

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DIVERSIDADE GENÉTICA E RELAÇÕES
FILOGENÉTICAS DE SILURIFORMES UTILIZANDO
DNA BARCODING

Acadêmico: Thalles Policarpo de Carvalho Lima

Aquidauana-MS
Fevereiro/2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DIVERSIDADE GENÉTICA E RELAÇÕES
FILOGENÉTICAS DE SILURIFORMES UTILIZANDO
DNA BARCODING

Acadêmico: Thalles Policarpo de Carvalho Lima
Orientador: Prof. Dr. André Luiz Julien Ferraz

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.”

Aquidauana-MS
Fevereiro/2015

L711d Lima, Thalles Policarpo de Carvalho
Diversidade genética e relações filogenéticas de Siluriformes
utilizando DNA barcoding/ Thalles Policarpo de Carvalho Lima.
Aquidauana: UEMS, 2015.
52f.

Dissertação (Mestrado) – Zootecnia – Universidade Estadual
de Mato Grosso do Sul, 2015.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Julien Ferraz.

1. Relações filogenéticas 2. Siluriformes 3. DNA barcoding I.
Título

CDD 23.ed. - 575.5



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
PRODUÇÃO ANIMAL NO CERRADO-PANTANAL



THALLES POLICARPO DE CARALHO LIMA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23/02/2015.



Dr. André Luiz Julien Ferraz (UEMS)
Orientador.



Dr. Jayme Aparecido Poyh (UFMS)



Dra. Andréa Alves do Egito (EMBRAPA)

“É exatamente disso que a vida é feita: de **momentos**! Momentos os quais temos que passar, sendo **bons** ou **não**, para o nosso próprio aprendizado, por algum **motivo**. Nunca esquecendo o mais importante: nada na vida **É POR ACASO**.”

Chico Xavier

*Este Trabalho eu dedico a **Deus**, a meus amados Pais **Rosilene** e **Antenor**,
bem como aos **Peixes Siluriformes do Pantanal**.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a DEUS acima de tudo, pela coragem, sabedoria, amor, paciência, inspiração e cuidados que tem comigo;

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. André Luiz Julien Ferraz “Splinter”, pela orientação, dedicação, confiança, incentivo, compreensão, advertências ao longo do processo, o que facilitou muito a execução deste trabalho e certamente eu não teria conseguido sem a sua ajuda;

À Prof. Dra. Andréa Alves do Egito, pela enorme colaboração na realização deste trabalho, pelos conselhos (que não foram poucos), correções, ensinamentos, elogios, amizade e boa conversa com um excelente café;

Ao Dr. Gelson Luís Dias Feijó, pela oportunidade concedida para realização deste trabalho;

Ao Dr. Rodiney de Arruda Mauro, por ter elucidado muitos dos mistérios sobre a biologia e ecologia dos peixes do Pantanal;

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul – UEMS, por proporcionar essa oportunidade de aperfeiçoamento;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Ao cachorro Toby, um amigo bem diferente;

A vó Elisa e a Nicácia por terem me acolhidos como um neto;

Em especial alguns amigos que sempre me ajudaram com suas palavras, boas conversas, excelentes gargalhadas, por suas ajudas mais diferenciadas: Edyane Moraes “25 anos de convivência e amizade”, Isabella

Blecha, Catherine Walker, Renata Bastos, Barbara Guimaraes, Eduardo Feitas - que por ai já vai mais de 6 anos de amizade- e Marcelo Nascimento;

Aos meus amigos de pós-graduação e de convivência em Aquidauana e Campo Grande que fizeram parte do mestrado e da vida (Emily; Itânia; Vanessa; Kelen; Michelly; Mayara; Marlene; Luana; Marcelo; Hanner; Thiago; Alisson; André, Rotsen e Adria);

Aos companheiros de risadas e distrações do almoço na Embrapa: Bia, Catherine, Izildinha, Leandro, Marcos (bola), Marcão, Jackeline, Dr. Koller “que proporcionaram meus dias de trabalho mais divertidos”;

As minhas pequenas meninas do laboratório, que tornaram meus dias cheios de vida: Franh de Oliveira; Isadora Inácio e Paula Adas;

Aos meus amigos do LabCarne, na Embrapa Gado de Corte, Giancarlo Moura, Mery Suryta, Marina Bonin e Igor, por toda ajuda concedida;

A meus amigos e amigas da sala de estudo: Sandra, Gustavo, Ana, Ândrea e Camila, pelas boas e velhas conversas de todos os dias;

Aos amigos da UEMA que continuam mantendo contato “Whatsap”;

A minha Tia Rita, que é uma segunda mãe para mim e é um exemplo de amor e ser humano a ser seguido;

Ao amigo Antonio Luiz, que sempre que possível está ao meu lado;

E acima de tudo a meus pais Rosilene e Antenor por toda dedicação, amor, carinho e paciência dado a minha pessoa ao longo do meu crescimento e amadurecimento como pessoa, sem nunca ter cobrado nada a mais do que é necessário. Gratidão por tudo!

As pessoas que ajudaram e que eu eventualmente tenha esquecido de citar peço desculpas;

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para que esse trabalho se concretizasse.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. ÁREA DE ESTUDO	3
2.2. SILURIFORMES	5
2.2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	5
2.3. A IMPORTÂNCIA DA DIVERSIFICAÇÃO GENÉTICA.....	7
2.4. DNA <i>BARCODING</i>	8
3. OBJETIVO GERAL	12
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
CAPÍTULO 2. Identificação molecular e análise filogenética de Siluriformes pertencentes à bacia do Paraguai, Brasil	20
RESUMO	21
INTRODUÇÃO	22
MATERIAIS E MÉTODOS	23
RESULTADOS.....	25
DISCUSSÃO	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
CAPÍTULO 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 Mapa da Bacia do Rio Paraguai, abrangendo partes dos estados do MT e MS no Brasil e os países Bolívia e Paraguai. Mapas disponibilizados no sítio <http://pantanalcoltec.blogspot.com.br>..... 18
- FIGURA 2 Exemplar da ordem dos Siluriformes. Figura retirada do livro de BRITSKI et al., (2007). 22

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 Distribuição dos pontos de coleta de amostras ao longo da Bacia do Paraguai no Pantanal..... 23
- FIGURA 2 Árvore filogenética estimada com base na distância genética de Kimura 2 Parâmetros agrupados pelo método de Neighbor-Joining (1000 *bootstrap*), baseada em sequências de mtDNA do gene *COI* de 62 amostras de peixes Siluriformes e um outgrup (*Salmo salar*). Pontos pretos identificam os possíveis híbridos..... 30

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1	Identificação dos espécimes com base na similaridade das sequências consenso de <i>barcode</i> em espécies utilizando o BLASTN do GenBank e o BOLD (BOLD-IDS) para peixes do Pantanal.....	26
TABELA 2	Distância genética (K2P) dentro de diferentes níveis taxonômicos para 62 espécimes de peixes analisadas.....	27
TABELA 3	Divergências genéticas (K2P) entre os subgrupos da espécie <i>P. cf. argenteus</i> e entre a espécie <i>P. maculatus</i>	29

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP - Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
BOLD - *Sistema de Barcode of Life de dados*
DNA - Ácido desoxirribonucléico
dNTPs - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
dsDNA - DNA fita dupla
mM - Milimolar
MS - Mato Grosso do Sul
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
ng - Nanograma
pb - Pares de bases
pb - Pares de bases
PCR - Reação em cadeia da polimerase
RAPD - Amplificação aleatória de DNA polimórfico
RFLP - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
S - Sul, coordenada geográfica
SNP - Polimorfismo de nucleotídeo único
W - Oeste, coordenada geográfica
μL - Microlitro
μM - Micromolar

RESUMO

Os Siluriformes compreendem um táxon de peixes popularmente conhecidos como bagre, cascudo e peixe gato. É considerada a segunda maior ordem em número de espécies de peixes descritas, sendo distribuída em todos os continentes. No complexo do Pantanal, já foram descritas mais de 269 espécies de peixes, das quais 105 pertencem à ordem dos Siluriformes, o que demonstra sua magnitude como recurso pesqueiro. Portanto, tentando de alguma forma amenizar as barreiras pertinentes aos sistemas taxonômicos clássicos de identificação de ictiofauna, estudos propuseram o uso do gene mitocondrial “Citocromo c Oxidase subunidade I” (COI) como um sistema eficaz na discriminação de espécies. No presente estudo, objetivou-se avaliar aplicabilidade do DNA *barcoding*, na identificação dos Siluriformes pescáveis dos rios da bacia do Paraguai no Pantanal. O DNA foi extraído da nadadeira caudal de 62 espécimes, coletados em três rios da Bacia do rio Paraguai (Paraguai, Aquidauana e Miranda) totalizando 15 espécies, 12 gêneros, cinco famílias. O estudo demonstrou que a classificação prévia das espécies estava em concordância com a identificação molecular em 97% dos casos. O modelo Kimura 2 parâmetros foi utilizado para estimar as distâncias genéticas médias dentro de espécies, congêneres e famílias que foram: 0,2%, 1,6%, 4,2% respectivamente, demonstrando distância genética em função do nível taxonômico. Com base na árvore Neighbor-Joining foram identificados dois possíveis casos de hibridismo, onde os indivíduos apresentaram haplótipos característicos de uma espécie do mesmo gênero. Além disto, verificaram-se conflitos que sugerem um possível caso de especiação.

Palavras-chaves: Identificação de espécies, peixes de água doce, bagres, região neotropical, Pantanal, DNA mitocondrial, COI

ABSTRACT

The Siluriformes comprise a taxon of fish popularly known as catfish, bagre and cascudo. It is considered the second largest order in number of fish species described, being distributed on all continents. In complexo do Pantanal, have already been described more than 269 species of fish, of which 105 are those of Siluriformes, representing its magnitude as a fishing resource. Therefore, trying to somehow alleviate the relevant barriers to classical taxonomic identification systems ichthyofauna, studies have proposed the use of mitochondrial genes "cytochrome c Oxidase subunit I (COI) as an effective system on discrimination of species. In the present study, it was aimed to assess applicability of DNA barcoding, identification of Siluriformes pescáveis of the rivers Paraguay basin in the Pantanal. Thus, the DNA was extracted from the caudal fin of 62 specimens, collected in three rivers Paraguay river basin (Paraguay, Aquidauana and Miranda) totaling 15 species, 12 genera, 5 families. The study showed that the prior classification of the species was in agreement with the molecular identification in 97% of cases. The model Kimura 2 parameter was used to estimate the average genetic distance within species, congeners and families who were: 0.2%, 1.6%, 4.2%, respectively, demonstrating genetic distance depending on the taxonomic level. Based on Neighbor-Joining tree were identified two possible cases of hybridity where individuals presented haplotypes characteristic of a species of the same genus. In addition, there have been conflicts that suggest a possible case of speciation.

keywords: species identification, freshwater fish, catfish, neotropical region, Pantanal, mitochondrial DNA, COI

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Um quantitativo representativo da população do planeta utiliza os recursos biológicos aquáticos vivos, oriundos de rios, lagos, lagoas e águas marinhas como base para sua dieta e alternativa de geração de renda, sendo todas essas condições são decorrentes de atividades pesqueiras dos mais diferenciados modelos.

O continente sul-americano possui uma grande quantidade de água potável distribuída e armazenada por meio de rios, lagos, lagoas, áreas alagadas e lençóis freáticos. É depositário da maior bacia hidrográfica fluvial do mundo (Bacia Amazônica) e uma das maiores planícies alagadas, o Pantanal Matogrossense e Sul - Matogrossense (BRITSKI et al., 2007).

