

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE
AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS

VIVIAN NUNES GOMES

Avaliação da sequência nucleotídica do gene mitocondrial citocromo oxidase I
na identificação de espécies de peixes neotropicais

Maringá, PR
2011

VIVIAN NUNES GOMES

Avaliação da sequência nucleotídica do gene mitocondrial citocromo oxidase I
na identificação de espécies de peixes neotropicais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Área de concentração: Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Simone Pavanelli

Maringá, PR

2011

"Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)"
(Biblioteca Setorial - UEM. Nupélia, Maringá, PR, Brasil)

G633a Gomes, Vivian Nunes, 1986-
 Avaliação da seqüência nucleotídica do gene mitocondrial citocromo oxidase I na
 identificação de espécies de peixes neotropicais / Vivian Nunes Gomes. -- Maringá,
 2011.
 47 f. : il. color.

 Dissertação (mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais)--
 Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2011.
 Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli.
 Coorientador: Dr. Carla Simone Pavanelli.

 1. Peixes de água doce - DNA *barcoding* - Sistemática molecular - Brasil. 2.
 Sistemática molecular - Peixes de água doce. I. Universidade Estadual de Maringá.
 Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes
 Aquáticos Continentais.

CDD 22. ed. -597.1350981
NBR/CIP - 12899 AACR/2

FOLHA DE APROVAÇÃO

VIVIAN NUNES GOMES

Avaliação da sequência nucleotídica do gene mitocondrial citocromo oxidase I
na identificação de espécies de peixes neotropicais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Alberto José Prioli
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Alessandra Valéria de Oliveira
Centro Universitário de Maringá (Cesumar)

Prof. Dr. Weferson Júnio da Graça
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 09 de Fevereiro de 2011.

Local de defesa: Anfiteatro Prof. “Keshiyu Nakatani”, Nupélia, Bloco G-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

Dedico este trabalho à minha família,
em especial aos meus pais, Vera e
Valdecir, com muito amor

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Dr. Alberto José Prioli, pela orientação, incentivo e amizade durante todos esses anos.

À Dra. Carla S. Pavanelli que além de aceitar co-orientar esse trabalho, sempre auxiliou nos trabalhos do laboratório.

À Dra. Sônia Maria A. P. Prioli, pela amizade, orientação pessoal e profissional e por acreditar que sempre somos capazes.

À Dra. Maria Aparecida Fernandes, seus alunos e funcionários do COMCAP pela ajuda no sequenciamento.

Aos amigos que passaram pelo laboratório, em especial, Thaís S. Bignotto, Talge A. Boni, Léia C. Lucio, Thiago C. Maniglia, Boris Briñez, Renata S. Panarari-Antunes, Thatiane R. Mota, Rodrigo de Mello e Juliana M. Hayashi, pelo companheirismo, ajuda e fornecimento de materiais biológicos.

*Ao Dr. Pedro Galetti Jr. e Bruno Rossini, pelas amostras de *Salminus franciscanus*.*

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, pela oportunidade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, pelos ensinamentos.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ambientes Aquáticos Continentais, Aldenir C. Oliveira e Jocemara C. dos Santos, pela eficiência nas questões burocráticas requeridas durante o curso.

Ao Programa de Pesquisa Ecológica de Longa Duração (PELD-Site 6), pela oportunidade de coleta de material e aprendizado prático.

À Maria Salete R. Arita e João Fábio Hildebrandt, da biblioteca setorial do Núpelia, pelo auxílio prestado às necessidades literárias.

Aos funcionários do DBC, especialmente ao Donizete e à Maria José, pelo grande auxílio na parte técnica.

A todos os funcionários do Núpelia, pela ajuda.

Aos alunos da Coleção Ictiológica do Núpelia.

A todos os amigos e colegas do PEA.

Aos meus amigos Bruno, Paulo, Rafaela, Vivian e Lilian, pela amizade, apoio e ajuda incondicional. A graduação e o mestrado não seriam os mesmos sem vocês!

Às minhas eternas amigas: Clara, Lialge, Aline(s), Nathalia, Silvy, Priscila, Regina e Adriana, por poder contar sempre com vocês.

Ao meu namorado Daniel, por sempre apoiar todas as etapas do desenvolvimento do trabalho.

Aos meus familiares, pelo exemplo e amparo. Em especial aos meus pais, Valdecir e Vera, e irmãos, Elisângela e Pedro, por todas as oportunidades que me ofereceram, ajuda e amor!

À Universidade Estadual de Maringá, pela formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta para realização desse trabalho.

Avaliação da sequência nucleotídica do gene mitocondrial citocromo oxidase I na identificação de espécies de peixes neotropicais

RESUMO

DNA barcoding foi definido como metodologia padrão para quantificar a biodiversidade global através do polimorfismo molecular. Como tomada de decisão para identificação das espécies, foi estipulado um limiar de 10X entre variação intra-específica e interespecífica. Para isso, foi selecionado o gene mitocondrial citocromo *c* oxidase I (COI) em animais. A comunidade ictiofaunística da região neotropical é considerada a mais diversa, com alto número de espécies endêmicas e *taxa* crípticos. Para auxiliar na minimização do impedimento taxonômico e na identificação das espécies de peixes para a região neotropical, o critério de *DNA barcoding* foi avaliado quanto à efetividade em discriminar pares de espécies próximas com descrições taxonômicas consistentes. Foram analisados fragmentos de aproximadamente 535 pb de 20 pares de espécies pertencentes a sete gêneros. As análises foram conduzidas baseadas no modelo de substituição Kimura-2-Parâmetros e algoritmo *neighbor-joining*. Houve compartilhamento de haplótipos entre indivíduos de duas espécies do gênero *Potamotrygon* e também entre alguns indivíduos de duas espécies de *Schizodon*. As médias de distâncias genéticas intra-específicas e interespecíficas variaram de 0 a 0,3% e 0,3 a 16,8%, respectivamente. Treze pares de espécies obtiveram valores de diversidade genética suficientes para serem identificadas pela sequência COI. Os pares de espécies dos gêneros *Potamotrygon* (*P. falkneri* e *P. motoro*), *Pseudoplatystoma* (*P. reticulatum* e *P. punctifer*), *Salminus* (*S. brasiliensis* e *S. hilarii*), *Steindachnerina* (*S. brevipinna* e *S. insculpta*) e três espécies de *Schizodon* (*S. borellii*, *S. intermedius* e *S. fasciatus*) não atingiram o limiar estipulado pelo projeto, conseqüentemente não foram diferenciados pela sequência COI. Pode-se inferir que o sistema microgenômico de identificação para peixes da região Neotropical deve ser utilizado com cautela para não subestimar a biodiversidade. Estudos de sistemática e taxonomia que contemplem todo o arcabouço possível de informações sobre a espécie em estudos podem contribuir de maneira mais efetiva na minimização do impedimento taxonômico.

Palavras-chave: Gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI). mtDNA. *DNA barcoding*. Taxonomia. Brasil.

Evaluation of the nucleotide sequence of cytochrome oxidase I gene in the neotropical fish species identification

ABSTRACT

DNA barcoding was defined as a standard methodology for quantifying the global biodiversity through a mitochondrial gene portion cytochrome c oxidase I (COI). As decision making for species identification, a threshold of 10X between variation intra-specific and interspecific was stipulated. The neotropical fish community is considered the most diverse with high number of endemic species and cryptic *taxa*. In order to help minimizing the taxonomic impediment and identification of fish species of neotropical region, the criterion of *DNA barcoding* was evaluated regarding the effectiveness in distinguishing pairs of close species with consistent taxonomic description. Fragments of approximately 535 bp from 20 species assigned in seven genera were analyzed. The analyzes were conducted based on the Kimura-2-Parameter distance model and neighbor-joining algorithm. There were similarities between species congeneric haplotypes of *Potamotrygon* and *Schizodon*. The average genetic distances intra-specific and interspecific varied from 0 to 0.3% and 0.3 to 16.8%, respectively. Thirteen pairs of species obtained values of genetic diversity enough to be identified by the COI sequences. One pair of species of the genera *Potamotrygon* (*P. falkneri* e *P. motoro*), *Pseudoplatystoma* (*P. reticulatum* e *P. punctifer*), *Salminus* (*S. brasiliensis* e *S. hilarii*), *Steindachnerina* (*S. brevipinna* e *S. insculpta*) and three species of *Schizodon* (*S. borellii*, *S. intermedius* e *S. fasciatus*) not reached the threshold stipulated by the project, consequently were not differentiated by COI sequence. It is possible to conclude that the microgenomic identification system for fish of Neotropical region must be used with caution to avoid an underestimate the biodiversity and discrimination work of species involving information in various areas may help to minimize the taxonomic impediment.

Keywords: Cytochrome oxidase I gene (COI). mtDNA. *DNA barcoding*. Taxonomy. Brazil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Espécies de *Potamotrygon* da planície de inundação do alto rio Paraná, bacia do alto rio Paraná. (a) *Potamotrygon falkneri*. (b) *Potamotrygon motoro* 17
- Figura 2** (a) *Pseudoplatystoma corruscans*, NUP 413, 250,3 mm CP, planície de inundação do alto rio Paraná, bacia do alto rio Paraná. (b) *Pseudoplatystoma punctifer*, rio Amazonas, bacia do rio Amazonas, ilustração da descrição original (Castelnau, 1855). (c) *Pseudoplatystoma reticulatum*, NUP 3500, 285,0 mm CP, planície de inundação do alto rio Paraná, bacia do alto rio Paraná..... 19
- Figura 3** (a) *Salminus brasiliensis*, planície de inundação do alto rio Paraná, bacia do alto rio Paraná. (b) *Salminus franciscanus*, rio São Francisco, bacia do rio São Francisco. Foto do exemplar na descrição original (Lima & Britski, 2007). (c) *Salminus hilarii*, planície de inundação do alto rio Paraná, bacia do alto rio Paraná 20
- Figura 4** (a) *Steindachnerina brevipinna*, NUP 4594, 108,6 mm CP, planície de inundação do alto rio Paraná, bacia do alto rio Paraná. (b) *Steindachnerina corumbae*, NUP 1202, 77,3 mm CP, rio Corumbá, bacia do alto rio Paraná (c) *Steindachnerina insculpta*, NUP 451, 43,5 mm CP, planície de inundação do alto rio Paraná, bacia do alto rio Paraná 21
- Figura 5** a) *Schizodon borellii*, NUP 9724, 254,9 mm CP, planície de inundação do alto rio Paraná, bacia do alto rio Paraná. (b) *Schizodon fasciatus*, 86,3 mm CP, MUSM 33738, bacia do rio Amazonas. Foto por Buitrago-Suárez. (c) *Schizodon intermedius*, 295 mm CP, bacia do alto rio Paraná. (d) *Schizodon nasutus*, NUP 8833, 208,5 mm CP, afluente do rio Paranaíba, bacia do alto rio Paraná 22
- Figura 6** (a) *Leporinus elongatus*, NUP 11092, 167,7 mm CP, planície de inundação do alto rio Paraná, bacia do alto rio Paraná. (b) *Leporinus friderici*, NUP 11084, 116,6 mm CP. (c) *Leporinus obtusidens*, NUP 9371, 130,1 mm CP, rio Verde, bacia do rio Ivinheima..... 23
- Figura 7** Árvores filogenéticas utilizando o algoritmo *neighbor-joining* obtidas com o modelo K2P a partir da sequência parcial do gene citocromo c oxidase subunidade I. Números acima das ramificações representam os valores de *bootstrap*. (a) *Potamotrygon* (PTGf: *P. falkneri*; PTGm: *P. motoro*), (b) *Zungaro* (Zg-jahu: *Z. jahu*; Zg-zun: *Z. zungaro*), (c) *Pseudoplatystoma* (PTD: *P. corruscans*; PFA: *P. punctifer*; PCA: *P. reticulatum*), (d) *Salminus* (Sal-br: *S. brasiliensis*; Sal-fran: *S. franciscanus*; Sal-hi: *S. hilarii*), (e) *Steindachnerina* (St-bv: *S. brevipinna*; St-co: *S. corumbae*; St-ip: *S. insculpta*), (f) *Schizodon* (Sch-bo: *S. borellii*; Sch-fas: *S. fasciatus*; Sch-int: *S. intermedius*; Sch-na: *S. nasutus*) e (g) *Leporinus* (Le-elon: *L. elongatus*; Le-fri: *L. friderici*; Le-obt: *L. obtusidens*)..... 32

