, 2470-1408. 2016.

LAKRA, W. S.; SINGH, M.; GOSWAMI, M.; GOPALAKRISHNAN, A.; LAL, K. K.; MOHINDRA, V.; SARKAR, U. K.; PUNIA, P. P.; SINGH, K. V.; BHATT, J. P.; AYYAPPAN, S. DNA barcoding Indian freshwater fishes. **Mitochondrial DNA**, 1940-1744. 2015.

- LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**. 25: 1451–1452. 2009.
- LUNDBERG, J. G. & A. AKAMA. *Brachyplatystoma capapretum*: a new species of goliath catfish from the Amazon Basin, with a reclassification of allied catfishes (Siluriformes, Pimelodidae). **Copeia**, 492-516. 2005.
- LUNDBERG, J. G.; LITTMANN, M. W. Family Pimelodidae (Long-Whiskered Catfishes) In: Reis, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. **Check List Of The Fresh Water Fishes Of South And Central América**. Porto Alegre: Edipucrs, P. 432-446. 2003.
- LUNDBERG. J. G. & B. M. PARISI. *Propimelodus*, new genus, and redescription of *Pimelodus eigenmanni* Van der Stigchel 1946, a long-recognized yet poorly-known South American catfish (Pimelodidae, Siluriformes). **Proceedings of the Academy of Natural Sciences**, Philadelphia, 152: 75-88. 2002.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H.; WINEMILLER, K. O. 2000. A review of Venezuelan species of *Hypophthalmus* (Siluriformes: Pimelodidae). **Ichthyology Explorer Freshwaters**, 11(1): 35-46.
- MAGGIA, M. E.; VIGOUROUX, Y.; RENNO, J. F.; DUPONCHELLE, F.; DESMARAIS, E.; NUNEZ, J.; ET AL. DNA Metabarcoding of Amazonian Ichthyoplankton Swarms. **PLoS ONE** 12(1): e 0170009. 2017.
- MEGANATHAN, P. R.; DUBEY, B.; JOGAYYA, K. N.; HAQUE, I. Identification of Indian crocodile species through DNA barcodes. **Journal of forensic sciences**, 58(4), 993-998. 2013.
- MEYER, C. P. e PAULAY, G. “DNA barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling.” **PLoS Biology** 3, n. 12 (December): p422. 2005.
- NELSON, J. S. **Fishes of the World**. Department of Biological Science. University of Alberta. Canada. V.4. p. 601. 2006.
- PIRES, A. A. A. Identificação molecular e caracterização de peixes do gênero *Zungaro* (Siluriformes: Pimelodidae) de diferentes bacias hidrográficas. Dissertação (Mestrado), UFSCar, 2014.
- PEREIRA, L. H. G; HANNER, R; FORESTI, F; OLIVEIRA, C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics**.1471-2156/14/20. 2013.
- PUILLANDRE, N; LAMBERT, A; BROUILLET, S. ACHAZ, G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular Ecology** 21: 1864 - 1877. 2012.
- PEREIRA, L. H. G.; MAIA, G. M. G.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. **Mitochondrial DNA**, 22(Suppl 1):71–79.2011.
- PLATT, A. R.; WOODHALL, R. W.; GEORGE J. R. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. **Biotechniques** n. 43, p.58-62. 2007.

- PONS J.; BARRACLOUGH, T. G.; GOMEZ-ZURITA, J.; CARDOSO, A.; DURAN, D. P.; ET AL. Sequence based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. **Systematic Biology** 55: 595–606. 2006.
- PAITHANKAR, K. R.; PRASAD, K. S. N. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. **Nucleic Acids Reserach**. V. 19, n. 6, p. 1346. 1991.
- QUILANG, J. P.; YU, S. C. S. DNA barcoding of commercially important catfishes in the Philippines. **Mitochondrial DNA**, 26(3): 435–444. 2015.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD: the barcode of life data system (www.barcodinglife.org). **Mol. Ecol. Notes**, 7: 355-364. 2007.
- RIBEIRO, F. R. V.; LUCENA, C. A. S. D. A new species of *Pimelodus* LaCepede, 1803(Siluriformes: Pimelodidae) from the rio São Francisco drainage, Brazil. *Neotropical Ichthyol.* 4:411–418. 2006.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA**. 18.125pp. 2001.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725 - 2729. 2013.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, 22: 4673-4680. 1994.
- VALDEZ-MORENO M.; IVANOVA, N. V.; ELIAS-GUTIERREZ, M.; CONTRERAS-BALDERAS, S.; HEBERT, P. D. N. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. **J Fish Biol**, 74:377–402. 2009.
- WONG, L. L.; PEATMAN, E.; LU, J., KUCUKTAS, H.; HE, S., ZHOU, C.; NA-NAKORN, U.; LIU, Z. DNA Barcoding of Catfish: Species Authentication and Phylogenetic Assessment. **PLoS ONE** 6(3): e17812. 2011.
- WARD, R.D.; HANNER, R.; HEBERT, P.D.N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISHBOL. **Journal of Fish Biology**, v. 74, p. 329-356, 2009.
- WARD, R. D.; HOLMES, B. H.; YEARSLEY, G. K. DNA barcoding reveals a likely second species of Asian sea bass (*Barramundi*) (*Lates calcarifer*). **J Fish Biol** 72:458–63. 2008.
- WARD R.D.; ZEMLAK T.S.; INNES B.H.; LAST P.R.; HEBERT P.D.N. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360:1847–1857. 2005.