O Brasil, como o país de maior dimensão da América do Sul, detém 15% de toda água doce do planeta, contudo, ainda é inexato e complexo definir e quantificar o número de espécies de animais existentes em biomas continentais aquáticos brasileiros (AGOSTINHO et al., 2005). Já estão descritos, catalogados e validados cerca de 4.475 espécies de peixes (REIS et al., 2003), porém, supõem-se que 30 - 40% dessa diversidade de fauna íctica de água doce Neotropicais ainda não foi classificada (SCHAEFER, 1998; REIS et al., 2003; POVH et al., 2008), o que a torna a ictiofauna relativamente desconhecida.

Dessa forma, um número mais efetivo de espécies de peixes para ecossistemas aquáticos nacionais pode ser especulado em torno de 5.000 podendo atingir um platô de até 8.000 espécies (SCHAEFER, 1998; REIS et al., 2003; POVH, 2008). Entretanto, mesmo o Brasil sendo possuidor de um percentual significativo desses recursos hídricos e uma das maiores diversificações de ictiofauna do mundo, pouco se conhece sobre as espécies existentes em território nacional e suas necessidades para perpetuação.

A perda da diversidade em ecossistemas aquáticos, esta entre as mais graves preocupações de abrangência mundial voltada às questões de conservação de recursos biológicos enfrentadas pelas nações em torno do planeta (MOYLE & LEIDY, 1992). O que demonstra que a maior parte das

reservas naturais de recursos pesqueiros comerciais está em sobreexploração, com uma porcentagem de apreensão acima da capacidade natural de recuperação dos ecossistemas (STREIT JR et al., 2002).

Tuxtill (1998) mensurou que cerca de mais de um terço dos organismos aquáticos vivos encontra-se em risco eminente de extinção devido às modificações nos meios naturais aquáticos, sendo que, a destruição de habitats é apontada como fundamental causa de desaparecimento de peixes dulcícolas em bacias hidrográficas no planeta (DUDGEON et al., 2006; ALVES, 2008). O que evidencia a fragilidade dos mesmos, já que a ausência das espécies de peixes que antes constituíam a fauna íctica é um prenúncio de instabilidade do ambiente aquático (KARR, 1981; CAMARGO et al., 2005).

Nesse sentido, foi iniciada uma corrida contra o tempo para identificar a diversidade real da ictiofauna do Planeta, de maneira mais simplificada e segura, tentando de alguma forma amenizar as barreiras pertinentes aos sistemas taxonômicos clássicos de identificação, que são baseados na morfologia (STEINKE et al., 2009).

Desse modo, com a evolução das técnicas a nível molecular, métodos de mapeamento e identificação de biodiversidade em espécies foram propostos e desenvolvidos empregando o uso de marcadores moleculares. Dentre essas regiões moleculares investigadas, muitos desses marcadores são da região do DNA mitocondrial (DNAMt) e entre os marcadores encontrados do DNAMt, um pequeno fragmento, o citocromo *c* oxidase subunidade I (*COI*) tem sido utilizado como sistema de identificação global para as espécies animais a nível molecular (PAUL et al., 2003; DASMAHAPATRA & MALLET, 2006; AQUILINO et al., 2011).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ÁREA DE ESTUDO

O Pantanal é declarado Patrimônio Nacional pela Constituição Federal de 1988 que rege o País (BRASIL, 1988; CALHEIROS & OLIVEIRA, 2011) e Patrimônio Mundial Natural pelas Nações Unidas (BRITSKI et al., 2007). A região denominada Pantanal Matogrossense e Sul-Matogrossense possui aproximadamente uma área calculada em torno de 140.000 km² (HARRIS et al., 2005), tornando-a a maior planície aluvial inundável continental do planeta (SILVA & ABDON, 1998) e o menor bioma em extensão em território brasileiro (GIRARDI & ROSSETTO, 2011).

Localizado na região Central do Continente Sul Americano, o Pantanal (Figura 1) ocupa área no Brasil, Bolívia e Paraguai, situando entre as coordenadas de 16° a 22° de latitude sul e os meridianos de 55° a 58° de longitude oeste (BRITSKI et al., 2007). Este bioma caracteriza-se por clima definido como tropical úmido, onde a pluviosidade de 1100 mm/ano é ultrapassada pela evaporação média que é de 1400 mm/ano (SUGANUMA, 2008), o período das águas é concentrado nos poucos meses de outubro a abril e a estiagem é bem delineada nos meses de maio a setembro.

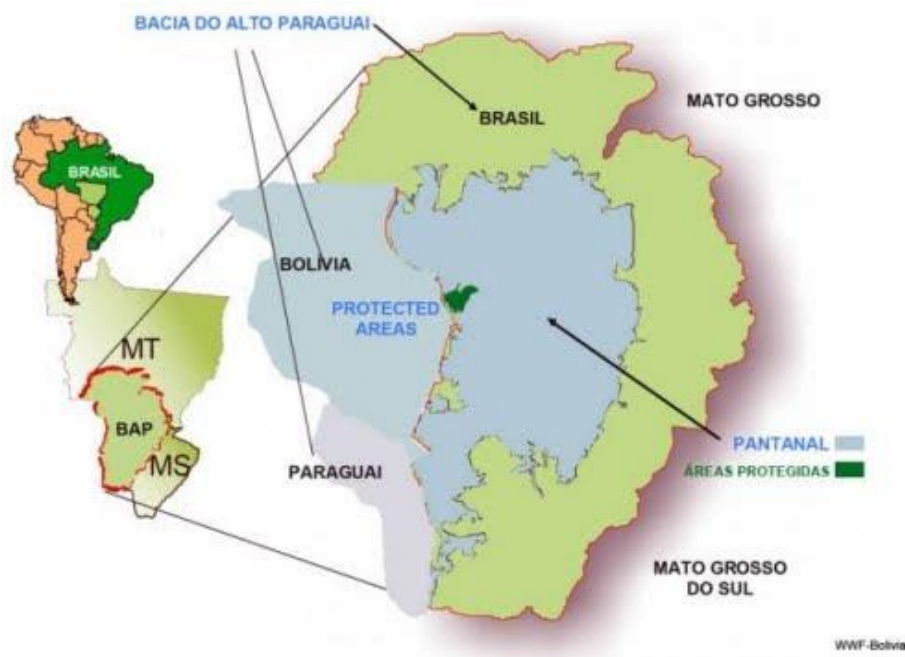


Figura 1. Mapa da Bacia do Paraguai, abrangendo partes dos estados do MT e MS no Brasil e os países Bolívia e Paraguai. Mapa disponibilizado no sítio <http://pantanalcoltec.blogspot.com.br>.

Do ponto geológico é um exemplo claro de uma bacia tectônica com aspectos de bacia sedimentar intracratônica circundada por planalto cristalino, que constitui a área fornecedora de água e sedimentos da região (GODOI - FILHO, 1986; BRITSKI et al., 2007). Já o solo do Pantanal é em quase toda sua plenitude hidromórficos, reproduzindo bem a deficiência de drenagem, assim, sua alta tendência a inundações prolongadas. A litologia é formada por sedimentos aluviais drenados por meio de carreamentos que associados à dinâmica do regime de alagamento, determinam a variação dos solos do Pantanal (ORIOLI et al., 1982; BRITSKI et al., 2007).

Economicamente, o Pantanal tem como principal atividade para geração de renda a produção de bovinos, seguido da pesca profissional, esportiva (VIEIRA, 2001), o turismo, a agricultura e a exploração de minério são outras atividades geradoras de renda para região.

A bacia do Alto do Paraguai no Brasil exhibe três unidades fisiográficas bem diferenciadas: a região alta (planaltos), uma região baixa e plana (pantanal) e as depressões (ALVARENGA et al., 1984; OLIVEIRA & FERREIRA, 2003). Seus principais afluentes em terras do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, são os rios Jauru, Cuiabá, São Lourenço, Piquiri, Taquari, Negro, Miranda e Apa (BRITSKI et al., 2007). Estes rios são de extrema importância para cada região, uma vez que definem paisagens diferenciadas (GUARIM NETO et al., 2008).

A bacia hidrográfica do rio Miranda tem uma área física de 44.740,50 km², envolvendo o território de 23 municípios o que representa 12% de área física do Estado de Mato Grosso do Sul (PEREIRA et al., 2004) quando somado com área de drenagem atribuída juntamente com o rio Aquidauana passa a ter um total de 47.000 km² (CARVALHO, 1984; OLIVEIRA & FERREIRA, 2003). O que os torna, dois importantes rios para região do estado do Mato Grosso do Sul, por serem rios que nascem e morrem dentro dos limites do estado.

2.2 SILURIFORMES

2.2.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS

Siluriformes compreendem um táxon de peixes caracterizados principalmente pela ausência de escamas. Essa ordem é representada principalmente por indivíduos de água doce, constituindo a sexta maior ordem entre os vertebrados (CUNHA, 2008), com mais de 3088 espécies, representando 10% de todas as espécies de peixe do planeta (FERRARIS, 2007).

Na região Neotropical esta ordem é considerada a segunda maior em número de espécies descritas, agrupando aproximadamente 1700 espécies de peixes (LUNDBERG et al., 2002; FERRARIS, 2007; SULLIVAN et al., 2013) com 36 famílias, 478 gêneros (FERRARIS, 2007; CRAMER et al., 2007). Entretanto, nas bacias hidrográficas da América do Sul foram encontradas até o presente momento, apenas 14 famílias (MOYLE & CECH, 2000; CRAMER et al., 2007; SULLIVAN et al., 2013).

Essa ordem é conhecida popularmente no Brasil como bagre, cascudo (ANZA, 2006) e peixe gato. Colonizaram praticamente todos os tipos de habitats aquáticos de água doce, desde os superficiais aos subterrâneos (CUNHA, 2008), sendo distribuída em todos os continentes incluindo a Antártica por indivíduos fossilizados do gênero *Hypsidoris* (FERRARIS, 2007).

Os peixes Siluriformes do ponto de vista morfológico são rapidamente identificados por suas características marcantes (Figura 2). São peixes de corpo nu, com total ausência de escamas e revestido por uma pele espessa ou coberto placas ósseas. É comum possuírem três pares de barbilhões, sendo que o primeiro raio dorsal e das peitorais transformado em acúleo pungente, salvo algumas exceções do grupo, na maioria da classe a nadadeira adiposa encontra-se presente e geralmente é bem longa e bem característica (BRITSKI et al., 2007).



Figura 2. Exemplo da ordem dos Siluriformes. Figura retirada do livro de BRITSKI et al., (2007).

Diferenciam-se da maioria dos peixes de água doce por apresentarem hábitos crepuscular e noturno (CUNHA, 2008), localizam-se geralmente entre a vegetação e as rochas ou algum tipo de esconderijo, contudo, um grande número de exemplares podem também ser ativo durante o dia, especialmente em águas turvas (BRITSKI et al., 2007).

O comportamento alimentar dessa ordem é bastante peculiar, geralmente os indivíduos possuem hábito onívoro, todavia, alguns grupos podem ser herbívoros, planctófagos e carnívoros (RODRIGUES, 2010). Nas águas do complexo do Pantanal, de acordo com Britski et al. (2007), já foram descritas mais de 269 espécies de peixes dos quais 105 pertencem a ordem do Siluriformes. No entanto, pressupõem que ao longo dos anos, esteja ocorrendo um decréscimo contínuo das populações locais desses bagres no Pantanal, consequência que foi desencadeada principalmente pelas atividades antrópicas, tais como a destruição dos ecossistemas, a sobreexploração, a introdução de espécies exóticas, a poluição, etc. Além disso, algumas das espécies que constituem os Siluriformes conseguem alcançar um alto valor comercial em suas regiões, sobretudo, por demonstrarem predados que agradam a população consumidora como: tamanho, peso, qualidade de carne e sabor agradável.