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Lista das espécies selecionadas para avaliar a eficiência de discriminação com sequência nucleotídica do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase I (Código: abreviação das espécies; N: número de indivíduos analisados; Testemunho NUP: número de catálogo na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura - Nupélia). Destacados em negrito, as espécies adicionadas a partir do *Genbank* com números de acessos FJ440621, EU185605, FJ418766 para *Schizodon fasciatus*, *Schizodon intermedius* e *Pseudoplatystoma punctifer*, respectivamente 16
- Tabela 2** - Polimorfismo nucleotídico das sequências do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase subunidade I de espécies de peixes dos gêneros *Potamotrygon* (PTGf: *P. falkneri*; PTGm: *P. motoro*), *Zungaro* (Zg-jahu: *Z. jahu*; Zg-zun: *Z. zungaro*), *Pseudoplatystoma* (PTD: *P. corruscans*; PFA: *P. punctifer*; PCA: *P. reticulatum*), *Salminus* (Sal-br: *S. brasiliensis*; Sal-fran: *S. franciscanus*; Sal-hi: *S. hilarii*), *Steindachnerina* (St-bv: *S. brevipinna*; St-co: *S. corumbae*; St-ip: *S. insculpta*), *Schizodon* (Sch-bo: *S. borellii*; Sch-fas: *S. fasciatus*; Sch-int: *S. intermedius*; Sch-na: *S. nasutus*) e *Leporinus* (Le-elon: *L. elongatus*; Le-fri: *L. friderici*; Le-obt: *L. obtusidens*). Destacado com asterisco o tamanho do fragmento, em pares de base, e proporção das bases nitrogenada 27
- Tabela 3** - Valores médios de distâncias genéticas, em porcentagem, obtidas com o modelo K2P de sequências parciais do gene citocromo *c* oxidase subunidade I de espécies de peixes dos gêneros *Potamotrygon* (PTGf: *P. falkneri*; PTGm: *P. motoro*), *Zungaro* (Zg-jahu: *Z. jahu*; Zg-zun: *Z. zungaro*), *Pseudoplatystoma* (PTD: *P. corruscans*; PFA: *P. punctifer*; PCA: *P. reticulatum*), *Salminus* (Sal-br: *S. brasiliensis*; Sal-fran: *S. franciscanus*; Sal-hi: *S. hilarii*), *Steindachnerina* (St-bv: *S. brevipinna*; St-co: *S. corumbae*; St-ip: *S. insculpta*), *Schizodon* (Sch-bo: *S. borellii*; Sch-fas: *S. fasciatus*; Sch-int: *S. intermedius*; Sch-na: *S. nasutus*) e *Leporinus* (Le-elon: *L. elongatus*; Le-fri: *L. friderici*; Le-obt: *L. obtusidens*) Destacado em negrito, valores das distâncias intra-específicas 30

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica *Neotropical Ichthyology*. Disponível em:
<<http://www.scielo.br/revistas/ni/iinstruc.htm>>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1	Material Biológico e Locais de Coleta	15
2.2	Extração e quantificação do DNA	24
2.3	Amplificação por PCR do DNA mitocondrial	24
2.4	Sequenciamento e análise dos dados	25
3	RESULTADOS	25
4	DISCUSSÃO	33
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
	REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

Algumas das principais áreas das ciências biológicas, como a ecologia, genética e evolução, são dependentes da taxonomia, como apontado de forma, até certo ponto, provocativa por alguns grupos de taxonomistas (Carvalho *et al.*, 2007). De fato, para essas áreas o recurso de uma taxonomia consistente é uma necessidade imperiosa. A razão fica explícita quando se considera que, em grande medida, os estudos ecológicos e genéticos são baseados em espécies ou grupos de espécies cuja identificação, frequentemente, é muito complexa.

Com o advento de técnicas moleculares tornou-se possível o estudo de novas concepções dos processos biológicos fundamentais. Muitas sequências do genoma associadas com análises filogenéticas têm sido empregadas de forma crescente na formulação de hipóteses filogenéticas e na discriminação e identificação de espécies. Há décadas que marcadores moleculares e análises da variabilidade genética auxiliam na solução de problemas e complementam a taxonomia (Moran *et al.*, 1994; Roe *et al.*, 1997). Essa abordagem é conhecida como sistemática molecular e oferece novos horizontes para a delimitação entre as espécies, muitas vezes de forma decisiva para a revelação de complexos de espécies crípticas (Griffiths *et al.*, 2010), identificação de interesse forense (Catanese *et al.*, 2010) e no amparo ao desmascaramento de fraudes comerciais (Wen *et al.*, 2010).

Apenas 15% da biodiversidade são conhecidas desde o início dos estudos taxonômicos baseados na nomenclatura binomial de Linnaeus. Dessa forma, a maioria das espécies necessita de reconhecimento e descrição formal, problemas conhecidos como déficit Linneano (Brown & Lomolino, 1998). A dificuldade na definição de espécies ou populações, na separação de grupos morfológicamente semelhantes, concomitante com a falta de estímulos ao trabalho dos taxonomistas, são alguns empecilhos que integram o que se convencionou denominar de impedimento taxonômico (Gaston & O'Neill, 2004; Solé-Cava, 2008). A principal percepção nesses conceitos é que o ritmo de descoberta e descrição de espécies é lento diante da velocidade da taxa de extinção. Portanto, muitas espécies vão desaparecer antes que sejam conhecidas.

Nesse cenário surgiu a proposta do programa conhecido como *Consortium for the Barcodes of Life* (CBoL) (Hebert *et al.*, 2003), que pretende padronizar e automatizar a identificação e descrição de toda biodiversidade e resolver o problema do impedimento taxonômico apenas com uma sequência de DNA, utilizada de forma semelhante aos códigos

de barras, denominada de *DNA barcoding*. Para identificar correta e rapidamente as espécies de animais foram selecionados 648 pares de bases (pb) do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase I (COI), cuja sequência completa tem aproximadamente 1.545 pb. Para plantas, os marcadores do cloroplasto, *matK* e *rbcL*, têm sido delimitados como região padrão para código de barras.

As sequências do *DNA barcoding* obtidas para cada espécie, juntamente com outras informações, são disponibilizadas em bancos de dados referentes a diversos grupos biológicos. Para os peixes, o banco de dados desenvolvido pela associação denominada de *Fish Barcode of Life Initiative* (FISH-BOL) cadastrou mais de 5.000 espécies com média de cinco exemplares para cada espécie catalogada (Ward *et al.*, 2009). As sequências disponíveis são utilizadas para formação do código de barras e assim, é possível confrontar um espécime desconhecido com as sequências COI e identificá-lo.

Entre as justificativas do uso do DNA como forma de identificação destaca-se a alta plasticidade fenotípica de muitas espécies, que pode conduzir a uma identificação incorreta. Além das chaves morfológicas que só teriam aplicabilidade em um estágio de vida, descartando indivíduos que não podem ser identificados e omitindo os *taxa* morfológicamente semelhantes. De acordo com Hebert *et al.* (2003), os estudos com a utilização de sequência do DNA são mais estáveis e muito mais confiáveis já que a genótipo não varia com as flutuações do ambiente.

A escolha de um marcador molecular pertencente ao DNA mitocondrial (mtDNA) foi embasada nas peculiaridades da molécula, como ausência de íntrons, baixos níveis de recombinação, herança predominantemente materna e fácil isolamento. Além disso, a variação intra-específica do mtDNA é pequena na maioria das espécies de animais com perda de polimorfismo ancestral dada a herança uniparental. A eficiência dos marcadores mitocondriais tem sido demonstrada em estudos de caracterização de espécies, variação geográfica e filogenia (Johnson *et al.*, 2007; Mabuchi *et al.*, 2008; Javonillo *et al.*, 2009). O gene COI possui vantagens como a possibilidade de utilização de um *primer* universal para a maioria dos animais, maiores taxas de sinal filogenético e evolução que auxiliam na discriminação de grupos muito próximos (Folmer *et al.*, 1994; Wares & Cunningham, 2001; Hebert *et al.*, 2003).

A taxa de evolução do gene COI é de fundamental importância para a resolução das propostas do CBoL, já que o valor da distância genética das sequências COI entre os organismos é utilizado como único critério para identificação, sendo estabelecido, arbitrariamente, um limiar de dez vezes para tomada de decisão. Em princípio, dois

haplogrupos seriam considerados como pertencentes a espécies distintas se o polimorfismo nucleotídico intergrupos for pelo menos dez vezes maior que as diferenças intragrupos (Hebert *et al.*, 2004).

São variadas as opiniões da aplicação da metodologia na literatura. Alguns autores sustentam os benefícios da sua utilização (Casu *et al.*, 2010), outros apontam as limitações e fragilidades do uso de uma única sequência nucleotídica com propósitos taxonômicos (Prendini, 2005; Page & Hughes, 2010) e ainda existem aqueles que advogam o afastamento completo do DNA da taxonomia (Ebach & Holdrege, 2005). Uma plêiade variada de organismos tem sido estudada com a metodologia *DNA barcoding*, como mamíferos (Francis *et al.*, 2010), aves (Lohman *et al.*, 2010), rotíferos (Fontaneto *et al.*, 2009) insetos (Ekrem *et al.*, 2010), aranhas (Robinson *et al.*, 2009) e outros. Também são encontrados relatos sobre a eficiência da sequência parcial COI na discriminação de espécies de peixes marinhos (Ward *et al.*, 2005) e de água doce (Hubert *et al.*, 2008).