7. Anexos:

Anexo 01- Tabela 04. Lista das espécies comparadas com sequências provenientes dos Bancos de dados público, usando a pesquisa *BLASTN* do *NCBI* e Sistema de identificação *BOLD* (*BOLD-IDS*).

Nº do tecido	Identificação de Campo	Identificação NCBI	Similaridade (%)	Identificação BOLD	Similaridade (%)
18361	<i>Arius parkeri</i>	<i>Sciades seemanni</i>	90	<i>Sciades parkeri.</i>	99.84
14840	<i>Arius parkeri</i>	<i>Sciades seemanni</i>	90	<i>Sciades parkeri.</i>	100
16721	<i>Ageneiosus Inermis</i>	<i>Ageneiosus Inermis</i>	99	<i>Ageneiosus Inermis</i>	99.69
4892	<i>Ageneiosus sp.</i>	<i>Ageneiosus Inermis</i>	100	<i>Ageneiosus Inermis</i>	100
953	<i>Ageneiosus sp.</i>	<i>Ageneiosus Inermis</i>	100	<i>Ageneiosus ucayalensis</i>	100
4787	<i>Brachyplatystoma capapretum</i>	<i>Brachyplatystoma capapretum</i>	100	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	97.21
1116	<i>Brachyplatystoma juruense</i>	<i>Brachyplatystoma juruense</i>	99	S/ correspondência	
3336	<i>Brachyplatystoma Platynemum</i>	<i>Brachyplatystoma Platynemum</i>	99	<i>Brachyplatystoma Platynemum</i>	100
4031	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	99	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	100
1926	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	99	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	100
1182	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	99	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	99.53
15269	<i>Brachyplatystoma tigrinum</i>	<i>Brachyplatystoma tigrinum</i>	99	S/ correspondência	
10448	<i>Calophysus macropterus</i>	<i>Calophysus macropterus</i>	99	<i>Calophysus macropterus</i>	99.68
15515	<i>Hemisorubim platyrhynchos</i>	<i>Hemisorubim platyrhynchos</i>	99	<i>Hemisorubim platyrhynchos</i>	99.82
13463	<i>Hemisorubim sp.</i>	<i>Hemisorubim platyrhynchos</i>	96	S/ correspondência	
10012	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	99	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	99.53
10089	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	99	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	92
5535	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	99	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	98.91
11052	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	99	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	99.53
7219	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	99	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	99.53
5434	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	99	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	99.22
5532	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	99	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	99.53
15897	<i>Hypophthalmus marginatus (morfortipo2)</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	99	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	99.53
15896	<i>Hypophthalmus marginatus (morfortipo 2)</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	99	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	99.53
15891	<i>Hypophthalmus marginatus (morfortipo 1)</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	99	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	99.37
15893	<i>Hypophthalmus marginatus (morfortipo 1)</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	99	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	99.69
15894	<i>Hypophthalmus marginatus (morfortipo 1)</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	99	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	99.53
5603	<i>Hypophthalmus fimbriatus</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	93	S/ correspondência	
5600	<i>Hypophthalmus fimbriatus</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	93	S/ correspondência	
5062	<i>Hypophthalmus fimbriatus</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	93	S/ correspondência	
7388	<i>Hypophthalmus edentatus</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	99	<i>Hypophthalmus oremaculatus</i>	97.67
9584	<i>Hypophthalmus edentatus</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	99	<i>Hypophthalmus oremaculatus</i>	97.66
7211	<i>Hypophthalmus edentatus</i>	<i>Hypophthalmus edentatus</i>	99	<i>Hypophthalmus oremaculatus</i>	99.69
7215	<i>Hypophthalmus edentatus</i>	<i>Hypophthalmus edentatus</i>	99	<i>Hypophthalmus oremaculatus</i>	99.69
8690	<i>Hypophthalmus edentatus</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	99	<i>Hypophthalmus oremaculatus</i>	97.51
7218	<i>Hypophthalmus edentatus</i>	<i>Hypophthalmus edentatus</i>	99	<i>Hypophthalmus oremaculatus</i>	99.53
5438	<i>Hypophthalmus edentatus</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	99	<i>Hypophthalmus oremaculatus</i>	97.67
7212	<i>Hypophthalmus edentatus</i>	<i>Hypophthalmus edentatus</i>	99	<i>Hypophthalmus oremaculatus</i>	99.69
15877	<i>Hypophthalmus edentatus (morfortipo 1)</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	99	<i>Hypophthalmus oremaculatus</i>	97.67
15878	<i>Hypophthalmus edentatus (morfortipo1)</i>	<i>Hypophthalmus sp.</i>	98	<i>Hypophthalmus oremaculatus</i>	97.33
15884	<i>Hypophthalmus edentatus (morfortipo 2)</i>	<i>Hypophthalmus edentatus</i>	99	<i>Hypophthalmus oremaculatus</i>	99.69
15885	<i>Hypophthalmus edentatus (morfortipo 2)</i>	<i>Hypophthalmus edentatus</i>	99	<i>Hypophthalmus oremaculatus</i>	99.69
8843	<i>Hypophthalmus sp.</i>	<i>Hypophthalmus marginatus</i>	100	<i>Hypophthalmus oremaculatus</i>	100
10233	<i>Hoplosternum littorale</i>	<i>Hoplosternum littorale</i>	99	<i>Hoplosternum littorale</i>	100
4831	<i>Leiarius marmoratus</i>	<i>Leiarius marmoratus</i>	99	<i>Leiarius marmoratus</i>	99.22
5502	<i>Leiarius marmoratus</i>	<i>Leiarius marmoratus</i>	100	<i>Leiarius marmoratus</i>	100
1284	<i>Leiarius marmoratus</i>	<i>Leiarius marmoratus</i>	88%	S/ correspondência	
3592	<i>Oxydoras niger</i>	<i>Oxydoras niger</i>	100	<i>Oxydoras niger</i>	100