Dessa forma, o declínio da heterogeneidade biológica aquática não deve ser preocupante somente pela queda do número de indivíduos capturados de uma espécie, mas, primeiramente pela perda de sua variabilidade populacional (HILSDORF, 1997; SANCHES, 2007; NUNES, 2010). Sobretudo, porque

muitas das espécies Neotropicais já foram extintas em bacias hidrográficas sem se quer ter sido descritas e estudadas.

2.3. A IMPORTÂNCIA DA DIVERSIFICAÇÃO GENÉTICA

A heterogeneidade genética dos recursos aquáticos pode ser explanada como a totalidade da diversidade de espécies e pela variabilidade genética dentro e entre espécies, sendo um componente relevante da biodiversidade (HILSDORF et al., 2006). Sendo assim, torna fundamental para sobrevivência dos organismos, a médio e longo prazo, que a heterogeneidade genética permaneça aos processos de transformação evolutivas e ambientais.

A variabilidade herdável de características adaptativas confere aos organismos uma flexibilidade fenotípica capacitando-as a mudanças ambientais, como a inclusão de um predador, uma inesperada proliferação de patógenos, poluentes, etc (BENITES, 2008; SOUZA, 2012).

As variações gênicas são introduzidas nas populações pelo episódio de mutações, ou como consequência do fluxo gênico composto pelo cruzamento entre indivíduos nativos ou imigrantes geneticamente diferentes (BENITES, 2008). Nesse contexto, a variabilidade genética da população é mensurada pelo número de alelos (variante genética) e heterozigosidade (JUANES et al., 2007; PIORSKI et al., 2008), ou seja, por sua determinação de diversidade alélica. No entanto, a variabilidade genética é perdida em contrapartida por processos de deriva genética, onde afeta também a diversidade gênica e não atua para produzir adaptações para condições ambientais atuais que a espécie encontra-se. Além disso, mecanismos naturais e fisiológicos também contribuem para processos de diferenciação genética e isolamento porque atuam de forma correlacionada.

Em grupamentos de algumas espécies de peixes migradores de grande porte, onde geralmente suas diferentes populações que constituem uma mesma espécie podem ocupar e explorar os recursos de um determinado rio acredita-se que elas devam segregar durante o período reprodutivo, mantendo assim sua estruturação genética (GALETTI JR et al., 2008).

Atualmente, existe uma limitação sobre o conhecimento da estrutura genética de peixes de água doce do Brasil (MOLINA et al., 2008). Como as

populações de peixes estão geneticamente organizadas ao percurso de uma rede hidrográfica é uma incógnita, mesmo nas bacias hidrográficas mais importantes do país destacando poucos estudos (HUBERT et al., 2007; FARIAS & HRBEK, 2008; ARDURA et al., 2010; CARVALHO et al., 2011; PEREIRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2013; FRANTINE-SILVA et al., 2015).

Contudo, o entendimento de estrutura genética é de extrema relevância para desenvolvimento e implantação de qualquer modelo de programa de conservação de recursos pesqueiros. Estudos que envolvem mesuração da variabilidade de ictiofauna, demonstraram o perigo que vivenciamos atualmente, já que em pequenas populações fundadoras rapidamente perderam-se alelos mais raros (ALLENDORF, 1986; LEBERG, 1991; VRIJENHOEK, 1998).

De acordo com BALLOUX & LUGON-MOULIN (2002); LAIKRE et al. (2005); ORREGO (2012) as espécies de peixes não são geneticamente homogêneas, mas estruturadas em grupos de indivíduos geneticamente semelhantes, estando o grau de isolamento diretamente relacionado à dispersão de indivíduos entre estes grupos.

Segundo Andrade (2010) para o surgimento de uma nova espécie é necessário um processo que provoque modificações do genoma de uma população, que são ocasionados pela ação de mutação, recombinação genética e seleção. Essas alterações acumuladas gradualmente podem levar a uma condição que já não permita o cruzamento entre indivíduos dessas populações, desta forma, obtêm-se duas espécies distintas, por isolamento reprodutivo. Uma vez formada a nova espécie, a divergência entre ela e a espécie ancestral torna-se praticamente irreversível e cada vez mais acentuada.

Apesar de se conhecer os processos que são responsáveis pela formação de uma nova espécie, o que realmente têm provocado essa vasta diferenciação entre espécies de peixes atuais na região Neotropical ainda é incerto e tão complexo de ser definido que continua a questão ser um desafio (Montoya-Burgos, 2003).

2.4. DNA *BARCODING*

Com os avanços tecnológicos observados no campo da investigação científica é cada vez mais comum a utilização de metodologias que empreguem marcadores moleculares de vários tipos (*RFLP*, *RAPD*, *AFLP*, microssatélites, *SNP* e *DNAmt*) para pesquisas, com intuito de ajudar a solucionar dúvidas interligadas as mais diversas questões da natureza, inclusive a temas controversos sobre conservação de recursos como: taxonomia de grupos ameaçados, para concepção e monitoramento de programas em cativeiro; gestão de fluxo gênico, detectando a estrutura geográfica da diversidade genética (VRIJENHOEK, 1998); estrutura genética populacional em grupamentos de espécies de peixes migratórios (HATANAKA et al., 2006; MOLINA et al., 2008), alelos raros e identificação de novas espécies.

Dentre os marcadores moleculares em vertebrados o *DNAmt* têm sido amplamente utilizado nas últimas três décadas como uma ferramenta para inferir o passado evolutivo e demográfico de populações e espécies animais (BALLARD & WHITLOCK, 2004). Em torno de 70% dos estudos genéticos, empregam o *DNAmt* como ferramenta de análise (AVISE, 2000; SCHNEIDER, 2007), destacando sua importância no cenário científico, sendo que, os primeiros genomas mitocôndrias sequenciados de seres vivos foram do homem, do camundongo e do bovino (AVISE & ELLIS, 1986).

O DNA mitocondrial dos vertebrados, apresenta em média 37 genes, sendo 13 codificadores de subunidades proteicas, dois RNAs ribossômicos (12S e 16S rRNA), e 22 RNAs transportadores (tRNAs) necessários para a tradução de proteínas codificadas pelo *DNAmt* (BOORE, 1999).

A mitocôndria é uma pequena molécula circular encontrada em células eucarióticas, que possui múltiplas propriedades que a tornam uma importante ferramenta molecular para estudos; possui genoma próprio e pequeno (15 a 20 kb) em relação ao genoma nuclear, uma estrutura de organização simples, com taxa evolutiva de substituição de nucleotídeos de 5 - 10 vezes mais rápida que o aferido para o genoma nuclear (BROWN et al., 1979; BROWN et al., 1982), ausência de recombinação (BALLARD & WHITLOCK, 2004), sequências espaçadoras, ausência de íntrons, DNA repetitivo e pseudogenes (AVISE &

ELLIS, 1986). Além disso, apresenta predominante herança uniparental materna (BROWN et al., 1979), ou seja, as mutações acumuladas não são dispersas por ocorrência de recombinação (AVISE et al., 1987).

Estes aspectos fazem com que o haplótipo mitocondrial possa contribuir para delinear uma genealogia, uma filogeografia ou até mesmo uma filogenia de herança uniparental materna de organismos estreitamente correlacionados, o que muitas das vezes pode auxiliar a compreender o modelo de dispersão de muitos organismos vivos incluindo os aquáticos (AVISE, 1994; BALLARD & WHITLOCK, 2004; SCHNEIDER, 2007). Exemplificando, DERGAM et al. (2002), usaram sequências da região 16S do DNAm t para exemplificar os processos evolutivos sofridos pela espécie de peixe *Hoplias malabaricus* vulgarmente conhecida como traíra, além de relatar sobre a história filogeográfica da bacia hidrográfica do rio Doce no estado de Minas Gerais no Brasil e suas adjacentes.

Pesquisas de hipóteses evolutivas são muitas vezes focadas em regiões mitocondriais de genes que são codificadores ribossômicos (12S e 16S), contudo, sua utilização em análises taxonômicas é restringida pelo predomínio de inserções e deleções (*indels*) que dificulta muito o alinhamento de sequências (DOYLE & GAUT 2000; PAUL et al., 2003).

Nesse cenário, vem se tornando frequente a concentração de estudos relacionados a temas filogenéticos em um gene específico do DNAm t, o citocromo c oxidase subunidade I (*COI*) (PAUL et al., 2003), responsável por codificar parte de uma enzima terminal da cadeia respiratória da mitocôndria. O sequenciamento desta região permite a distinção e identificação de diversas espécies de animais funcionando como um código de barras (AVISE et al., 1987; SIMON et al., 2006; BROWNE et al., 2007).

O primeiro estudo realizado com a metodologia de DNA *barcoding* para grupos de espécies próximas teve grande êxito de resolução de incertezas taxonômicas (acima de 98%) de discriminação (HEBERT et al., 2003). Posteriormente, outros trabalhos surgiram demonstrando a eficácia do emprego da metodologia *barcoding* na discriminação de animais, como na classe Arachnida onde se obteve 100% de distinção das espécies (BARRETT et al., 2005).

Em virtudes desses resultados, uma iniciativa internacional constituída por centenas de pesquisadores ligados à identificação e conservação da biodiversidade mundial (Consortium for the Barcode of Life - CBOL) está se dedicando ao desenvolvimento da ferramenta do DNA *barcoding* como um padrão global para a identificação de espécies biológicas, além da criação de um banco de dados do gene *COI* para identificação de espécies a nível mundial (<http://www.barcodeoflife.org>).

Em relação a trabalhos com espécies de peixes já descritos, tanto marinhos como de água doce, foi realizado um grande projeto, empregando a metodologia de DNA *barcoding* chamado *Fish barcode of Life*, que obteve como resultado a separação de cerca de 98% e 93%, respectivamente das espécies de peixes estudadas (WARD et al., 2009), reafirmando assim, a eficácia da ferramenta do barcode em pesquisas de identificação de espécies, bem como, a capacidade de sugerir novos processos de especiação em organismos aquáticos. Como nos trabalhos realizados no Brasil de Carvalho et al. (2011) que conseguiram na bacia do rio São Francisco, identificar novas espécies e demonstrar um processo de expansão de área por uma espécie e Pereira et al. (2013) que obtiveram êxito discriminando 99,2% das 254 espécies de peixes estudadas na bacia do rio Paraná e revelaram ainda 14 fortes candidatos a novas espécies.

No entanto, mesmo o Brasil sendo o país com uma das maiores diversificações de ictiofauna de água doce de todo o mundo, o número de trabalhos sobre os processos evolutivos que suscitaram essa imensa diversidade ainda são escassos. Dessa forma, entender e descrever os padrões que ocasionaram esta imensa diversidade é importante, assim, a metodologia *barcoding*, pode ser uma das ferramentas utilizadas para início desse entendimento.

Dado o exposto, para avaliar os impactos atuais sofridos nos estoques de espécies de peixes Siluriformes pescáveis no Pantanal, no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, é de fundamental importância que seja possível à identificação de espécies molecularmente, o que já é evidenciado com o emprego da metodologia *barcoding* em outros ecossistemas. O que acarretaria geração de conhecimento, investigações mais acuradas e possíveis iniciativas de conservação da área.