A ictiofauna contempla mais da metade da diversidade de espécies de vertebrados com ampla variabilidade morfológica e variados padrões de distribuição. Com uma riqueza peculiar, os ambientes de água doce suportam aproximadamente 45% do número de espécies de peixes descritas, apesar de ocupar menos de um décimo da superfície total do globo terrestre (Nelson, 2006). A comunidade ictiofaunística da região Neotropical é considerada a mais diversa com 4.475 espécies válidas e 1.550 a serem descritas (Reis *et al.*, 2003). No Brasil são registradas 2.587 espécies que ocorrem exclusivamente em água doce (Buckup, 2007). Sabe-se que além da diversidade desse ambiente ser muito maior, o mesmo é caracterizado por conter alto número de espécies endêmicas (Lévêque *et al.*, 2008) e possuir *taxa* crípticos, comuns a vários grupos.

Apesar da alta diversidade Neotropical, corroborado por Abell *et al.* (2008) que encontraram os mais elevados níveis de riquezas e endemismo para essa região, também revelaram a escassez de informações sobre as descrições das espécies nas regiões que abrangem o sul da América do Norte à bacia do rio Paraná, locais que contemplam as espécies aqui estudadas. Estes empecilhos extrapolam não somente o campo da sistemática, mas também outras áreas engajadas na investigação dos vários aspectos da ictiofauna neotropical.

Erros na identificação das espécies possuem impactos negativos de maneira sinérgica por serem assimilados em estudos biológicos e posteriormente em programas de manejo e conservação ambiental (Bortolus, 2008). Muitos estudos ecológicos, por exemplo, podem não ter o significado que se imagina que tenham, com estimativas espúrias de parâmetros, simplesmente porque as espécies não foram identificadas corretamente.

Para auxiliar na minimização do impedimento taxonômico e na identificação das espécies de peixes da região neotropical, o critério de *DNA barcoding* do CBoL pode ser uma ferramenta eficaz. Porém, se faz necessária a avaliação da magnitude do polimorfismo nucleotídico da sequência COI. No presente estudo, o critério de *DNA barcoding* foi avaliado quanto à eficiência na discriminação de vinte pares de espécies de sete gêneros de peixes neotropicais. Foram comparadas sequências nucleotídicas do gene COI de espécies de peixes muito próximas, mas com descrições taxonômicas válidas. Para que se possa confiar na capacidade do CBoL em mapear completamente a biodiversidade, a metodologia preconizada necessita separar espécies próximas, sob pena de não atingir o objetivo proposto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Biológico e Locais de Coleta

A seleção das espécies de peixes dulcícolas no presente estudo foi de acordo com a semelhança morfológica das espécies, a validade da descrição taxonômica e a disponibilidade de material biológico. A identificação dos espécimes coletados seguiu Britski *et al.* (1999), Pavanelli & Britski (1999), Lundberg & Littmann (2003), Buitrago-Suárez & Burr (2007), Graça & Pavanelli (2007) e Lima & Britski (2007). As espécies selecionadas e os locais de coleta dos exemplares estudados estão descritos na Tabela 1.

Foram analisados 100 espécimes pertencentes a 20 espécies, distribuídas em sete gêneros, cinco famílias, três ordens e duas classes, segundo Reis *et al.* (2003) e Graça & Pavanelli (2007). Sempre que possível, foi selecionado como material testemunho um exemplar de cada espécie catalogado na Coleção Ictiológica do Nupélia (NUP) que tenha sido coletado nas proximidades da área de estudo.

As espécies *Schizodon fasciatus* Spix & Agassiz 1829, *Schizodon intermedius* Garavello & Britski (1990) e *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855) foram adicionadas no trabalho a partir das sequências COI disponíveis no *Genbank* com números de acessos FJ440621, EU185605, FJ418766, respectivamente. Para análises genéticas, em todas as outras espécies coletadas foram retiradas amostras do tecido muscular no momento da coleta, fixadas em álcool comercial puro e armazenadas sob refrigeração a -20°C.

Tabela 1 - Lista das espécies selecionadas para avaliar a eficiência de discriminação com sequência nucleotídica do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase I (Código: abreviação das espécies; N: número de indivíduos analisados; Testemunho NUP: número de catálogo na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura - Nupélia). Destacados em negrito, as espécies adicionadas a partir do *Genbank* com números de acessos FJ440621, EU185605, FJ418766 para *Schizodon fasciatus*, *Schizodon intermedius* e *Pseudoplatystoma punctifer*, respectivamente

Classe	Ordem	Família	Espécie	Código	N	Local de coleta	Testemunho (NUP)		
Chondrichthyes	Myliobatiformes	Potamotrygonidae	<i>Potamotrygon falkneri</i>	PTGf	7	rio Paraná	4543		
			<i>Potamotrygon motoro</i>	PTGm	7	rio Paraná	3603		
Osteichthyes	Siluriformes	Pimelodidae	<i>Zungaro jahu</i>	Zg-jahu	8	rio Paraná			
			<i>Zungaro zungaro</i>	Zg-zun	2	rio Tocantins			
			<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	PTDb PTD	10	rio Paraná rio Manso	413 876		
			<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	PCA	5	rio Manso	3500		
			<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	PFA	1	rio Amazonas			
			<i>Salminus brasiliensis</i>	Sal-br	7	rio Paraná	437		
	Osteichthyes	Characidae		<i>Salminus hilarii</i>	Sal-hi	4	rio Paraná	1898	
				<i>Salminus franciscanus</i>	Sal-fran	4	rio São Francisco		
				<i>Steindachnerina brevipinna</i>	St-bv	6	rio Paraná	4594	
		Characiformes	Curimatidae		<i>Steindachnerina corumbae</i>	St-co	2	rio Corumbá	1202
					<i>Steindachnerina insculpta</i>	St-ip	11	rio Paraná	451
					<i>Schizodon borellii</i>	Sch-bo	7	rio Paraná	9724
Osteichthyes	Anostomidae		<i>Schizodon fasciatus</i>	Sch-fas	8	rio Amazonas			
			<i>Schizodon intermedius</i>	Sch-int	1	rio Paraná			
			<i>Schizodon nasutus</i>	Sch-na	1	rio Paraná	8833		
			<i>Leporinus aff. elongatus</i>	Le-elon	1	rio Paraná	11092		
			<i>Leporinus friderici</i>	Le-fri	4	rio Paraná	11084		
			<i>Leporinus obtusidens</i>	Le-obt	4	rio Paraná			

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro

As duas espécies de peixes conhecidas popularmente como “raias” ou “arraias”, *Potamotrygon falkneri* Castex & Maciel 1963 e *Potamotrygon motoro* (Müller & Henle, 1841) foram coletadas na porção superior do alto rio Paraná, mas colonizaram a região após a submersão da barreira natural dos saltos de Sete Quedas, em 1982, pelo enchimento do reservatório de Itaipu, que teve como consequência o incremento de um trecho de aproximadamente 150 km da província Parano-Platense na porção superior do rio Paraná

(Agostinho *et al.*, 1997). A espécie *P. motoro* possui distribuição registrada nas bacias dos rios Uruguai, Paraná-Paraguai, Orinoco e Amazonas, já *P. falkneri* nas bacias dos rios Paraná-Paraguai (Carvalho *et al.*, 2003).

A identificação das raias é baseada principalmente na coloração dorsal do disco (Figura 1). *Potamotrygon falkneri* possui a superfície dorsal inteiramente coberta por manchas brancas ou amarelas que gradualmente aumentam de tamanho da margem para a região central do dorso, e *P. motoro* apresenta ocelos amarelos ou alaranjados, envolvidos por um anel preto, sendo os da região central do dorso quase o dobro de tamanho que os da margem (Britski *et al.*, 1999). A proximidade genética das duas espécies foi relatada por Maniglia (2010) que encontrou híbridos nos ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná.



Figura 1 - Espécies de *Potamotrygon* da planície de inundação do alto rio Paraná, bacia do alto rio Paraná. (a) *Potamotrygon falkneri*. (b) *Potamotrygon motoro*

Zungaro jahu* e *Zungaro zungaro

Os indivíduos do gênero *Zungaro* Bleeker, 1858 são peixes de couro, conhecidos popularmente como “jáú”, de grande porte podendo ultrapassar um metro de comprimento, alcançar 150 kg e capazes de realizar grandes migrações (Suzuki *et al.*, 2004).

Lundberg & Littmann (2003) definiram duas espécies nos ambientes continentais da América do Sul, *Zungaro jahu* (Ihering, 1898) com distribuição na bacia do rio Paraná-Paraguai e *Zungaro zungaro* (Humboldt, 1821) encontrado nas bacias do rio Amazonas e Orinoco. Estudos realizados por Boni (2008), com sequências mitocondriais da região hipervariável *D-loop* e do gene ATPase, corroboraram as duas espécies ao detectar que os indivíduos do gênero *Zungaro* da bacia do rio Paraná-Paraguai diferenciam-se daqueles

encontrados na bacia Amazônica. A identificação correta do jaú é de fundamental importância pelo fato de *Z. zungaro* estar listada como sobre-explorada ou em perigo de sobre-exploração no Brasil (Ministério do Meio Ambiente, 2004) e *Z. jahu* ser enquadrado como vulnerável nos estados brasileiros de Minas Gerais e Paraná (Mikich & Bérnils, 2004).

Pseudoplatystoma corruscans*, *Pseudoplatystoma punctifer* e *Pseudoplatystoma reticulatum

Pseudoplatystoma corruscans (Spix & Agassiz, 1829), *Pseudoplatystoma reticulatum* Eigenmann & Eigenmann, 1889 e *Pseudoplatystoma punctifer* são espécies migratórias de grande porte podendo ultrapassar 152 cm de comprimento (Agostinho *et al.*, 2003; Buitrago-Suárez & Burr, 2007). A espécie *P. corruscans* está distribuída ao longo das bacias dos rios São Francisco e Paraná, *P. reticulatum* na bacia dos rios Paraná e Amazonas e *P. punctifer* na bacia Amazônica (Buitrago-Suárez & Burr, 2007).

Os caracteres morfológicos das três espécies analisadas sobrepõem-se em relação às medidas e contagens como, por exemplo, na altura do corpo, comprimento da cabeça e do barbilhão maxilar. Diferenciam-se, dentre outros caracteres, pelo padrão de coloração, com presença de várias manchas escuras irregulares, arredondadas ou transversalmente alongadas em *P. corruscans*, barras verticais escuras em linha reta com conexão com os dois lados do dorso e discretas manchas escuras abaixo da linha lateral em *P. punctifer* e barras escuras em padrão reticular, estendendo-se abaixo da linha lateral em *P. reticulatum* (Buitrago-Suárez & Burr, 2007) (Figura 2).

As espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum* são suficientemente próximas para produzir, em cativeiro, híbridos viáveis. Bignotto *et al.* (2009) detectaram híbridos em ambientes aquáticos naturais que, provavelmente, são sobreviventes de escapes de pisciculturas.

A sequência COI do exemplar amazônico *P. punctifer*, utilizado do *Genbank* com FJ418766 como número de acesso, está identificado como *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766), entretanto, o estado taxonômico do exemplar foi alterado com base nos estudos de Buitrago-Suárez & Burr (2007) que restringiu a espécie *P. fasciatum* às Guianas e todos os exemplares amazônicos foram enquadrados em *P. punctifer*.

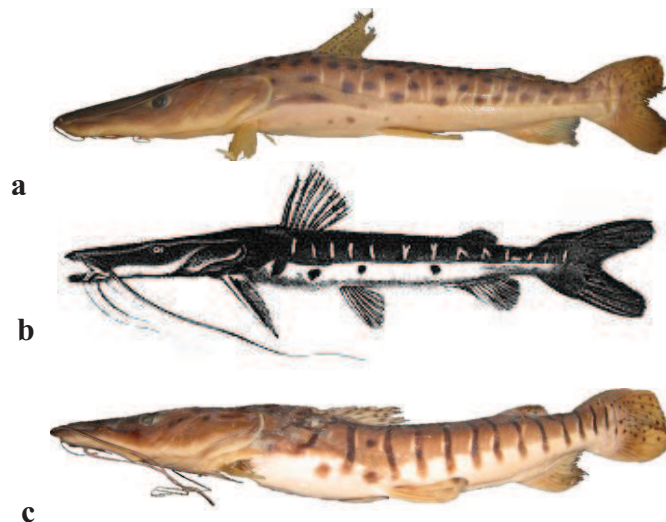


Figura 2 - (a) *Pseudoplatystoma corruscans*, NUP 413, 250,3 mm CP, planície de inundação do alto rio Paraná, bacia do alto rio Paraná. (b) *Pseudoplatystoma punctifer*, rio Amazonas, bacia do rio Amazonas, ilustração da descrição original (Castelnau, 1855). (c) *Pseudoplatystoma reticulatum*, NUP 3500, 285,0 mm CP, planície de inundação do alto rio Paraná, bacia do alto rio Paraná

Salminus brasiliensis*, *Salminus franciscanus* e *Salminus hilarii

Salminus brasiliensis (Cuvier, 1816) (Figura 3a) tem distribuição registrada nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, drenagens da Laguna dos Patos, porção superior das bacias dos rios Chaparé e Mamoré na Bolívia. A espécie *Salminus franciscanus* Lima & Britski, 2007 (Figura 3b) descrita recentemente é endêmica da bacia do rio São Francisco, já *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Figura 3c) é distribuída nas bacias do alto rio Paraná, São Francisco e Tocantins, bacia do alto rio Amazonas e bacia do rio Orinoco (Lima *et al.*, 2003). As duas espécies, *S. brasiliensis* e *S. hilarii*, foram consideradas por Abilhoa & Duboc (2004) como ameaçadas de extinção, como consequência de um dos aspectos negativos das construções de barragens para peixes migradores.

Salminus franciscanus pode ser diferenciada das demais espécies analisadas por conter um prolongamento dos raios caudais medianos bem desenvolvido e coloração prateada do corpo. *Salminus brasiliensis* não apresenta o prolongamento dos raios caudais medianos e coloração do corpo é dourada. As duas espécies diferenciam-se de *S. hilarii* por esta última apresentar menor tamanho corporal e coloração prateada do corpo com as nadadeiras amareladas e a caudal avermelhada (Graça & Pavanelli, 2007; Lima & Britski, 2007).

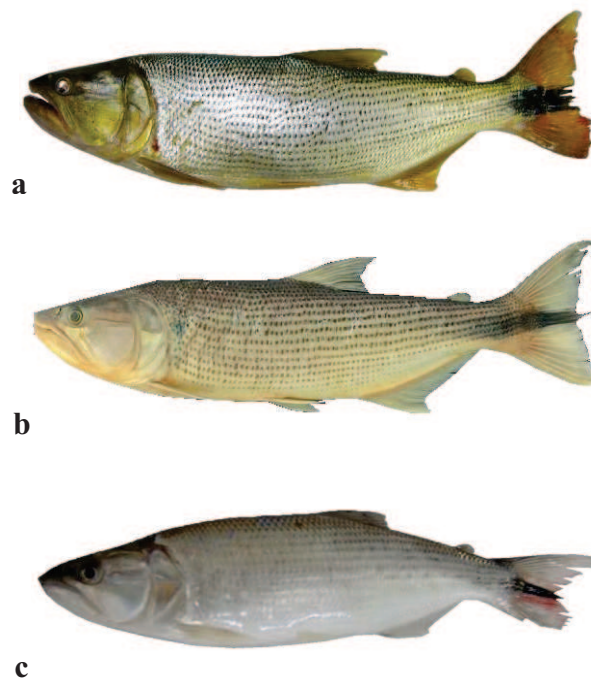


Figura 3 - (a) *Salminus brasiliensis*, planície de inundação do alto rio Paraná, bacia do alto rio Paraná. (b) *Salminus franciscanus*, rio São Francisco, bacia do rio São Francisco. Foto do exemplar na descrição original (Lima & Britski, 2007). (c) *Salminus hilarii*, planície de inundação do alto rio Paraná, bacia do alto rio Paraná

Steindachnerina brevipinna*, *Steindachnerina corumbae* e *Steindachnerina insculpta

Steindachnerina brevipinna (Eigenmann & Eigenmann, 1889) (Figura 4a), *Steindachnerina corumbae* Pavanelli & Britski, 1999 (Figura 4b) e *Steindachnerina insculpta* (Fernández-Yépez, 1948) (Figura 4c) possuem características morfológicas semelhantes como comprimento corporal e contagem de escamas. *Steindachnerina corumbae* pode ser distinguida das demais pela orientação póstero-lateral da maxila inferior e número total de vértebras (Pavanelli & Britski, 1999).

Steindachnerina corumbae possui distribuição restrita ao sistema do rio Paranaíba superior, bacia do alto rio Paraná, onde vive em simpatria com *S. insculpta*. *Steindachnerina brevipinna* tem sua distribuição registrada nas bacias dos rios Paraguai, Paraná e baixo rio Uruguai (Vari, 2003).

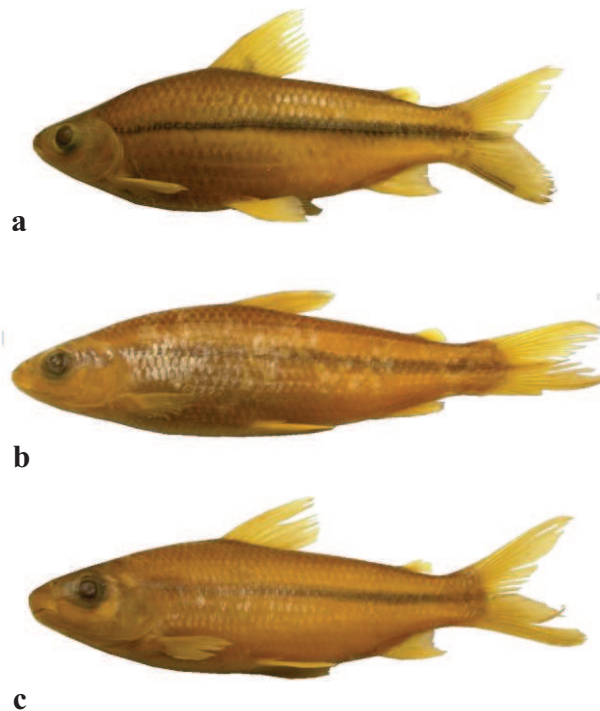


Figura 4 - (a) *Steindachnerina brevipinna*, NUP 4594, 108,6 mm CP, planície de inundação do alto rio Paraná, bacia do alto rio Paraná. (b) *Steindachnerina corumbae*, NUP 1202, 77,3 mm CP, rio Corumbá, bacia do alto rio Paraná (c) *Steindachnerina insculpta*, NUP 451, 43,5 mm CP, planície de inundação do alto rio Paraná, bacia do alto rio Paraná

Schizodon borellii*, *Schizodon fasciatus*, *Schizodon intermedius* e *Schizodon nasutus

A espécie *Schizodon borellii* (Boulenger, 1900) (Figura 5a) está registrada nas bacias dos rios Paraná-Paraguai, *Schizodon fasciatus* (Figura 5b) para bacias do rio Amazonas e Guiana Francesa, *Schizodon nasutus* Kner, 1858 (Figura 5c) para bacias dos rios Paraná-Paraguai e Uruguai (Britski & Garavello, 2007). Garavello & Britski (1990) descreveram *Schizodon intermedius* para bacia do alto rio Paraná, espécie bastante similar a *S. borellii*.

Schizodon nasutus diferencia-se das outras espécies com alguns caracteres morfológicos acentuados como a posição da boca subterminal, focinho proeminente e padrão de colora o do corpo diferenciada, apresentando uma mancha escura transversalmente alongada no pedúnculo caudal que se prolonga sobre a linha lateral. As outras espécies são mais próximas morfolologicamente. *Schizodon fasciatus* pode ser distinguida por apresentar quatro faixas escuras verticais no corpo e uma mancha caudal escura, distintamente separada da última faixa vertical localizada acima da nadadeira anal (Géry, 1977). *Schizodon borellii* e *S. intermedius* apresentam quatro faixas transversais escuras sobre o corpo, porém, diferenças relacionadas a medidas em rela o ao comprimento padrão e comprimento do pré-maxilar,

largura da mandíbula e espaço interorbital em relação ao comprimento da cabeça (Garavello & Britski, 1990) podem ser observadas.

As sequências COI dos indivíduos de *S. fasciatus* e *S. intermedius*, que foram utilizados no trabalho, estavam disponíveis no *Genbank* com número de acesso: FJ440621 e EU185605, respectivamente.