5814	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100
5813	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100
8014	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100
5511	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100
7627	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100
5779	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100
5824	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100
5774	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100
5790	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100
9704	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100
956	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	100	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	100
3322	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	100	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	100
5947	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	100	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	100
8790	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	100	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	100
5160	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	100	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	100
10542	<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	100	<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	100
10541	<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	100	<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	100
1307	<i>Pimelodus sp.</i>	<i>Pimelodus cf. argenteus</i>	99	<i>Pimelodus sp.</i>	99.52
8905	<i>Pimelodus sp.</i>	<i>Pimelodus blochii</i>	98	<i>Pimelodus blochii</i>	98.69
3695	<i>Pimelodus blochii</i>	<i>Pimelodus blochii</i>	99	<i>Pimelodus blochii</i>	99.44
4122	<i>Pimelodus blochii</i>	<i>Pimelodus maculatus</i>	100	<i>Pimelodus maculatus</i>	100
2403	<i>Pimelodus blochii</i>	<i>Pimelodus blochii</i>	99	<i>Pimelodus blochii</i>	99.65
2404	<i>Pimelodus blochii</i>	<i>Pimelodus blochii</i>	99	<i>Pimelodus blochii</i>	99.83
4128	<i>Pimelodus blochii</i>	<i>Pimelodus blochii</i>	99	<i>Pimelodus maculatus</i>	100
15523	<i>Pimelodina flavipinnis</i>	<i>Pimelodina flavipinnis</i>	99	S/ correspondência	
287	<i>Pimelodella sp.</i>	<i>Pimelodella vittata</i>	91	S/ correspondência	
10146	<i>Platynemichthys notatus</i>	<i>Platynemichthys notatus</i>	99	S/ correspondência	
1295	<i>Phractocephalus hemiliopterus</i>	<i>Phractocephalus hemiliopterus</i>	99	<i>Phractocephalus hemiliopterus</i>	99.68
10773	<i>Pterygoplichthys pardalis</i>	<i>Pterygoplichthys pardalis</i>	99	<i>Pterygoplichthys pardalis</i>	100
5044	<i>Pinirampus pirinampu</i>	<i>Pinirampus pirinampu</i>	99	<i>Pinirampus pirinampu</i>	99.69
9357	<i>Pinirampus pirinampu</i>	<i>Pinirampus pirinampu</i>	99	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	100
5044	<i>Pinirampus pirinampu</i>	<i>Pinirampus pirinampu</i>	99	<i>Pinirampus pirinampu</i>	99.69
944	<i>Pinirampus pirinampu</i>	<i>Pinirampus pirinampu</i>	99	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	100
7400	<i>Lithodoras sp.</i>	<i>Pterodoras granulosus</i>	99	<i>Pterodoras granulosus</i>	99.21
10168	<i>Sorubim lima</i>	<i>Sorubim lima</i>	99	<i>Sorubim lima</i>	98.91
8935	<i>Sorubim lima</i>	<i>Sorubim lima</i>	99	<i>Sorubim lima</i>	98.9
5500	<i>Sorubim lima</i>	<i>Sorubim lima</i>	99	<i>Sorubim lima</i>	98.71
3909	<i>Sorubim lima</i>	<i>Sorubim elongatus</i>	100	S/ correspondência	
14481	<i>Trachelyopterus sp.</i>	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	99	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	98.91
8814	<i>Trachelyopterus sp.</i>	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	99	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	99.66
15158	<i>Zungaro zungaro</i>	<i>Zungaro zungaro</i>	99	<i>Zungaro jahu</i>	99.51
12857	<i>Zungaro zungaro</i>	<i>Zungaro jahu</i>	98	<i>Zungaro jahu</i>	97.83
13372	<i>Zungaro zungaro</i>	<i>Zungaro zungaro</i>	99	<i>Zungaro zungaro</i>	99.67