3. OBJETIVO GERAL

O projeto teve por objetivo identificar geneticamente a diversidade de peixes Siluriformes pescáveis pertencentes à bacia do Paraguai com base em informações moleculares do segmento “Citocromo c Oxidase subunidade I” (*COI*) do gene mitocondrial.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Sequenciar segmentos parciais do gene mitocondrial *COI* para as 15 espécies de peixes da ordem Siluriformes presentes em rios do Pantanal Sul Matogrossense;
- b) Determinar a distância genética entre os grupos e entre os rios estudados;
- c) Avaliar a capacidade das sequências do gene *COI* em discriminar as diferentes espécies presentes nessas bacias hidrográficas;
- d) Analisar a utilização das sequências do *COI* sobre a capacidade de inferir relações filogenéticas entre as espécies estudadas;
- e) Revelar possíveis casos de espécies crípticas na região do Pantanal.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 70-78, n.1, 2005.

ALLENDORF, F. W. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. **Zoo Biology**, v. 5, p.181-190, 1986.

ALVARENGA, S. M.; BRASIL, A. E.; PINHEIRO, R.; KUX, H. J. H. **Estudos geomorfológicos aplicados à Bacia do Alto Paraguai e Pantanaís Matogrossenses**. In: BRASIL. Ministério das Minas e Energia. Projeto RADAMBRASIL. Salvador, 1984.

ALVES, C. B. M.; LEAL, C. G.; BRITO, M. F. G.; SANTOS, A. C.A. Biodiversidade e conservação de peixes do Complexo do Espinhaço. **Megadiversidade**, v. 4, p. 177-196, 2008.

ANDRADE, E. M. B. **Especiação sem barreiras e padrões de diversidade**. 2010. 82f. Tese (Doutorado) - Instituto de Física “Gleb Wataghin”, Universidade Estadual de Campinas, 2010.

ANZA, A. A. **Revisão das espécies do gênero *rhamdia* (Siluriformes: Heptapteridae) de drenagens costeiras do sul e sudeste do Brasil, um exemplo de diversidade subestimada do gênero**. 2007. 148f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

AQUILINO, S. V.; Tango, J. M.; Fontanilla, I. K.; Pagulayan, R. C.; Basiao, Z. U.; Ong, P. S.; Quilang, J. P. DNA *barcoding* of the ichthyofauna of Taal Lake, Philippines. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 612-619, 2011.

ARDURA, A.; LINDE, A. R.; MOREIRA, J. C.; VAZQUEZ, E. G. DNA *barcoding* for conservation and management of Amazonian commercial fish. **Biological Conservation**, v. 143, p. 1438-1443, 2010.

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of ecology and systematics**, p. 489-522, 1987.

AVISE J. C. & ELLIS D. Mitochondrial DNA and the Evolutionary Genetics of Higher Animals and Discussion. **The Evolution of DNA Sequences**, v. 312, p. 325-342, 1986.

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. Chapman & Hall, New York, USA, 1994. 511 p.

AVISE, J. C. **Phylogeography: The history and formation of species**. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, 2000. 1447p.

BALLARD, J. W. O.; WHITLOCK, M. C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 729-744, 2004.

BALLOUX, F. & LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 155-165, 2002.

BARRETT, R. D. H. & HEBERT, P. D. N. Identifying spiders through DNA *barcoding*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 83, p. 481-489, 2005.

BENITES, C. **Caracterização genética do pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) da Bacia hidrográfica Paraná Paraguai, por marcadores moleculares tipo microssatélite**. 2008. 190f. Tese (Doutorado) - Centro de Aquicultura - CAUNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

BOORE, J. L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 1767-1780, 1999.

BRASIL. **Constituição da República Federativa do Brasil**. 1988. Disponível em <http://www.senado.gov.br/sf/legislacao/const/Acesso> em 02 de Março de 2014.

BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.S.; LOPES, B.S. **Peixes do Pantanal: Manual de Identificação**. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica, 2007.

BROWN, W. M; GEORGE, M; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, p. 1967-1971, 1979.

BROWN, W. M; PRAGER, E. M; WANG, A. and WILSON, A.C. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. **Journal of Molecular Evolution**, v. 18, p. 225-239, 1982.

BROWNE, W. E.; HADDOCK, S. H. D.; MARTINDALE M. Q. Phylogenetic analysis of lineage relationships among hyperiid amphipods as revealed by examination of the mitochondrial gene, cytochrome oxidase I (COI). **Integrative and Comparative Biology**, v. 47, p. 815-830, 2007.

CALHEIROS, D. F.; OLIVEIRA, M. D. O rio Paraguai e sua planície de inundação: o Pantanal Mato-Grossense. **Revista Ciência & Ambiente**, v. 41, p. 113-130, 2011.

CAMARGO, M.; GIARRIZO T.; CARVALHO-JUNIOR, J. Levantamento Ecológico Rápido da Fauna Ictica de Tributários do Médio-baixo Tapajós e Curuá. **Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi**, v. 1, n. 1, p. 238-247, 2005.

CARVALHO D. C.; OLIVEIRA D. A. A.; POMPEU P. S.; LEAL C. G.; OLIVEIRA C.; HANNER R. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River Basin., **Mitochondrial DNA**, v. 22, p. 80-86, 2011.

CARVALHO, N. O. **Hidrologia da bacia do Alto Paraguai**. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL, 1984, Corumbá. Anais. Brasília: EMBRAPA-DDT, 1986. p. 43-49. (EMBRAPA-CPAP. Documentos, 5).

CRAMER, C. A.; LIEDKE, A. M. R.; BORNATTO, S. L.; REIS, R. E. The phylogenetic relationships of the Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae) as inferred from mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences. **Bulletin of Fish Biology**, v. 9, p. 51-59, 2007.

CUNHA, J. M. F. L. **Biodiversidade e sistemática molecular dephreatobiidae (ostariophysi, Siluriformes) – com uma proposta sobre sua posição filogenética em Siluriformes e uma discussão sobre a evolução do hábito subterrâneo**. 2008. 33f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências Universidade de São Paulo USP, 2008.

DANZMANN, R. G.; IHSEN, P. E.; HERBERT, P. D. N. Genetic discrimination of wild and hatchery populations of brook char, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), in Ontario using mitochondrial DNA analysis. **Journal of Fish Biology**, v. 39, p. 69-77, 1991.

Dasmahapatra, K. K.; Mallet, J. DNA barcodes: recent successes and future prospects. **Heredity**, v. 97, p.254-255, 2006.

DERGAM, J. A.; PAIVA, S. R.; SCHAEFFER, C. E.; GODINHO, A. L.; VIEIRA, F. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 379-387, 2002.

DUDGEON, D. A. H.; ARTHINGTON, M. O.; GESSNER, Z.; KAWABATA, D. J.; KNOWLER, C.; LÉVÊQUE, R. J.; NAIMAN, A.; PRIEUR-RICHARD, D.; SOTO, M. L. J.; STIASSNY, C. A.; SULLIVAN, J. P. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biological Review**, v. 81, p.163-182, 2006.

DOYLE, J. J. & Gaut, B. S. Evolution of genes and taxa: a primer. **Plant Molecular Evolution**, v. 42, p. 1-23, 2000.

FARIAS, I. P. & HRBEK, T. Patterns of diversification in discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichlidae) of the Amazon basin. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, p. 32-43, 2008.

FERRARIS, C. J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, v. 1428, p. 1-628, 2007.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **A primer of Conservation Genetics**. Cambridge University Press: Cambridge UK, 2004. 220p.

GALETTI JR, P. M.; RODRIGUES, F. P.; SOLE-CAVA, A. M.; MIYAKI, C. Y.; CARVALHO, D.; EIZIRIK, E.; VEASEY, E.; SANTOS, F. R.; FREITAS, T. R. O.; HRBEK, T.;MOLINA, W. **Genética da conservação na biodiversidade brasileira**. In: FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. (Org.).

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. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, 2015.

Fundamentos de Genética da Conservação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, v. 1, 2008. 199-229p.

GIRARDI, E. P.; ROSSETTO, O. C. Análise da pecuária no Pantanal mato-grossense. **Revista Geográfica de América Central (online)**, v. 2, p. 1-16, 2011.

GODOI-FILHO, J. D. de. **Aspectos geológicos do Pantanal Mato – Grossense e de sua área de influencia** In: Simpósio sobre recursos Naturais e Sócio - Econômicos do Pantanal, v. 1, p.63-76, 1986.

GUARIM NETO, G.; GUARIM, V. L. M. S.; MACEDO, M.; NASCIMENTO, N. P. O. Flora, vegetação e etnobotânica: conservação de recursos vegetais no pantanal. **Gaia Scientia (UFPB)**, v. 2, p. 41-46, 2008.

HARRIS, M. B.; TOMAS, W.; MOURAO, G.; DA SILVA, C. J.; GUIMARAES, E.; SONODA, F.; FACHIM, E. Safeguarding the Pantanal wetlands: threats and conservation initiatives. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 714-720, 2005.

HATANAKA T.; HENRIQUE-SILVA F.; GALETTI Jr P. M. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. **Genetica**, v. 126, p. 153-159, 2006.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DE WAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, p. 313-322. 2003.

HILSDORF, A. W. S. **Biologia Molecular: Uma realidade para a Aqüicultura.** Panorama da Aqüicultura (janeiro/fevereiro). p. 10-12, 1997.

HILSDORF, A. W. S.; RESENDE, E. K.; MARQUES, D.K. S. **Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas.** Documentos - Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006.

HUBERT, N.; DUPONCHELLE, F.; NUÑEZ-RIVERA, J. R.; BONHOMME, F AND RENNO, J. N. Isolation by distance and Pleistocene expansion of the lowland populations of the White piranha *Serrasalmus rhombeus*. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 2488-2503, 2007.

JUANES, F.; PEREZ, J.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Estratégias reprodutivas em populações pequenas: usando salmão do Atlântico como um caso de estudo. **Ecology Freshw Peixe**, v. 16, n. 4, p. 468-475, 2007.

KARR, J. R. Assessment of biotic integrity using fish communities. **Fisheries**, v. 6, p. 21-27, 1981.

LAIKRE, L.; PALM, S.; RYMAN, N. Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. **A Journal of the Human Environment**, v. 34(2), p. 111-119, 2005.

LEBERG, P. L. Effects of genetic variation on the growth of fish populations: Conservation Implications. **Journal of Fish Biology**, v. 37(Suppl. A), p. 193-195, 1991.

LUNDBERG, J. G. & PARISI, B. M. *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 of Philadelphia**, v. 152, p.75-88. 2002.

MOLINA, W. F.; SHIBATTA, O.; GALETTI Jr, P. M. Chromosomal evidence of population subdivision in the freshwater fish *Leporinus elongatus* in the Upper Paraná River basin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 270-274, 2008.

MONTOYA, J. I. B. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 1855-1867, 2003.

MOYLE, P. B.; LEIDY, R. A. **Loss of biodiversity in aquatic ecosystems: evidence from fish faunas**. In: FIELDER, P.L., JAIN, S.K. (eds.). *Conservation Biology: The Theory and Practice of Nature Conservation, Preservation, and Management*, New York: Chapman and Hall, 1992. 127-169 p.

NUNES, A. G. **Variação genética em *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1849) na região do Alto Rio São Francisco, MG e contribuições para a conservação do grupo**. 2010. 56f. Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Carlo UFSCar, 2010.

OLIVEIRA, M. D.; FERREIRA, C. J. **Estudos Limnológicos para o Monitoramento da Bacia Hidrográfica do Rio Miranda, Pantanal Sul**. Documentos – Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003.

ORIOLI, A. L.; AMARAL FILHO, Z. P.; OLIVEIRA A. B. **Levantamento exploratório de solos**. In: BRASIL. Ministério das Minas e Energia. Rio de Janeiro, 1982.