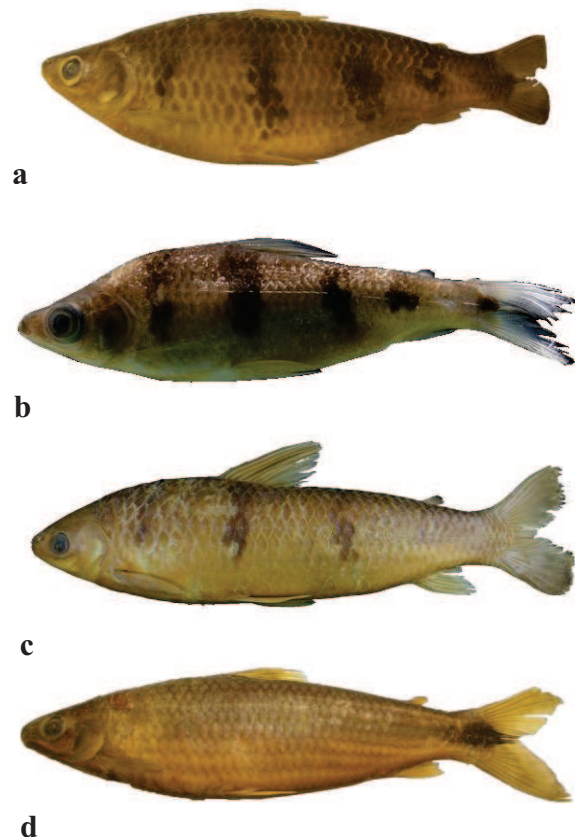


Figura 5 - (a) *Schizodon borellii*, NUP 9724, 254,9 mm CP, planície de inundação do alto rio Paraná, bacia do alto rio Paraná. (b) *Schizodon fasciatus*, 86,3 mm CP, MUSM 33738, bacia do rio Amazonas. Foto por Buitrago-Suárez. (c) *Schizodon intermedius*, 295 mm CP, bacia do alto rio Paraná. (d) *Schizodon nasutus*, NUP 8833, 208,5 mm CP, afluente do rio Paranaíba, bacia do alto rio Paraná

Leporinus aff. elongatus, Leporinus friderici e Leporinus obtusidens

O gênero *Leporinus* Agassiz, 1829 inclui espécies capazes de realizar grandes migrações, como *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836) com distribuição nas bacias dos rios Paraná, La Prata e São Francisco e outras de migração curta, por exemplo, *Leporinus friderici* (Bloch, 1794) (Agostinho *et al.*, 2003), registrada para ambientes das bacias dos rios Paraná-Paraguai e São Francisco. Na planície de inundação do alto rio Paraná, um espécime com características morfológicas semelhantes à *L. elongatus* foi coletado e analisado, porém

de acordo com Britski & Garavello (2007), esta espécie ocorre somente nos rios Jequitinhonha e São Francisco. Dessa maneira, o indivíduo examinado neste estudo foi denominado de *L. aff. elongatus*.

As espécies, *L. aff. elongatus*, *L. friderici* e *L. obtusidens* (Figura 6), apesar de apresentarem características morfológicas semelhantes, como contagens das escamas perfuradas da linha lateral, raios ramificados das nadadeiras e proporções corporais em relação ao comprimento corporal. Por sua vez, o padrão de colorido é um caráter concludente utilizado por Garavello (1979) para definir variados grupos dentro do gênero.

Apesar de apresentarem nadadeiras amareladas e três manchas escuras arredondadas sobre a linha lateral, em *L. friderici* as manchas são alongadas horizontalmente, a região superior do olho é avermelhada e a região de contato entre algumas escamas das séries abaixo da linha lateral são alaranjadas ou avermelhadas. *Leporinus obtusidens* era tradicionalmente chamado de *L. elongatus* na bacia do alto rio Paraná (Garavello, 1979). Em *L. obtusidens* e *L. elongatus*, as manchas são verticalmente alongadas e diferenciam-se pela posição da boca (terminal vs. subterminal, respectivamente) (Graça & Pavanelli, 2007).

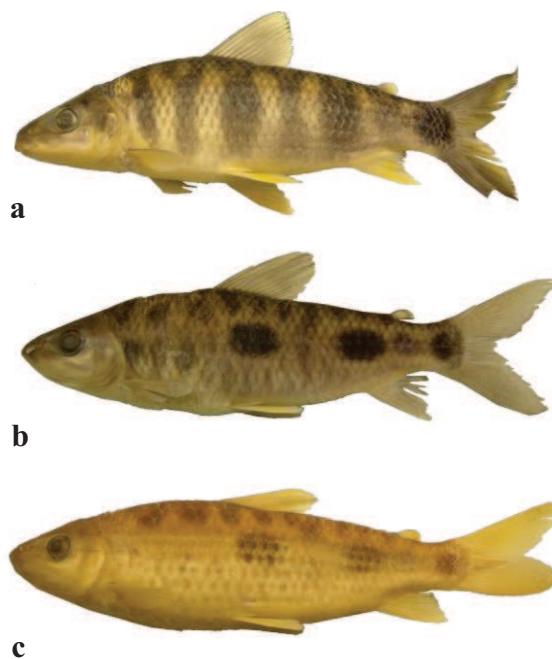


Figura 6 - (a) *Leporinus elongatus*, NUP 11092, 167,7 mm CP, planície de inundação do alto rio Paraná, bacia do alto rio Paraná. (b) *Leporinus friderici*, NUP 11084, 116,6 mm CP. (c) *Leporinus obtusidens*, NUP 9371, 130,1 mm CP, rio Verde, bacia do rio Ivinheima

2.2 Extração e quantificação do DNA

Para extração do DNA seguiu-se o protocolo de Monesi *et al.* (1998), com algumas modificações (Prioli *et al.*, 2002). Aproximadamente 100 mg de tecido muscular foram macerados na presença de nitrogênio líquido. Em seguida foram homogeneizadas em 500 µL de tampão TH (Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, sacarose 5% e espermina 0,15 mM) mais 500 µL de tampão PS (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e sacarose 5%) e 5 µL de proteinase K (20 µg/µL) em banho maria com agitação a 37°C por aproximadamente duas horas. O DNA foi purificado com fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio. Foi precipitado com solução salina (0,2M NaCl) e etanol absoluto gelado. A incubação ocorreu a -20°C por 24 horas. O precipitado foi submetido a lavagens com etanol 70% e 100% por centrifugação de 5 minutos a 12.000 rpm. Posteriormente o *pellet* obtido foi ressuscitado em 50 µL de tampão TE (1 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA), com RNase (20 mg/mL) e estocado a -20°C.

A quantificação do DNA presente em cada amostra foi realizada por meio visual através da comparação com quantidades conhecidas de DNA do fago λ (Invitrogen). Foi utilizado gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídeo (20 µg/100 mL) e fotografado sob luz ultravioleta no *software* Kodak EDAS-290.

2.3 Amplificação por PCR do DNA mitocondrial

DNA individual foi utilizado para amplificação de fragmentos do gene COI com os *primers* descritos por Ward *et al.* (2005) e termociclador MJ Research PT100. As condições para a reação de PCR foram descritas por Prioli *et al.* (2002). A mistura de reação para PCR foi constituída de Tris-KCl (20 mM Tris-HCl pH 8,4 com 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 2,5 mM de cada *primer* (FishF1-5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3' e FishR1-5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3'), 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 15 ng de DNA e água millique para completar o volume para 25 µL. Para cada exemplar foi realizada duas reações independentes e um controle negativo em cada experimento, consistindo de reação de PCR sem DNA. A programação foi 94°C por 2 minutos, seguidos de 34 ciclos a 94°C por 30 segundos, 52 a 56°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram quantificados em gel de agarose (1%) e os comprimentos foram determinados por comparação com o padrão *Ladder* 100 pb (Invitrogen).

Posteriormente, as amostras foram purificadas usando-se polietileno glicol (PEG) para eliminação do excesso de *primers* e resíduos de nucleotídeos segundo protocolo de Rosenthal *et al.* (1993) e armazenadas a -20°C .

2.4 Sequenciamento e análise dos dados

O produto final obtido de cada reação de PCR foi utilizado diretamente para o sequenciamento em plataforma MegaBace (Amersham), de acordo com as instruções do fabricante. As sequências nucleotídicas foram editadas manualmente e alinhadas em *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994) com o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.1* (Hall, 1999).

Todas as análises foram realizadas no programa *MEGA 4.0* (Tamura *et al.*, 2007) e conduzidas separadamente de acordo com os gêneros amostrados. Para o cálculo das distâncias, os indivíduos de cada espécie formaram grupos diferenciados. As diversidades intra-específicas foram obtidas pela média dentre todos os indivíduos de cada espécie e as distâncias interespecíficas foram estimadas entre os diferentes grupos de espécies e analisaram-se todos os possíveis pares formados dentro de cada gênero. Os pares de espécies puderam ser diferenciados se a diferença genética interespecífica for pelo menos dez vezes maior que a maior distância intra-específica (Herbert *et al.*, 2004).

As análises foram feitas através do modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-Parâmetros (K2P; Kimura, 1980). As árvores filogenéticas foram construídas pelo algoritmo *neighbor-joining* (NJ) com suporte de 10.000 *bootstrap*. Esses parâmetros foram propostos por Hebert *et al.* (2003) como metodologia padrão para as análises do *DNA barcoding*, baseado nos pressupostos de que o modelo evolutivo é eficaz quando distâncias genéticas são baixas (Nei & Kumar, 2000) e o algoritmo é eficiente e rápido em análises de espécies em larga escala (Kumar & Gadagkar, 2000).

3 RESULTADOS

A amplificação e o sequenciamento do gene COI foram realizados com 97 indivíduos. Além disso, sequências de outras três espécies foram obtidas do *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Após a edição e alinhamento das sequências, juntamente com os indivíduos utilizados dos bancos de dados, obteve-se fragmentos em média de 535 pb

(variação 510 – 600 pb). Não foram observados *indels* ao longo das sequências ou códons de terminação após a tradução, o que sustenta a funcionalidade da sequência mitocondrial COI. A proporção das bases nitrogenadas adenina+timina foi maior do que guanina+citosina em todos os gêneros analisados (Tabela 2).

Conforme observado na tabela 2, os diferentes gêneros obtiveram quantidades variadas de sítios polimórficos sendo em menor número em *Potamotrygon* e maior em *Leporinus*. Em geral, os haplótipos formados não foram compartilhados pelos pares de espécies, exceto entre alguns exemplares de *P. falkneri* e *P. motoro* e entre alguns indivíduos de *S. borellii* e *S. intermedius*. Em relação a diferentes locais de coleta foi observado o compartilhamento de haplótipos em indivíduos de *Pseudoplatystoma corruscans* amostrados na planície de inundação do alto rio Paraná e no rio Manso, bacia do alto rio Paraguai.