ORREGO, L. E. O. **Análise filogeográfica de *Brachyplatystoma platynemum* (Siluriformes: Pimelodidae)**. 2012. 89f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Unesp, 2012.

PAUL, D. N. H.; ALINA, C.; SHELLEY L. B.; JEREMY R. W. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, p. 313-321, 2003.

PEREIRA L. H. G; PAZIAN M. F; HANNER R, FORESTI F, OLIVEIRA C. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. **Mitochondrial DNA**, v. 21, p. 1-9, 2011.

PEREIRA, H. G. L.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. CAN DNA *barcoding* accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna. **BMC Genetics**, v. 14, p. 1-14, 2013.

PEREIRA, M. C. B.; MENDES, C. A. B.; GREHS, S. A.; BARRETO, S. R.; BECKER, M.; LANGE, M. B. R.; DIAS, F. A. **Bacia hidrográfica do rio Miranda: estado da arte**. Editora UCDB, Impresso no Brasil, v. 1, 2004.

PIORSKI, N. M.; SANCHES, A.; COSTA, L. F. C.; HATANAKA, T.; AVILA, M. C.; FREITAS, P. D.; GALETTI JUNIOR, P. M. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 1039-1050, 2008.

POVH, J. A.; LOPERA BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; LUPCHINSKI JUNIOR, E.; GOMES, P. C.; LOPES, T. S. Importancia del monitoreo genético de programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 35, p. 25-35, 2008.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARI, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Brasil. Editora EDPU CRS, 2003. 729p.

RODRIGUES, R. M. **Estudos cromossômicos e moleculares em Loricariinae com ênfase em espécies de Rineloricaria (Siluriformes, Loricariidae): uma perspectiva evolutiva**. 2010. 181f. Universidade de São Paulo USP, 2010.

MOYLE, P. B. & CECH, J. J. **Fishes: an introduction to ichthyology** (p. 726). Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, 2004.

SANCHES, A. **Estrutura genética populacional de *Brycon hilarii* (Characidae) da sub-bacia do Rio Miranda, e seu significado para programas de conservação**. 2007. 113f. Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Carlo UFSCar, 2007.

SCHAEFER, S. A. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre. Editora EDIPUCRS, 1998. 375-400p.

SCHNEIDER, C. H. **Análise da variabilidade genética do peixe ornamental *Carnegiella strigata* (Characiformes, Gasteropelecidae) de três rios de água preta da Amazônia Central**. 2001. 72f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2001.

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

SILVA, J. S. V.; ABDON, M. M. Delimitação do Pantanal Brasileiro e suas sub-regiões. **Pesquisa Brasileira Agropecuária**, v. 33, p. 1703-1711, 1998.

SIMON C.; BUCKLEY, T. R.; FRATI, F.; STEWART, J. B.; BECKENBACH, A. T. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new

compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. **Annual review of ecology and systematics**, v. 37, p. 545-79, 2006.

SOLÉ-CAVA, A. M. **Biodiversidade molecular e genética da conservação**. In: MATIOLI, S.R. (ed.). *Biologia Molecular e Evolução*, Ribeirão Preto: Holos Editora, 2001, 172-192p.

SOUZA, C. A. **Desenvolvimento e identificação de microssatélites para pirarara - *Phractocephalus hemiliopterus* (Siluriformes, Pimelodidae): para análise de variabilidade genética**. 2012. 61f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, 2012.

STREIT JR, D. P.; MORAES, J. V.; RIBEIRO, R. P.; CARDOZO, R. M.; HÉDEN, L. M. M. As tendências da utilização do extrato bruto de hipófise na reprodução de peixes-Revisão. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v. 5, n. 2, p. 231-238, 2002.

SUGANUMA, C. H. **Avaliação da Diversidade Genética de Populações de Pacu do Pantanal Mato-Grossense com o Uso de Marcadores do Tipo Microssatélites**. 2008. 105f. Tese (Doutorado) - Centro de Aquicultura - CAUNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

SULLIVAN, J. P.; MURIEL-CUNHA, J.; LUNDBERG, J. G. Phylogenetic relationships and molecular dating of the major groups of catfishes the Neotropical superfamily Pimelodoidea (Teleostei, Siluriformes). **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 162, p. 89-110, 2013.

TUXTILL, J. Losing strands in the web of life: vertebrates declines and the conservation of biological diversity. **World Watch Paper**, n. 141, p. 88, 1998.

VIEIRA, L. M. **Pantanal: um bioma ameaçado**. Corumbá: Embrapa Pantanal. Disponível em <http://www.cpap.embrapa.br/info.cnptia.embrapa.br/56456>. Acesso em 02 de março de 2014.

VRIJENHOEK, R. C. Conservation genetics of freshwater fish. **Journal of Fish Biology**, v. 53 (Supplement A) p. 394-412, 1998.

WARD, R. D.; HANNER, R.; HEBERT, P. D. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of fish biology**, v. 74, n. 2, p. 329-356, 2009.

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 Science**, v. 360, n. 1462, p. 1847-1857, 2005.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

**CAPÍTULO 2 – Identificação molecular e análise filogenética de
Siluriformes pertencentes à bacia do Paraguai, Brasil (MOLECULAR
ECOLOGY RESOURCES)**

Identificação molecular e análise filogenética de Siluriformes pertencentes à bacia do Paraguai, Brasil

Autores: T. P. C. LIMA.¹ A. A. do EGITO.² G. L. D. FEIJÓ.² R. de A. MAURO.² A. L. J. FERRAZ.³

Filiação:

¹ Aluno do programa de Pós - graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brasil

² Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil

³ Professor do programa de Pós - graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brasil

Corresponding author: A. L. J. FERRAZ & T. P. C. LIMA

E-mail: splinter@uems.br

thallescarvalho02@hotmail.com

RESUMO

O Pantanal sofre um ritmo acelerado de degradação dos ecossistemas, onde os recursos pesqueiros são fortemente afetados. Entretanto, mensurar o real número de espécies que vivem nesse habitat é uma tarefa árdua e complexa. Assim, estudos têm proposto o uso do gene mitocondrial “Citocromo Oxidase subunidade I” (*COI*) como sistema global e eficaz na discriminação de espécies, pois a sequência desse gene funcionaria como código de barras. O objetivo do trabalho foi identificar pela técnica de DNA *barcode* os Siluriformes pescáveis coletados na bacia do Paraguai no Pantanal. O DNA foi extraído da nadadeira caudal de 62 espécimes. As sequências geradas do gene *COI* foram utilizadas para identificação molecular e corresponderam em 96,77% com a identificação prévia das espécies, totalizando 15 espécies, 12 gêneros e cinco famílias. As distâncias genéticas médias dentro de espécies, congêneres e famílias foram estimadas pelo modelo de Kimura 2 Parâmetros sendo de 0,2%, 1,6% e 4,2% respectivamente. Estes valores foram inferiores ao relatado em outros estudos provavelmente pelo processo de radiação recente sofrido por espécies de peixes Neotropicais. A análise Neighbor-Joining apresentou dois possíveis casos de hibridismo, sendo um indivíduo de *P. corruscans* e o outro de *P. cf. argenteus*. Os resultados observados demonstram a eficácia do DNA *barcode* na identificação da ictiofauna Neotropical da região do Pantanal e servirão de base para futuras investigações relacionadas ao hibridismo e casos de especiação.

Palavras-chave: peixes de água doce, Pantanal, DNA mitocondrial, região neotropical, *COI*, bagres

Introdução

Nos últimos 40 anos as populações de vertebrados do planeta foram reduzidas a metade se comparadas com as que ocorriam na década de 70, sendo que, a maior redução ocorreu em ecossistemas de água doce, por volta de 76% (McLellan *et al.* 2014), e acredita-se que muitas espécies foram extintas sem sequer terem sido descritas.

Na região Neotropical observa-se cerca de 20 a 25% das espécies de água doce já descritas, sendo esta a mais rica ictiofauna do mundo (Reis *et al.* 2003; Pereira *et al.* 2013). Supõem-se, contudo, que 30 a 40% dessa diversidade ainda não foi classificada (Schaefer 1998; Reis *et al.* 2003; Povh *et al.* 2008; Pereira *et al.* 2011), tornando-a relativamente desconhecida, principalmente se comparada com a ictiofauna norte americana (Böhlke *et al.* 1978; Castro 1999).

A ordem Siluriforme, nas regiões neotropicais é a segunda maior em número de táxons descritos. Embora agrupe 1700 espécies de peixes (Lundberg *et al.* 2002; Ferraris 2007; Sullivan *et al.* 2013) com 36 famílias e 478 gêneros (Ferraris 2007; Cramer *et al.* 2007), nas bacias hidrográficas da América do Sul foram descritas apenas 14 famílias (Moyle & Cech 2004; Cramer *et al.* 2007; Sullivan *et al.* 2013).

Na região do Pantanal, das 269 espécies de peixes, 105 espécies pertencem a esta ordem (Britski *et al.* 2007), demonstrando a importância do recurso pesqueiro para região. Entretanto, relatos indicam que, pelo desembarque cada vez menor destas espécies pescáveis, possa estar ocorrendo um contínuo decréscimo destas populações locais de bagres. Cenários onde a pesca predatória e as ações antrópicas tornaram algumas espécies de Siluriformes ameaçadas também foram registrados em outras partes do mundo (Bhattacharjee *et al.* 2012).

Dado o exposto, esforços têm sido envidados no sentido de se identificar a diversidade real da ictiofauna do planeta, de maneira mais simplificada, amenizando as dificuldades inerentes aos sistemas taxonômicos clássicos de identificação (Steinke *et al.* 2009). Assim, um fragmento de 650pb de um gene específico do DNA mitocondrial, o citocromo *c* oxidase subunidade I (*COI*), tem sido utilizado para identificar espécies animais, como invertebrados (Barrett & Hebert 2005; Costa *et al.* 2007) e pássaros (Kerr *et al.* 2009; Vilaça *et al.* 2013). Em peixes a eficiência do gene *COI* na distinção

de espécies de diferentes ecossistemas está acima de 92% para (Ward *et al.* 2005; Carvalho *et al.* 2011; Pereira *et al.* 2013; Frantine-Silva *et al.* 2015).

Em função do número reduzido de informações existentes objetivou-se identificar, pela técnica de DNA *barcode*, os Siluriformes pescáveis coletados na bacia do Paraguai no Pantanal e verificar as relações filogenéticas entre estas unidades taxonômicas visando auxiliar a geração de conhecimento.

Materiais e Métodos

Coleta de amostras

Amostra da nadadeira caudal de 62 espécimes de bagres pescáveis, foram coletadas por meio de pesca esportiva, amadora e profissional, durante um período de 3 anos (2011-2013), totalizando 14 sítios diferentes de capturas na bacia do Paraguai nos rios (Paraguai, Aquidauana e Miranda) (Fig. 1). Todas as capturas foram realizadas de acordo com a legislação ambiental vigente no País, bem como respeitando as normativas da Comissão de Ética do Uso de Animais – CEUA (Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul) protocolo nº 019/2013.

Os exemplares coletados foram classificados utilizando o nome vulgar (popular), de acordo com as características morfológicas relatadas para peixes descritos na bacia Paraguai, no Pantanal. Posteriormente, foram designadas pelo nome científico descrito por Britski *et al.* (2007). Os números de amostras para cada espécie variaram de 2 a 5 com uma média 4.13. O material biológico coletado foi armazenado em álcool 70% e estocado a -20 °C até o processamento.

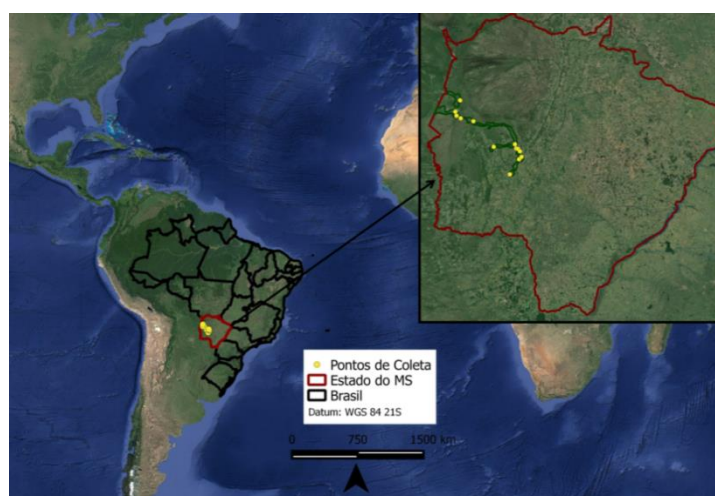


Fig. 1 Distribuição dos pontos de coleta de amostras ao longo da Bacia do Paraguai no Pantanal.

Extração, amplificação por PCR e sequenciamento de DNA

O DNA foi extraído no Laboratório de Genética e Biologia Molecular - LGBM da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS) - MS - Brasil, seguindo o protocolo de extração do Kit PureLink™ Genomic DNA extraction (Invitrogen) proposto pelo fabricante. Os produtos das extrações foram quantificados por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nm no aparelho NanoDrop (Thermo Scientific ND 1000).

A região do *COI* foi amplificada com base na sequência de iniciadores de peixe FishF1 e FishR1 (Ward *et al.* 2005). As reações de PCR foram realizadas em termociclador Vereti™ 96-Well Thermal Cyclers (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) em um volume final de 25 μ L sendo a reação de amplificação constituída de 50 ng de DNA, 2.5 pmol de primer, tampão 1X, 2.5mM, de $MgCl_2$, 0.05 de dNTPs, 1.65U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) e 18,05 μ L de água. Para amplificação utilizou-se: 2 min para desnaturação inicial a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 57 °C e 1 min a 72 °C, com uma extensão final a 72 °C durante 10 min.

Os produtos amplificados foram purificados por meio de um kit comercial Purilink™ PCR Micro to Midi, seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento bidirecional foi realizado pelo método de terminação de cadeia utilizando dideoxinucleotídeos marcados com fluorocromos (Sanger 1988), no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da UNESP, Campus de Jaboticabal, sendo utilizado o kit "ABI Prism® Dye Terminator 3.1" (Applied Biosystems) em um sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems).

Medidas de Controle de Qualidade e Edição de Sequências

As sequências foram alinhadas e editadas pelo programa SeqScape v2.1 (Applied Biosystems). As sequências consenso obtidas foram comparadas com os bancos de dados públicos existentes, no Centro Nacional de Informações Biotecnológicas - GenBank (BLASTN) (Camacho *et al.* 2012) e no Sistema de Barcode of Life de dados - BOLD (BOLD-IDS) (Ratnasingham & Hebert 2007), permitindo a geração de um inventário com as sequências que já estavam depositadas e disponíveis para acesso. O nível de fidelidade das sequências obtidas em comparação com as sequências

depositadas foi definido como “específica” ou “não específica”. O nível de similaridade foi adequado a partir do proposto por Bhattacharjee *et al.* (2012), sendo determinado de acordo com os seguintes parâmetros: 98% a 100% expressiva, 92% a 97% moderada e $\leq 91\%$ inexpressiva. Todas as sequências geradas nesse trabalho foram depositadas no GenBank com números de acesso (KP294217 a KP294278).

A robustez e confiabilidade do alinhamento das sequências foi checada por meio dos programas online Guidance (Penn *et al.* 2010) e MAFFT v7 (Katoh & Standley 2013).

Análise dos dados

O *software* MEGA v6 (Tamura *et al.* 2013) foi utilizado para calcular as distâncias genéticas usando o modelo de métrica de Kimura 2 Parâmetros (K2P) (Kimura 1980) por ser o principal modelo empregado nesta espécie, permitindo comparações com os resultados alcançados em outros trabalhos do mesmo segmento. A partir da matriz de distância genética de K2P construiu-se um dendograma utilizando o algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei 1987), o qual foi construído com análise de suporte de 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*.

Resultados

A partir de 62 espécimes sequenciados foram identificados um total de 15 espécies de bagres pescáveis pertencentes a 12 gêneros, cinco famílias e uma ordem. Após o alinhamento e edição dos fragmentos, as análises foram realizadas com base em um fragmento de 630 bp. As frequências médias dos nucleotídeos encontrados foram C (27.2%), T (27.8%), A (26.7%) e G (18.3%).

A comparação das sequências obtidas com as sequências depositadas nos bancos Genbank e BOLD resultou na identificação de oito espécies (53%) previamente descritas nos bancos supracitados (*Pseudoplatystoma fasciatum*, *Pseudoplatystoma corruscans*, *Pinirampus pirinampu*, *Trachelyopterus sp.*, *Pterodoras granulosus*, *Ageneiosus brevifilis*, *Liposarcus anisitsi*, *Paulicea luetkeni*) com similaridade genética em ambos os bancos de dados superior a 99% (Tabela 1). As três últimas espécies citadas apresentaram nomenclatura sinonímias nos bancos de dados.

As espécies *Luciopimelodus sp.* e *Surubim lima* demonstraram alta porcentagem de igualdade genética (>99%) no BOLD. *Pimelodus cf. maculatus* e *Pimelodus cf.*

199 *argenteus* apresentaram sequências de significância acima do limiar estabelecido para o
200 nível moderado (>97%) em ambos os bancos.

201 As espécies *Platydora armatulus* e *Hemisorubim platyrhynchos*, encontram-se no
202 padrão de significância moderada. O *H. platyrhynchos* apresentou a mesma
203 nomenclatura em ambos os bancos dados, já o *P. armatulus* obedeceu à mesma
204 nomenclatura somente no Genbank, pois no BOLD a coincidência da nomenclatura
205 ficou limitada ao gênero.

206 A espécie *Pimelodus ornatus* apresentou semelhança genética inferior a $\leq 91\%$ no
207 Genbank e não foi encontrada sequência similar no BOLD.

208 Tabela 1 – Identificação dos espécimes com base na similaridade das sequências consenso de *barcode* em espécies
209 utilizando o BLASTN do GenBank e o BOLD (BOLD-IDS) para peixes do Pantanal

Ordem	Nome vulgar	Nome científico	Correspondência das sequências			
			Genbank		BOLD	
			Nome	Similaridade	Nome	Similaridade
1	Bg. amarelo com Pinta	<i>Pimelodus cf. maculatus</i>	<i>Pimelodus blochii</i>	99%	<i>Pimelodus blochii</i>	98,74%
2	Bg. amarelo sem Pinta	<i>Pimelodus cf. argenteus</i>	<i>Pimelodus pohli</i>	97%	<i>Pimelodus maculatus</i>	100%
3	Bg. Cabeçudo	<i>Pimelodus ornatus</i>	<i>Pimelodus maculatus</i>	87%	-	-
4	Fidalgo	<i>Luciopimelodus sp.</i>	<i>Pimelodus albicans</i>	89%	<i>Megalonema argentinus</i>	100%
5	Jurupensen	<i>Sorubim lima</i>	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	91%	<i>Sorubim lima</i>	99,84%
6	Jiripoca	<i>Hemisorubim platyrhynchos</i>	<i>Hemisorubim platyrhynchos</i>	97%	<i>Hemisorubim platyrhynchos</i>	97%
7	Cachara	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	100%	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	99,85%
8	Pintado	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	100%	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	100%
9	Barbado	<i>Pinirampus pirinampu</i>	<i>Pinirampus pirinampu</i>	100%	<i>Pinirampus pirinampu</i>	100%
10	Jaú	<i>Paulicea luetkeni*</i>	<i>Zungaro jahu</i>	100%	<i>Zungaro jahu</i>	100%
11	Bg. Pedra	<i>Trachelyopterus sp.</i>	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	100%	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	100%
12	Armal	<i>Pterodoras granulosus</i>	<i>Pterodoras granulosus</i>	100%	<i>Pterodoras granulosus</i>	99,84%
13	Roque Roque	<i>Platydora armatulus</i>	<i>Platydoras armatulus</i>	95,85%	<i>Platydoras sp. armatulus</i>	96%
14	Palmito	<i>Ageneiosus brevifilis*</i>	<i>Ageneiosus inermis</i>	99%	<i>Ageneiosus inermis</i>	100%
15	Acari	<i>Liposarcus anisitsi*</i>	<i>Pterygoplichthys sp.</i>	100	<i>Pterygoplichthys anisitsi</i>	100%

210 Descrição similaridade utilizado no estudo: 98%-100% - expressiva, 92%-97% - moderada e $\leq 91\%$ - inexpressiva.

211 *Nomes sinonímias na literatura.

Analisando as distâncias genéticas para espécies, gêneros e famílias (tabela 2) observa-se que a maior distância genética média foi dentro de família, seguida por gênero e espécie e a distância entre espécies em relação a congêneres foi de oito vezes.

Tabela 2 - Distância genética (K2P) dentro de diferentes níveis taxonômicos para 62 espécimes de peixes analisadas

Comparações dentro	Taxa n	Mínimo	Média	Máxima	SE
Espécie	15	0	0,002	0,02	0,0001
Gênero	12	0	0,016	0,11	0,002
Família	5	0	0,042	0,14	0,004

S.E. Estimativa de erro padrão

Os agrupamentos formados na árvore filogenética construída a partir da metodologia K2P-NJ indicam que a maioria das espécies formaram unidades coesas, suportadas por valores de *bootstrap* de >95% com divergência genética maior que 2% entre elas (Fig. 2). Na espécie *P. cf. argenteus* verificou-se a formação de dois subgrupos (Fig. 2) com distância genética intraespecífica média K2P dentro da espécie >2% (Tabela 03).

Cabe ressaltar, que só foi possível fazer a identificação molecular dentro de cada espécie em 96,77% dos casos, uma vez que, em dois casos os fenótipos das espécies não corresponderam com o haplótipo esperado na análise, sendo um indivíduo de *P. corruscans* e o outro de *P. cf. argenteus*, indicados com pontos negros (Fig. 2).

Entre as espécies estudadas existem dois gêneros que possuem mais de um representante (*Pseudoplatystoma* e *Pimelodus*). Somente o gênero *Pseudoplatystoma* apresentou agrupamento satisfatório (*bootstrap* >70%) entre seus congêneres.