Tabela 2 - Polimorfismo nucleotídico das sequências do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase subunidade I de espécies de peixes dos gêneros *Potamotrygon* (PTGf: *P. falkneri*; PTGm: *P. motoro*), *Zungaro* (Zg-jahu: *Z. jahu*; Zg-zun: *Z. zungaro*), *Pseudoplatystoma* (PTD: *P. corruscans*; PFA: *P. punctifer*; PCA: *P. reticulatum*), *Salminus* (Sal-br: *S. brasiliensis*; Sal-fran: *S. franciscanus*; Sal-hi: *S. hilarii*), *Steindachnerina* (St-bv: *S. brevipinna*; St-co: *S. corumbae*; St-ip: *S. insculpta*), *Schizodon* (Sch-bo: *S. borellii*; Sch-fas: *S. fasciatus*; Sch-int: *S. intermedius*; Sch-na: *S. nasutus*) e *Leporinus* (Le-elon: *L. elongatus*; Le-fri: *L. friderici*; Le-obt: *L. obtusidens*). Destacado com asterisco o tamanho do fragmento, em pares de base, e proporção das bases nitrogenada

(continua)

Gênero	Espécie (Número)	Hapló-tipo	Sítios nucleotídicos	Locais de coleta
<i>Potamotrygon</i>	PTGf (7) PTGm(1) PTGm (5) PTGm (1)	Hapl-1 Hapl-2 Hapl-3	23 602 644	rio Paraná " "
			TCA	
			CT.	
			CTG	
			* 543pb / A = 28,8%; T = 26,0%; C = 30,3%; G = 14,8%	
<i>Zungaro</i>	Zg-jahu (6) Zg-jahu (2) Zg-zun (2)	Hapl-1 Hapl-2 Hapl-3	1222233444445 671455946112371 970358189470829	" " rio Tocantins
			TAAGGACGGGTTGTA	
		C	
			CGGAAGTAAACCAC.	
			* 546pb / A = 25,5%; T = 28,3%; C = 27,3%; G = 18,9%	
<i>Pseudoplatystoma</i>	PTD (7) PTD (1) PTD (2) PCA (4) PCA (1) PFA (1)	Hapl-1 Hapl-2 Hapl-3 Hapl-4 Hapl-5 Hapl-6	11122222223333333344445555 115572371122259990011467826880235 561250870325851470328365435364573	rio Paraná e Manso rio Paraná rio Manso " " rio Amazonas
			GCCCTAACATGGTACGCCTGGTGATGGGCTTGT	
		A.....	
			.T.....A.....	
			A..TCGGA.CATCGTCTTC.ACAGCAAATCCAC	
			A..TCGGAGCATCGTCTTC.ACAGCAAATCCAC	
			A.T.CGGA.CATCGTCTTC.ACAGCAAATCCAC	
			* 600pb / A = 27,0%; T = 28,0%; C = 27,6%; G = 17,4%	
<i>Salminus</i>	Sal-fran (3) Sal-hi (4) Sal-br (2) Sal-br (2) Sal-br (1)	Hapl-1 Hapl-2 Hapl-3 Hapl-4 Hapl-5	11111111112222333333444444 1123778112334457735680245667122236 2846587573581491712120727365106958	rio São Francisco rio Paraná " " "
			TGTC AATCGTCGCCAGGCGGCTGCACAGAAGGA	
			.ACTG.CTACTATTT.AA.AAT..TGTGAGGAAG	
			CACTGGCTA.TATT..AAAAA..ATGT.AG.AA.	
			CACTGGCTA.TATT..AAAAA.C.TGT.AG.AA.	
			CACTGGCTA.TATT.GAAAAA.C.TGT.AG.AA.	

A maioria das alterações das bases nucleotídicas constituiu-se de transição e foram observadas na terceira posição do códon. Como esperado, as mudanças nessa posição não resultaram em troca de aminoácidos, exceto em dois exemplares da espécie *Z. jahu* (Zg-jahu 06 e Zg-jahu 05) que apresentaram substituição de fenilalanina na posição 173. Foram verificadas apenas quatro alterações de bases na segunda posição do códon e todas resultaram em alterações aminoacídicas. Duas ocorreram no gênero *Schizodon*, sendo uma substituição de treonina na posição nove em um indivíduo de *S. intermedius* (Sch-int) e outra de serina na posição 142 em um exemplar de *S. borellii* (Sch-bo 11). O restante das alterações foi registrado para o gênero *Steindachnerina*, a espécie *S. corumbae* teve uma substituição de treonina no sítio 153 e um exemplar de *S. insculpta* (St-ip 11) apresentou substituição de asparagina no sítio 146.

Em todos os gêneros analisados, as médias das distâncias genéticas intra-específicas foram baixas variando de 0 a 0,3%, já os valores interespecíficos estiveram em diferentes patamares variando de 0,3 a 16,8%. (Tabela 3). Concomitante com os resultados observados quanto aos sítios polimórficos, as espécies de *Potamotrygon* e *Leporinus* obtiveram as menores e maiores médias de distâncias genéticas, respectivamente.

Outros gêneros que apresentaram valores de distância genética interespecífica baixa, sendo menor ou igual a 2%, foram *Steindachnerina*, *Schizodon*, *Salminus* e *Pseudoplatystoma*. Juntamente com *Leporinus*, os gêneros que também tiveram altas distâncias interespecíficas foram *Steindachnerina* e *Schizodon* com valores próximos ou superiores a 10%. Não foi possível calcular alguns valores de diversidades intra-específicas pela presença de apenas um indivíduo. As espécies que não atingiram o limiar de dez vezes necessário para diagnosticá-las foram: *P. falkneri* e *P. motoro*, *P. reticulatum* e *P. punctifer*, *S. brasiliensis* e *S. hilarii*, *S. brevipinna* e *S. insculpta*, além de três espécies do gênero *Schizodon*, *S. borellii*, *S. intermedius* e *S. fasciatus*, que não separaram se analisadas par a par.

Tabela 3 - Valores médios de distâncias genéticas, em porcentagem, obtidas com o modelo K2P de sequências parciais do gene citocromo *c* oxidase subunidade I de espécies de peixes dos gêneros *Potamotrygon* (PTGf: *P. falkneri*; PTGm: *P. motoro*), *Zungaro* (Zg-jahu: *Z. jahu*; Zg-zun: *Z. zungaro*), *Pseudoplatystoma* (PTD: *P. corruscans*; PFA: *P. punctifer*; PCA: *P. reticulatum*), *Salminus* (Sal-br: *S. brasiliensis*; Sal-fran: *S. franciscanus*; Sal-hi: *S. hilarii*), *Steindachnerina* (St-bv: *S. brevipinna*; St-co: *S. corumbae*; St-ip: *S. insculpta*), *Schizodon* (Sch-bo: *S. borellii*; Sch-fas: *S. fasciatus*; Sch-int: *S. intermedius*; Sch-na: *S. nasutus*) e *Leporinus* (Le-elon: *L. elongatus*; Le-fri: *L. friderici*; Le-obt: *L. obtusidens*) Destacado em negrito, valores das distâncias intra-específicas

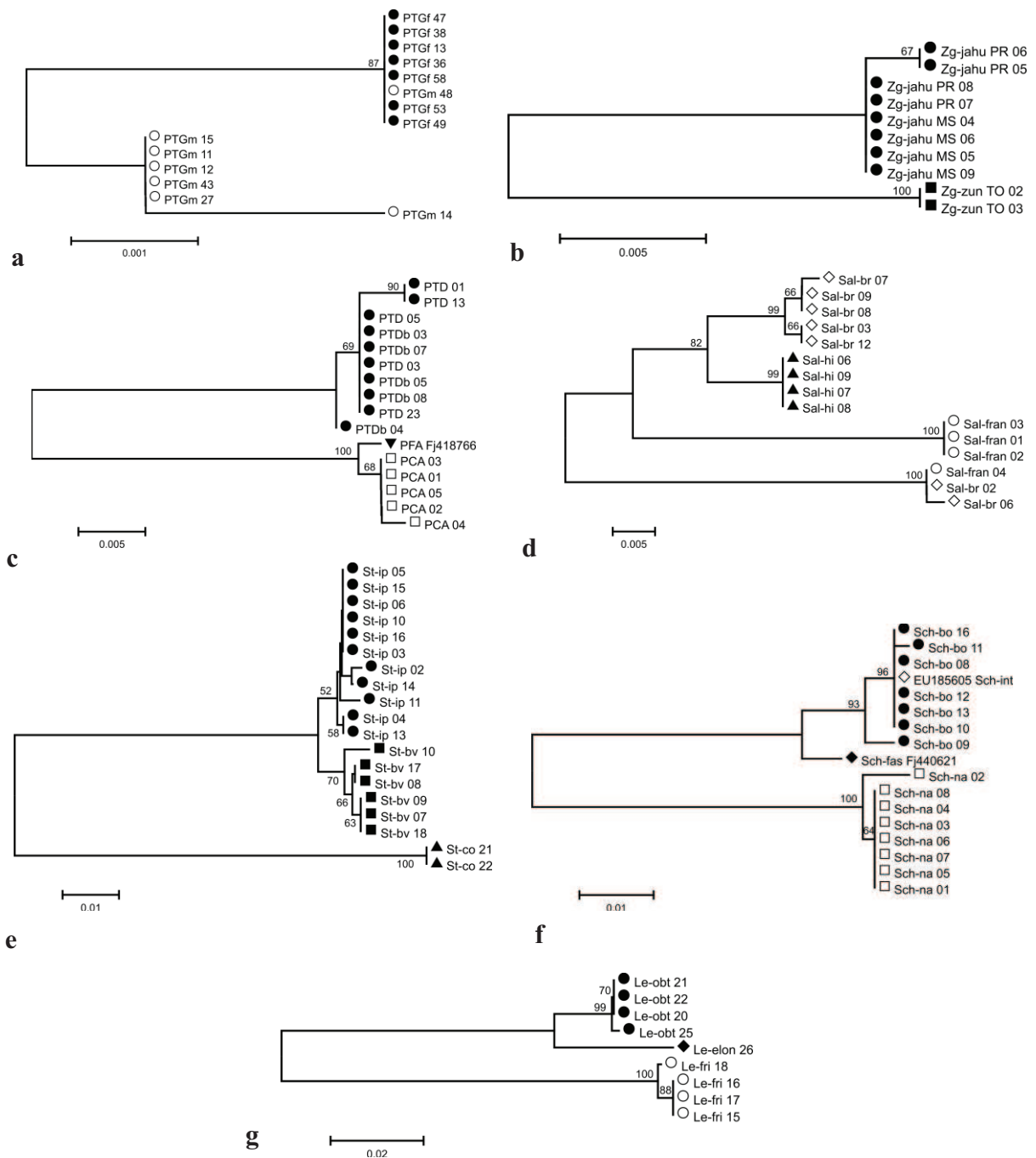
Gênero	Espécie	Distância			
		1	2	3	4
<i>Potamotrygon</i>	[1] PTGf	0			
	[2] PTGm	0,3	0,2		
<i>Zungaro</i>	[1]Zg-jahu	0,1			
	[2]Zg-zun	2,7	0		
<i>Pseudoplatystoma</i>	[1]PTD	0,2			
	[2]PCA	5,2	0,1		
	[3]PFA	5,1	0,4	n/c	
<i>Salminus</i>	[1]Sal-br	0,3			
	[2]Sal-hi	2,0	0		
	[3]Sal-fran	5,4	5,8	0	
<i>Steindachnerina</i>	[1] St-bv	0,3			
	[2] St-ip	1,2	0,2		
	[3] St-co	13,6	13,1	0	
<i>Schizodon</i>	[1] Sch-bo	0,3			
	[2]Sch-fas	1,8	n/c		
	[3]Sch-int	0,1	1,8	n/c	
	[4]Sch-na	9,5	8,8	9,6	0,2
<i>Leporinus</i>	[1] Le-elon	n/c			
	[2] Le-fri	16,8	0,2		
	[3] Le-obt	3,9	15,5	0,1	

Fonte: Elaborado pelo autor, 2011.

As relações filogenéticas usando o algoritmo NJ (Figura 7) formaram diferentes clados de acordo com o enquadramento taxonômico em nível de espécie, exceto em *Potamotrygon* que houve a inclusão de um indivíduo híbrido detectado por Maniglia (2010) e identificado previamente como *P. motoro* (PTGm 48) no clado de *P. falkneri*. Também houve a formação de um clado com os exemplares de *S. borellii* e *S. intermedius*. Pela maior proximidade genética, pode ser observado um agrupamento das espécies com maior similaridade morfológica, como observado na árvore filogenética em *Leporinus* pela formação de um grupo com *L. obtusidens* e *L. elongatus*, em *Pseudoplatystoma* com *P. punctifer* e *P. reticulatum* e em *Steindachnerina* com *S. brevipinna* e *S. insculpta*.

Como pode ser observado na Figura 7d, houve a formação de um clado composto por dois exemplares previamente identificados como *S. brasiliensis* (Sal-br 02; Sal-br 06) e um de *S. franciscanus* (Sal-fran 04). Este clado apresentou baixa distância genética entre esses indivíduos, no entanto, quando comparado com os outros grupos a distância genética foi de 7%. Dada a essa discrepância nos níveis de diversidade genética e a ausência de indícios que sustentem a identificação incorreta dos exemplares (não foram preservados como testemunho), esses indivíduos foram retirados das análises estatísticas de distância genética e na construção da tabela de polimorfismo para não interferir nos resultados.

Figura 7 - Árvores filogenéticas utilizando o algoritmo *neighbor-joining* obtidas com o modelo K2P a partir da sequência parcial do gene citocromo c oxidase subunidade I. Números acima das ramificações representam os valores de *bootstrap*. (a) *Potamotrygon* (PTGf: *P. falkneri*; PTGm: *P. motoro*), (b) *Zungaro* (Zg-jahu: *Z. jahu*; Zg-zun: *Z. zungaro*), (c) *Pseudoplatystoma* (PTD: *P. corruscans*; PFA: *P. punctifer*; PCA: *P. reticulatum*), (d) *Salminus* (Sal-br: *S. brasiliensis*; Sal-fran: *S. franciscanus*; Sal-hi: *S. hilarii*), (e) *Steindachnerina* (St-bv: *S. brevipinna*; St-co: *S. corumbae*; St-ip: *S. insculpta*), (f) *Schizodon* (Sch-bo: *S. borellii*; Sch-fas: *S. fasciatus*; Sch-int: *S. intermedius*; Sch-na: *S. nasutus*) e (g) *Leporinus* (Le-elon: *L. elongatus*; Le-fri: *L. friderici*; Le-obt: *L. obtusidens*)



4 DISCUSSÃO

A identificação precisa das espécies é um dos fatores fundamentais para o estudo de qualquer unidade biológica. A variabilidade ou a riqueza de espécies de uma dada região é importante para a veracidade dos trabalhos, já que muitas vezes se baseiam nos aspectos quantitativos e qualitativos da biodiversidade. Para formar um sistema único de identificação e descrição das espécies, Hebert *et al.* (2003) propuseram que o acesso ao polimorfismo do DNA deixe de ser uma base de apoio para tornar-se uma metodologia padrão. Algumas análises simples devem ser conduzidas para avaliar a potencialidade das sequências COI na identificação das espécies como descrito por Hebert *et al.* (2004). Em primeira instância é necessário verificar se duas ou mais espécies compartilham a mesma sequência nucleotídica e posteriormente conferir o pressuposto de que a diversidade intra-específica é muito menor do que o valor interespecífico.

Com relação à primeira análise, os pares de espécies de peixes estudados não se enquadram em sua totalidade em um padrão satisfatório ao sistema de identificação, já que alguns indivíduos de *P. falkneri* apresentaram exatamente a mesma sequência nucleotídica de um espécime de *P. motoro*, assim como indivíduos de *S. borellii* e *S. intermedius*, não permitindo a discriminação correta destas espécies. Outras 13 espécies de peixes do Canadá também não foram diagnosticadas pelo COI, devido à ausência ou baixo polimorfismo (Steinke *et al.*, 2009) apresentado por elas. Resultados similares podem ser observados em outros grupos, como nos octocorais, nos quais McFadden *et al.* (2011) encontraram um índice de 18,5% de pares de espécies congênicas que compartilharam o mesmo haplótipo.

Baseado no segundo teste foi possível observar que a magnitude de divergência dentro e entre as espécies esteve em diferentes patamares em alguns conjuntos congênicos, apresentando esses valores com alta discrepância e em outros com baixa ou nenhuma diferença. Dada a heterogeneidade dos processos evolutivos, as propriedades biológicas não ocorrem de modo ordenado e podem produzir situações nos quais as espécies mostram graus diferentes de divergência (Padiál & La Riva, 2010). Os níveis de diversidade genética em patamares diferenciados já foram constatados em outros trabalhos. Os autores da proposta de identificação através do *DNA barcoding*, Hebert *et al.* (2004) registraram um alto nível de divergência interespecífica para sequências COI com base em espécies e gêneros de pássaros. Esses níveis discrepantes foram refutados por Johnson & Cicero (2004) que encontraram valores inferiores para diferenças interespecíficas e superiores para intra-específicas.

Alguns pares de espécies apresentaram os valores de diversidade genética típicos de distâncias coespecíficas e congênicas, já em outros pares foram obtidos altos valores interespecíficos sendo equivalentes a níveis de separação de família. A comparação pode ser feita com base em diversos estudos de peixes dos quais foi encontrada variabilidade para indivíduos da mesma espécie, gênero e família, com valores respectivamente de 0,4%, 8% e 20,2% em teleósteos dulcícolas de Cuba (Lara *et al.*, 2010), 0,27%, 8,37% e 15,38% em peixes da região do Canadá (Hubert *et al.*, 2008) e 0,39%, 9,93% e 15,46% em peixes marinhos da Austrália (Ward *et al.*, 2005).

Os resultados de diversidade intra e interespecífica são de fundamental importância por constituírem a base do processo de identificação do *DNA barcoding* através da diferença de um limiar estipulado de 10X entre esses dois valores. Este tipo de padronização já foi criticado anteriormente por Nielsen & Matz (2006), que ressaltaram a necessidade da utilização de outros métodos estatísticos para assegurar que a sequência obtida do espécime em pesquisa seja suficientemente similar a outra sequência presente em um banco de dados.

No presente estudo, *Zungaro* e *Leporinus* foram os únicos grupos que apresentaram valores de diversidade acima do limiar para todas as espécies analisadas. Para o gênero *Zungaro* foi estimada diversidade interespecífica suficiente para diferenciar as duas espécies, mas baixo quando comparado com valores de outros peixes de água doce (Valdez-Moreno *et al.*, 2009). Em relação ao gênero *Leporinus*, os valores inferiores de diversidade genética entre *L. aff. elongatus* e *L. obtusidens* comparado com *L. friderici* podem ser associados à maior proximidade morfológica das duas primeiras espécies.

Alguns pares de espécies de *Pseudoplatystoma*, *Salminus*, *Steindachnerina* e *Schizodon* também puderam ser diferenciados através do *DNA barcoding* e apresentaram caracteres morfológicos ou área de distribuição que facilitam sua identificação. Esses grupos que alcançaram o limite estipulado pelo CBoL para separação das espécies se enquadram em muitos outros alvos do programa, que não necessitam de investimento molecular de maneira prioritária para identificação. Dessa maneira, a identificação das espécies pode ser facilmente realizada em campo, sem a necessidade de recorrer às técnicas moleculares (Urta *et al.*, 2007; Coelho & Erzini, 2008; Godbout *et al.*, 2009).

Em contraste, as espécies dos gêneros *Potamotrygon* (*P. falkneri* e *P. motoro*), *Pseudoplatystoma* (*P. reticulatum* e *P. punctifer*), *Salminus* (*S. brasiliensis* e *S. hilarii*), *Steindachnerina* (*S. brevipinna* e *S. insculpta*) e *Schizodon* (*S. borellii*, *S. intermedius*, *S. fasciatus*) não puderam ser distinguidas pela sequência COI. A maioria das espécies dentro de cada gênero apresenta estreita relação morfológica, exceto *S. brasiliensis* e *S. hilarii*, mas

todas possuem alguns caracteres conspícuos que facilitam sua identificação, como exemplo pelo padrão de colorido.

Os indivíduos previamente identificados como *S. brasiliensis* e *S. franciscanus*, que foram retirados das análises do presente trabalho, não possuem regiões de sobreposição quanto à distribuição geográfica e apresentaram níveis de polimorfismo genético discrepantes. Esses dados sustentam novos questionamentos sobre o correto enquadramento taxonômico desses indivíduos, com possibilidade de pertencerem a uma nova espécie ou outra ainda não registrada nos locais amostrados.

Schizodon fasciatus, uma das espécies do gênero *Schizodon* que não foi identificada pela diversidade genética, pode ser diferenciada das demais congêneres através do padrão de manchas escuras no corpo. Alta similaridade genética e morfológica pode ser encontrada nas outras duas espécies, *S. borellii* e *S. intermedius*, fato ilustrado pelo valor nulo de distância interespecífica e pela sobreposição de diversos caracteres morfológicos (Garavello & Britski, 1990). Esses resultados podem ser indícios de que *S. borellii* e *S. intermedius*, pertencem à mesma espécie ou possíveis erros de identificação do espécime pode ter ocorrido. Para reais conclusões, trabalhos que envolvam análises morfométricas aliados ao acesso do polimorfismo do DNA com diferentes marcadores, como o *D-loop* (Pie *et al.*, 2009) e outros marcadores nucleares (McMahan *et al.*, 2010) devem ser realizados.

Esses grupos que não foram distinguidos pela biologia molecular revelam a fragilidade de determinar somente uma porção do genoma para análises de identificação. Muitos outros estudos também mostram taxas altas de erro na identificação através do COI, como por exemplo, entre algumas espécies estudadas de *Potamotrygon*, que apresentaram erro de 40% (Toffoli *et al.*, 2008), espécies de moluscos com 17% (Meyer & Paulay, 2005) e espécies de insetos com erro de 30% (Meier *et al.*, 2006). Assim, o uso exclusivo de *DNA barcoding* poderá, com frequência, falhar no reconhecimento de espécies crípticas.

As altas frequências de falha no reconhecimento das espécies analisadas podem ser atribuídas à magnitude de divergência nas sequências COI que não corresponde aos pressupostos do projeto CBoL. A porcentagem de erros pode ser ainda maior já que muitos grupos apresentam variação intra-específica maior do que a variabilidade interespecífica (Vogler & Monaghan, 2007).