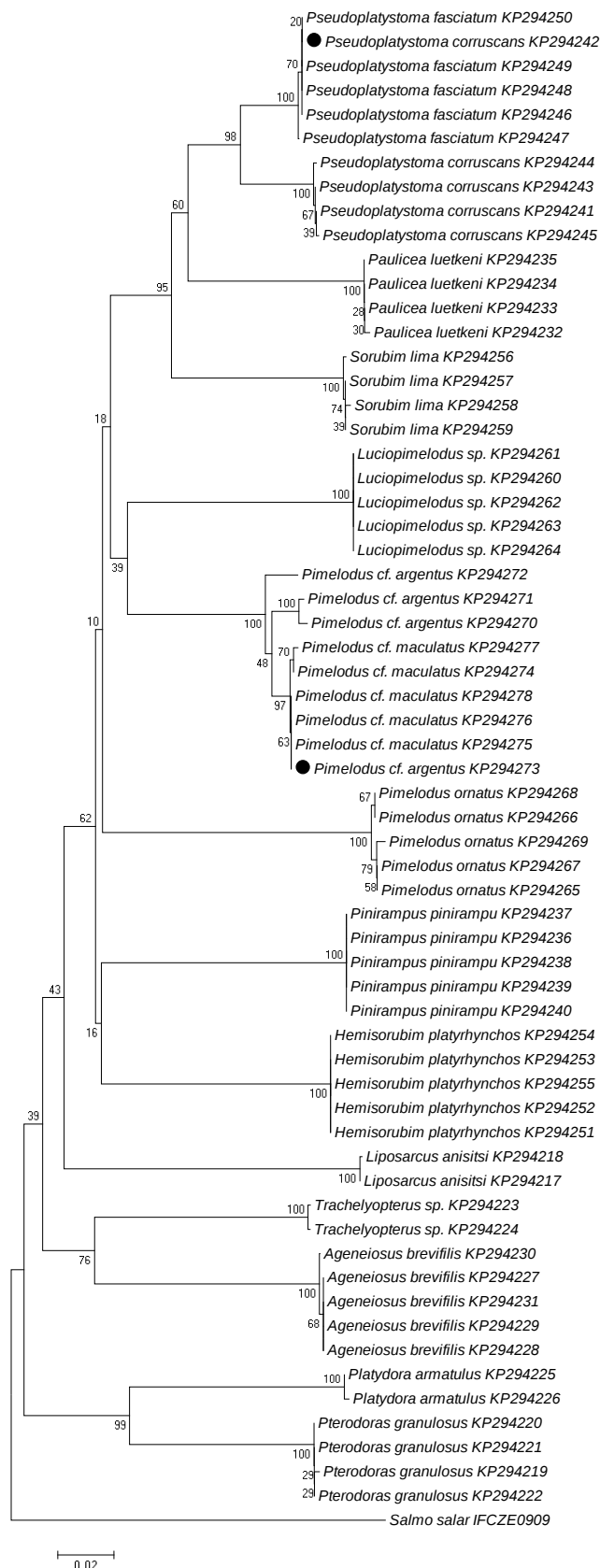


Fig. 2 Árvore filogenética estimada com base na distância genética de Kimura 2 Parâmetros agrupados pelo método de Neighbor-Joining (1000 *bootstrap*), baseada em seqüências de mtDNA do gene *COI* de 62 amostras de peixes Siluriformes e um outgroup (*Salmo salar*). Pontos pretos identificam os possíveis híbridos.

Todavia no gênero *Pimelodus* a espécie *P. ornatus*, não demonstrou valor adequado para *bootstrap*, distanciando das outras espécies do gênero (Fig. 2). As outras espécies desse gênero *P. maculatus* e *P. argenteus* formaram um grupo coeso. Contudo as divergências genéticas demonstram uma correlação entre os subgrupos de *P. argenteus* e *P. cf. maculatus* com divergência genética média em torno de 2% (Tabela 03).

Tabela 3 - Divergências genéticas (K2P) entre os subgrupos da espécie *P. cf. argenteus* e entre a espécie *P. maculatus*

	<i>P. cf. maculatus</i>	<i>P. cf. argenteus</i> A	<i>P. cf. argenteus</i> B
<i>P. cf. maculatus</i>	0	–	–
<i>P. cf. argenteus</i> A	1,9%	0	–
<i>P. cf. argenteus</i> B	2%	2,9%	0

Discussão

O presente trabalho representa o primeiro estudo que emprega a técnica de DNA *barcode* para distinção e averiguação de relações filogenéticas em espécies de Siluriformes pescáveis no Pantanal, as quais estão fortemente ameaçadas pela pesca predatória e ações antrópicas. Os tamanhos obtidos dos fragmentos no trabalho demonstraram que todas as sequências são condizentes com o tamanho de fragmento esperado para região mitocondrial do *COI* e está de acordo com os trabalhos realizados com *barcode* em peixes (Ardura *et al.* 2010; Pereira *et al.* 2011; Pereira *et al.* 2013), bem como as porcentagens de cada nucleotídeo obtidas nos fragmentos do *COI* em peixes (Steinke *et al.* 2009; Aquilino *et al.* 2011).

Todas as sequências de *COI*, das 15 espécies do trabalho, foram utilizadas para comparações de similaridade genética nos bancos de acesso público GenBank e BOLD. Dentre essas espécies, seis (40%) revelaram uma alta taxa de porcentagem de semelhança (>99%) e identificação correta em ao menos um banco de dados. Outras três (*Paulicea luetkeni*, *Ageneiosus brevifilis* e *Liposarcus anisitsi*), possuem alta porcentagem de semelhança e divergência na nomenclatura encontrada nos bancos de dados, porém, são espécies com nomenclaturas sinonímias já documentadas (verificados em [http:// www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)).

A espécie *Luciopimelodus* sp. apresentou 100% de similaridade com a espécie *Megalonema argentinus*, uma espécie endêmica da Argentina (López *et al.* 2005) que já se encontra no Pantanal brasileiro. Essa espécie, embora ainda não tenha sido descrita

na região Pantaneira, apresenta registros na bacia do rio Paraná, fora dos limites do território do Brasil. Considerando-se que a bacia do Paraguai deságua na bacia do Paraná, existe uma chance considerável que os indivíduos sejam da mesma espécie, no entanto, têm sido descritos com nomes diferentes em decorrência da sua localidade.

As espécies *H. platyrhynchos* e *P. armatulus* podem estar sofrendo um processo de subestruturação em suas populações, já que os haplótipos que apresentaram similaridade são de regiões hidrográficas distintas, com diferenças genéticas acima de 3% e 4%, respectivamente. Este valor é consistente com Hebert *et al.* (2003), que sugerem que com níveis de 3% de divergência genética pode-se considerar a hipótese do aparecimento de possíveis novas espécies. Entretanto, para os autores este fato, deve estar embasado e correlacionado com estudos de taxonomia.

Na espécie *P. cf. argenteus* a similaridade observada no BOLD (100%) com as sequências de *P. cf. maculatus* originária da Argentina, o que demonstra um possível equívoco na identificação dessa espécie em diferentes bacias hidrográficas das regiões da América do Sul. Ribeiro *et al.* (2006), relataram uma grande variabilidade na morfologia e cor entre táxons incluídos no gênero *Pimelodus*, o que poderia ser responsável por essa questão e provocar esses erros de identificação para depósitos dos haplótipos do *COI*. Sugere-se que a realização de uma revisão molecular e sistemática para desvendar a diversidade existente no gênero *Pimelodus*.

Para a espécie *P. cf. maculatus*, níveis expressivos foram alcançados (>98%), com *P. blochii*, espécie esta descrita na bacia Amazônica e que apresenta características morfológicas distintas das encontradas no Pantanal. Cabe ressaltar, que existem sequências depositadas para a espécie *P. maculatus* nos bancos de dados, entretanto, estas são provenientes de bacias hidrográficas de outras regiões do Brasil e as similaridades encontradas com as sequências do presente estudo são moderadas, o que pode sugerir divergência na identificação dessas espécies, mas, também pode indicar uma diferenciação da espécie do Pantanal em relação aos outros haplótipos de bacias hidrográficas diferentes. Assim, para averiguação destas hipóteses levantadas, uma abordagem correlacionando a taxonomia com marcadores moleculares nas principais bacias hidrográficas do Brasil deve ser realizada.

Vale ressaltar que Frantine-Silva *et al.* (2015), observaram em 245 indivíduos da espécie *P. maculatus*, alguns exemplares com elevados níveis de diversidade genética

para *COI*, o que pode significar a existência de unidades taxonômicas diferentes em rios da bacia do Paraná. No entanto, em outro estudo realizado também na bacia no Paraná, com marcadores nucleares, observa-se baixos níveis de diferenciação genética nesta espécie (Ribolli *et al.* 2012). Esta diferença nestes resultados pode estar diretamente relacionada ao tipo de marcador empregado. Uma única espécie, *P. ornatus*, foi detectada em apenas um dos bancos, mas a semelhança foi inferior (<91%), o que é válido supor a inexistência de referência *barcode* para a espécie estudada.

É importante ressaltar que, em comparação com os 3088 táxons de Siluriformes descritos na literatura (Ferraris 2007), os bancos de dados BOLD e Genbank apresentam baixa representatividade das espécies de Siluriformes, 751 e 169 espécies com haplótipos do gene *COI* depositados, respectivamente o que dificulta fazer a comparação e identificação por estes bancos de dados, reforçando ainda mais a importância de sequenciamento e depósitos dessas sequências oriundas de espécies de várias bacias hidrográficas.

Os dados de distância média K2P observados (espécie 0,2%, congêneres 1,6% e famílias de 4,2%) mostraram um aumento da diferença genética, devido à alteração dos níveis taxonômicos demonstrando uma variação relevante na divergência genética nos limites dos táxons (Rock *et al.* 2008; Lara *et al.* 2010; Aquilino *et al.* 2011). April *et al.* (2011) obtiveram valores de K2P dentro de espécies, congêneres e famílias de 0,73%, 13,67%, 15,91% respectivamente, em 752 espécies de peixes da América do Norte. Pereira *et al.* (2013) em 253 espécies de peixes de água doce da região Neotropical observaram médias de K2P de 1,3%, 6,8% e 20,1% entre indivíduos da mesma espécie, congêneres e famílias. No presente trabalho os valores inferiores observados podem estar relacionados com a proximidade dos táxons avaliados, como no trabalho Rosso *et al.* (2012), ou em razão do processo de radiação recente sofrido por peixes de regiões Neotropicais (Montoya-Burgos 2003; Albert & Reis 2011; Pereira *et al.* 2013).

Nos casos de identificação genética diferente da espécie fenotípica descrita, verifica-se que o haplótipo sequenciado corresponde à identificação de uma espécie congênere. Pode-se supor que houve erro de classificação primária em função de similaridades fenotípicas, entretanto, a questão de hibridização entre as espécies congêneres não pode ser descartada.

Detectou-se neste estudo um possível caso de híbrido no ambiente entre as espécies *P. corruscans* e *P. fasciatum*. Resultados semelhantes também foram observados nestas espécies por Bignotto *et al.* (2009) no alto da bacia Paraná e Vaini *et al.* (2014) em rios da bacia do Paraguai. Uma das possibilidades aventadas está relacionada ao fato que o hibridismo entre peixes de espécies silvestres congêneres é comumente utilizado em pisciculturas no Brasil. Na região Centro-Oeste, onde se localiza o Pantanal, é frequente a utilização do híbrido entre as espécies *P. corruscans* e *P. fasciatum* (Resende 2009), sendo que a produção brasileira proveniente de seus cruzamentos no ano de 2013 foi de 15.715 toneladas (IBGE 2013). Apesar disso, mesmo ocorrendo o risco de ameaça da integridade genética das populações locais, até o momento não foi encontrado na literatura estudos que tenham mensurado os possíveis impactos provocados pelas perturbações ecológicas desses híbridos para as populações locais de peixes.

Duas espécies revelaram-se muito próximas *P. cf. argenteus* e *P. cf. maculatus*, tanto por valores de cálculos de distância como por parâmetros morfológicos. Além disso, uma sequência de *P. cf. argenteus* foi observada como híbrido de *P. cf. maculatus*, levando a supor que elementos relacionados a isolamento reprodutivo podem não estar bem definidos entre essas espécies. Isso pode ocorrer por questões de processos de radiação recente, fator evidenciado em gêneros de peixes na região Neotropical (Hubert *et al.* 2007) e em peixes marinhos (Roques *et al.* 2001) provocando o hibridismo nas duas espécies. No entanto, para averiguação da hipótese aponta-se que uma análise correlacionando os parâmetros morfológicos, moleculares e ecológicos com maior número de indivíduos solucionaria essa questão.

A espécie *P. cf. argenteus* formou dois subgrupos distintos (Fig. 2) com valor de distância intraespecífica acima do esperado para espécie >2%. Estes resultados apontam uma possível subestruturação na população já que índices de 2% de divergência genética são sugestivos, como corte heurístico, para delimitar novas espécies com o emprego do *barcode* (Hebert *et al.* 2004; Hubert *et al.* 2008; Ward *et al.* 2009).

A divergência genética <2% entre as espécies *P. cf. argenteus* e *P. cf. maculatus* sugere que ambas possam pertencer a uma única espécie. Entretanto, outros trabalhos, já distinguiram espécies com valores de divergência interespecífica menor que 2% (Ward *et al.* 2005; Lara *et al.* 2010; Pereira *et al.* 2013). De forma similar, April *et al.* (2011) relataram que um corte inferior a 2% poderia levar a erros na identificação, inflando o

número de espécies candidatas antes que outras características possam ser avaliadas. Assim, sugere-se que para confirmação destas suposições uma investigação cautelosa nesta linha deva ser conduzida.

O estudo realizado demonstrou, por DNA *barcode*, que *P. ornatus* se distanciou das outras espécies do gênero *Pimelodus*, sugerindo que este táxon pode não pertencer a este gênero, sendo necessária a revisão na taxonomia da espécie. Esta hipótese também têm sido aventada por outros autores, baseada em dados de características apomórficas (Lundberg *et al.* 2012) e estudos conduzidos com outros marcadores mitocondriais e nucleares na análises filogenéticas de bagres (Lundberg *et al.* 2011).

Conclui-se por meio dos resultados obtidos no trabalho que a ferramenta de DNA *barcode* é capaz de identificar e discriminar espécies de Siluriformes pescáveis da Bacia do Paraguai, no Pantanal, bem como identificar possíveis casos de especiação e hibridização. As informações geradas neste trabalho e o depósito de sequências obtidas do gene COI das espécies de Siluriformes encontradas na região do Pantanal nos bancos de dados GenBank e BOLD poderão servir de base para futuras investigações relacionadas ao hibridismo e ao povoamento da bacia do Paraguai, bem como possibilitarão que comparações entre haplótipos de indivíduos de mesma espécie em diferentes localidades possam ser realizados.

REFERÊNCIAS

- Albert JS, Reis RE (eds.) (2011) *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes*. Univ of California Press.
- April J, Mayden RL, Hanner RH, Bernatchez, L (2011) Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 10602-10607.
- Aquilino SV, Tango J M, Fontanilla IK, Pagulayan RC, Basiao ZU, Ong PS, Quilang JP (2011) DNA *barcoding* of the ichthyofauna of Taal Lake, Philippines. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 612-619.
- Ardura A, Linde AR, Moreira JC, Garcia-Vazquez E (2010) DNA *barcoding* for conservation and management of Amazonian commercial Fish, *Biological Conservation*, **143**, 1438-1443.
- Barrett RD, Hebert, PD (2005) Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, **83**, 481-491.
- Bhattacharjee MJ, Laskar BA, Dhar B, Ghosh SK (2012) Identification and re-evaluation of freshwater catfishes through DNA barcoding. *PloS One*, **7**, e49950.
- Bignotto TS, Prioli AJ, Prioli SMAP, Maniglia TC, Boni TA, Lucio LC, Gomes VN, Prioli RA, Oliveira AV, Júlio-Junior HF, Prioli LM (2009) Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná river basin. *Brazilian Journal of Biology*, **69**, 681-689.
- Böhlke JE, Stanley HW, Naércio AM (1978) Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. *Acta Amazonica*, **8**, 657-677.
- Britski HA, Silimon KZS, Lopes BS (2007) Peixes do Pantanal: Manual de Identificação. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, **10**, 421.
- Carvalho DC, Oliveira DA, Pompeu PS, Leal CG, Oliveira C, Hanner R (2011) Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial DNA*, **22**, 80-86.
- Castro RMC (1999) Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. *Ecologia de Peixes de Riachos*. Edited by Caramashi E. P.; Mazzoni R, Peres-Neto (eds.) *Oecologia Brasiliensis*, **6**, 139-155.
- Cramer CA, Liedke AMR, Bornatto SL, Reis RE (2007) The phylogenetic relationships of the Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae) as inferred from mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences. *Bulletin of Fish Biology*, **9**, 51-59.
- Costa FO, DeWaard JR, Boutillier J, Ratnasingham S, Dooh RT, Hajibabaei M, Hebert PD (2007) Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **64**, 272-295.
- Cunha JMFL (2008) Biodiversidade e sistemática molecular dephreatobiidae (ostariophysi, siluriformes) – com uma proposta sobre sua posição filogenética em Siluriformes e uma discussão sobre a evolução do hábito subterrâneo. Ph. D, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Ferraris CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, **1428**, 1-628.

- Frantine-Silva W, Sofia SH, Orsi ML, Almeida FS (2015) DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. *Molecular Ecology Resources*, **15**.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DE Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **270**, 313-322.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004) 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**, 14812-14817.
- Hubert N, Hanner R, Holm E, Mandrak NE, Taylor E, Burrige M, Watkinson D, Dumont P, Curry A, Bentzen P, Zhang J, April J, Bernatchez L (2008) Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes, *PLoS One*, **3**, e2490.
- Hubert N, Duponchelle F, Nunez J, Garcia-Davila C, Paugy D, Renno JF (2007) Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, **16**, 2115-2136.
- IBGE – Instituto Brasileiro de geografia e estatística. Produção da Pecuária Municipal (2013). Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2013/default.shtm/>>. Acesso em: 11/03/2015
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, **30**, 772-780.
- Kerr KC, Stoeckle MY, Dove CJ, Weigt LA, Francis CM, Hebert PD (2007) Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular ecology notes*, **7**, 535-543.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111-120.
- Lara A, Rodríguez R, Casane D, Côté G, Bernatchez L, García-Machado ERIK (2010) DNA *barcoding* of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts *Molecular Ecology Resources*, **10**, 421-430.
- López HL, Miquelarena AM, Gómez JP (2005) Biodiversidad y distribución de la ictiofauna mesopotámica. *Miscelánea*, **14**, 311-354.
- Lundberg JG, Covain R, Sullivan JP, Fischmuller S (2012) Phylogenetic position and notes on the natural history of *Pimelabditus moli* Parisi & Lundberg, 2009 (Teleostei: Siluriformes), a recently discovered pimelodid catfish from the Maroni River basin. *Cybium*, **36**, 105-114.
- Lundberg JG, Parisi BM (2002) *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 of Philadelphia*, **152**, 75-88.
- Lundberg JG, Sullivan JP, Hardman M (2011) Phylogenetics of the South American catfish family Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes) using nuclear and mitochondrial gene sequences. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, **161**, 153-189.
- McLellan R, Iyengar L, Jeffries B, Oerlemans N (Eds.) (2014): Living Planet Report 2014: Species and spaces, people and places. WWF International, Gland. Disponível em: <http://wwf.panda.org/about_our_earth/all_publications/living_planet_report/>. Acesso em: 10/10/2014.
- Montoya-Burgos JI (2003) Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, **12**, 1855-1867.
- Moyle PB, Cech JJ (2004) *Fishes: an introduction to ichthyology* (p. 726). Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall.
- Penn O, Privman E, Landan G, Graur D, Pupko T (2010) An alignment confidence score capturing robustness to guide tree uncertainty. *Molecular Biology and Evolution*, **27**, 1759-1767.

- Pereira LH, Hanner R, Foresti F, Oliveira C (2013) Can DNA *barcoding* accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. *BMC Genetics*, **14**, 20.
- Pereira LH, Maia GM, Hanner R, Foresti F, Oliveira C (2011) DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil. *Mitochondrial DNA*, **22**, 71-79.
- Povh JA, Lopera Barrero NM, Ribeiro RP, Lupchinski Jr E, Gomes PC, Lopes TS (2008) Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Ciencia e Investigación agraria*, **35**, 5-15.
- Ratnasingham S, Hebert PD (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, **7**, 355-364.
- Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ (2003) Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs.
- Resende EKD (2009) Pesquisa em rede em aquicultura: bases tecnológicas para o desenvolvimento sustentável da aquicultura no Brasil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **38**, 52-57.
- Ribeiro FRV, Lucena CASD (2006) A new species of *Pimelodus* LaCépède, 1803 (Siluriformes: Pimelodidae) from the rio São Francisco drainage, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, **4**, 411-418.
- Ribolli J, Melo CMRD, Zaniboni-Filho E (2012) Genetic characterization of the neotropical catfish *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) in the Upper Uruguay River. *Genetics and molecular Biology*, **35**, 761-769.
- Rock J, Costa FO, Walker DI, North AW, Hutchinson WF, Carvalho GR (2008) DNA barcodes of fish of the Scotia Sea, Antarctica indicate priority groups for taxonomic and systematics focus. *Antarctic Science*, **20**, 253-262.
- Roques S, Sévigny JM, Bernatchez L (2001) Evidence for broadscale introgressive hybridization between two redfish (genus *Sebastes*) in the North-west Atlantic: a rare marine example. *Molecular Ecology*, **10**, 149-165.
- Rosso JJ, Mabragaña E, Gonzalez Castro M, Diaz de AJM (2012) DNA *barcoding* Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. *Molecular Ecology resources*, **12**, 999-1011.
- Saitou N, Nei M (1987) The Neighbor-Joining method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
- Sanger TD (1988). Optimal unsupervised learning. *Neural Networks*, **1**, 127.
- Schaefer SA (1998) Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*, 375-400. In: Malabarba L, Reis R, Vari R, Lucena Z, Lucena C (eds.) *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre. Edipucrs.
- Steinke D, Zemplak TS, Boutillier JA, Hebert PD (2009) DNA *barcoding* of Pacific Canada's fishes. *Marine Biology*, **156**, 2641-2647.
- Sullivan JP, Muriel-Cunha J, Lundberg JG (2013) Phylogenetic relationships and molecular dating of the major groups of catfishes the Neotropical superfamily Pimelodoidea (Teleostei, Siluriformes). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, **162**, 89-110.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, **30**, 2725-2729.
- Vaini JO, Grisolia AB, Prado FDD, Porto-Foresti F (2014) Genetic identification of interspecific hybrid of Neotropical catfish species (*Pseudoplatystoma corruscans* vs. *Pseudoplatystoma reticulatum*) in rivers of Mato Grosso Sul State, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, **12**, 635-641.

Vilaça ST, Lacerda DR, Sari EH, Santos FR (2013) DNA-based identification applied to Thamnophilidae (Passeriformes) species: the first barcodes of Neotropical birds. *Revista Brasileira de Ornitologia-Brazilian Journal of Ornithology*, **14**, 7.

Ward RD, Hanner R, Hebert PD (2009) The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of fish biology*, **74**, 329-356.

Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD (2005) DNA *barcoding* Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **360**, 1847-1857.

Zhang DX, Hewitt GM (1996) Nuclear integrations: challenge for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**, 247-251.

CAPÍTULO 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente projeto foram realizados estudos com objetivo de identificar geneticamente espécies de Siluriformes pescáveis pertencentes à bacia do Paraguai, no Brasil com base em sequências do mtDNA. Os resultados aqui alcançados foram satisfatórios com abordagem empregada do DNA *barcode*, em discriminar as espécies do trabalho sem ambiguidades. Todavia, esse é apenas um ponto inicial para futuros estudos sobre, a estrutura filogeográfica e a diversidade genética da ictiofauna da região Pantanal. Uma vez que, possíveis casos de especiação e hibridização foram detectados.