De acordo com Toffoli *et al.* (2008), a forma simplista das análises também contribui para geração de erros, pois o reducionismo leva a maiores taxas de fracasso em comparação com os métodos que incorporam várias fontes de informação. Além disso, alguns procedimentos práticos de metodologia ou outras propriedades inerentes a sequência COI são

empecilhos que levarão a resultados incorretos como contaminação do material biológico, paralogia, transferência horizontal de genes e erros de identificação em bancos de dados (Solé-Cava & Wörheide, 2007). Outra falha em potencial é a impossibilidade de acessar eventos de hibridização pela herança uniparental do mtDNA. Nos gêneros analisados, a hibridização foi constatada em estudos anteriores em *Potamotrygon* (Maniglia, 2010), *Pseudoplatystoma* (Bignotto *et al.*, 2009) e *Steindachnerina* (Oliveira *et al.*, 2002).

A escolha de um gene para representar toda a biodiversidade foi proposta e explorada inicialmente em regiões temperadas, as quais possuem uma biodiversidade significativamente menor comparando com regiões tropicais, além de menor divergência das sequências entre as populações (Turner, 2004; Moritz & Cicero, 2004), o que dificulta o estabelecimento de um patamar único que leva em conta basicamente o índice de diversidade genética. As dificuldades, ou impossibilidades, do reconhecimento do que é variação interespecífica e o que é variação intra-específica e o estabelecimento do correto patamar da variabilidade genética sempre representarão obstáculos para a resolução taxonômica baseada somente em uma porção mínima do genoma.

Para testar a subestimação da variabilidade intra-específica e superestimação da variabilidade interespecífica das sequências COI, Hebert *et al.* (2004) estudaram de um a três exemplares de cada espécie de pássaro e algumas com pontos de amostragem distantes. Puderam concluir que a diversidade genética e a distância geográfica eram independentes. A quantidade de indivíduos amostrados durante o desenvolvimento deste trabalho, em alguns grupos foi superior ao trabalho de Hebert *et al.* (2004) e pontos distantes como do gênero *Pseudoplatystoma* não acrescentaram diferentes resultados. Por outro lado, a análise de alguns grupos com baixo número de exemplares está de acordo com a proposta do sistema de identificação através do *DNA barcoding*, a qual se baseia na utilização de apenas um indivíduo para a identificação específica.

O acesso dos parâmetros genéticos traz benefícios inquestionáveis e extremamente necessários para taxonomia como em revelações de espécies crípticas e estruturação populacional (Guschanski *et al.*, 2007; Hirose *et al.*, 2010; Nygren *et al.*, 2010). Da mesma forma, o *DNA barcoding* pode ser aplicado em diversos grupos com empecilhos taxonômicos ou impossibilidade de identificação através da morfologia (Machida *et al.*, 2009; Dunn *et al.*, 2010). Porém, para Rubinoff (2006), a aplicação do conceito de “*DNA barcoding species*” certamente falha sobre a constituição de espécie pela forma numérica e baseada em afirmação e negação de identificação ao invés de acoplar dados morfológicos ou ecológicos.

Outras áreas como a ecologia, filogeografia, etologia e desenvolvimento também podem auxiliar na resolução de problemas taxonômicos. A junção desses diversos campos foi concretizada por Dayrat (2005) como uma “taxonomia integrativa” a qual busca delimitar unidades biológicas por perspectivas múltiplas e complementares, utilizada com frequência em estudos recentes para diversos grupos (Capa *et al.*, 2010; Damm *et al.*, 2010; Germann *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2010).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A padronização do DNA *barcoding* como ferramenta automatizada pode ser empregada com êxito em inúmeros casos que integram o “impedimento taxonômico” como na identificação de ovos e larvas (Valdez-Moreno *et al.*, 2010), microorganismos (Machida *et al.*, 2009), conteúdos estomacais (Dunn *et al.*, 2010) e espécies com plasticidade fenotípica (Reece *et al.*, 2008). Além de facilitar e viabilizar a identificação da biodiversidade para população em geral, ponto chave em Janzen (2010) que afirma que parte da diversidade poderá ser conservada ou preservada somente se agregada à sociedade, ou seja, é necessário conhecer seus componentes para estimular encanto e curiosidade.

A metodologia adotada revelou significativas diferenças genéticas, como em *Salminus*, e semelhanças em *Schizodon*, que auxiliarão no direcionamento de estudos com outras ferramentas moleculares ou em âmbito taxonômico. Entretanto, a aplicação isolada da técnica será ineficiente para revelar muitos casos de diversidade oculta, uma vez que não tem resolução para diferenciar muitos pares de espécies próximas de peixes neotropicais.

No emprego da metodologia também pode ocorrer erros graves difíceis de solucionar (Buhay, 2009) além da ausência de embasamento científico (Ebach & de Carvalho, 2010). Dessa maneira, o *DNA barcoding* deve ser aplicada com cautela para identificação e descrição microgenômica da biodiversidade, mas o polimorfismo nas sequências COI inserido em trabalhos de sistemática molecular, concomitante com outras áreas, pode contribuir para a solução dos impedimentos taxonômicos.

REFERÊNCIAS

- Abell, R., M. L. Thieme, C. Revenga, M. Bryer, M. Kottelat, N. Bogutskaya, B. Coad, N. Mandrak, S. C. Balderas, W. Bussing, M. L. J. Stiassny, P. Skelton, G. R. Allen, P. Unmack, A. Naseka, R. Ng, N. Sindorf, J. Robertson, E. Armijo, J. V. Higgins, T. J. Heibel, E. Wikramanayake, D. Olson, H. L. López, R. E. Reis, J. G. Lundberg, M. H. P. Sabaj & P. Petry. 2008. Freshwater ecoregions of the world: a new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. *BioScience*, 58: 403-414.
- Abilhoa, V. & L. F. Duboc. 2004. Pp. 581–677. In: S. B. Mikich & R. S. Bérnils (Eds.). Livro vermelho dos animais ameaçados de extinção no estado do Paraná. Curitiba, Mater Natura e Instituto Ambiental do Paraná, 764p.
- Agostinho, A. A., H. F. Júlio Jr., L. C. Gomes, L. M. Bini & C. S. Agostinho. 1997. Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. Pp.179-208. In: Vazzoler, A. E. A. M., A. A. Agostinho & N. S. Hahn (Eds.). A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos. Maringá, Eduem, 460p.
- Agostinho, A. A., L. C. Gomes, H. I. Suzuki & H. F. Júlio Jr. 2003. Migratory fishes of the Upper Rio Paraná Basin, Brazil. Pp. 19-98. In: Carolsfeld, J., B. Harvey, C. Ross & A. Baer (Eds.). Migratory fishes of South America: biology, fisheries, and conservation status. Victoria, World Fisheries Trust/IDRC/World Bank, 372p.
- Bigotto, T. S., A. J. Prioli, S. M. A. P. Prioli, T. C. Maniglia, T. A. Boni, L. C. Lucio, V. N. Gomes, R. A. Prioli, A. V. Oliveira, H. F. Júlio-Junior & L. M. Prioli. 2009. Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River Basin. *Brazilian Journal of Biology*, 62(2): 681-689.
- Boni, T. A. Comparação Molecular de Populações Naturais de Jaú (*Zungaro*) (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) das bacias Amazônicas e do Paraná-Paraguai. Unpublished Ph.D. Dissertation, Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 59p.
- Bortolus, A. 2008. Error cascades in the biological sciences: the unwanted consequences of using bad taxonomy in ecology. *Ambio*, 37(2): 114-118.
- Britski, H. A., K. Z. S. de Silimon & B. S. Lopes. 1999. Peixes do Pantanal: manual de identificação. Brasília, Embrapa, 184p.

- Britski, H. A., J. C. Garavello. 2007. Família Anostomidae. Pp. 23-27. In: Buckup, P. A., N. A. Menezes & M. S. Ghazzi (Eds.). Catálogo das Espécies de Peixes de Água Doce do Brasil. Rio de Janeiro, Museu Nacional, 195p.
- Brown, J. H. & M. V. Lomolino. 1998. Biogeography. Sinauer Press, Sunderland, Massachusetts.
- Buckup, P. A., N. A. Menezes & M. S. Ghazzi (Eds.). 2007. Catálogo das Espécies de Peixes de Água Doce do Brasil. Rio de Janeiro, Museu Nacional, 195p.
- Buhay, J. E. 2009. “COI-like” sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *Journal of Crustacean Biology*, 29(1): 96-110.
- Buitrago-Suárez, U. A. & B. M. Burr. 2007. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa*, 1512: 1-38.
- Capa, M., D. R. Bybee & S. M. Bybee. 2010. Establishing species and species boundaries in *Sabellastarte* Kroyer, 1856 (Annelida: Sabellidae): an integrative approach. *Organisms Diversity & Evolution*, 10(5): 351-371.
- Carvalho, M. R., N. R. Lovejoy & R. S. Rosa. 2003. Family Potamotrygonidae. Pp. 22-28. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr. (Eds.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs, 729p.
- Carvalho, M. R., F. A. Bockmann, D. S. Amorim, C. R. F. Brandao, M. de Vivo, J. L. de Figueiredo, H. A. Britski, M. C. C. de Pinna, N. A. Menezes, F. P. L. Marques, N. Papavero, E. M. Canello, J. V. Crisci, J. D. McEachran, R. C. Schelly, J. G. Lundberg, A. C. Gill, R. Britz, Q. D. Wheeler, M. L. J. Stiassny, L. R. Parenti, L. M. Page, W. C. Wheeler, J. Faivovich, R. P. Vari, L. Grande, C. J. Humphries, R. DeSalle, M. C. Ebach, G & J. Nelson. 2007. Taxonomic Impediment or Impediment to Taxonomy? A Commentary on Systematics and the Cybertaxonomic-Automation Paradigm. *Evolutionary Biology*, 34: 140-143.
- Castelnau, F. L. 1855. Poissons. In: Animaux Nouveaux or Rares Recueillis Pendant l'Expédition dans les Parties Centrales de l'Amérique du Sud de Rio de Janeiro a Lima, et de Lima au Para; Exécutée par ordre du Gouvernement Français Pendant les Années 1843 a 1847. Part 7, *Zoology* 2, i-xii + 1-112, 50p.
- Casu, M., D. Sanna, B. Cristo, T. Lai, G. L. Dedola & M. Curini-Galletti. 2010. COI sequencing as tool for the taxonomic attribution of *Patella* spp. (Gastropoda): the case of morphologically undistinguishable juveniles settled on a *Patella ferruginea* adult.

- Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 90(7), 1449-1454.
- Catanese, G., M. Manchado, A. Fernández-Trujillo & C. Infante. 2010. A multiplex-PCR assay for the authentication of mackerels of the genus *Scomber* in processed fish products. *Food Chemistry*, 122(1): 319-326.
- Coelho, R. & K. Erzini. 2008. Identification of deep water lantern sharks (Chondrichthyes: Etmopteridae) using morphometric data and multivariate analysis. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88(1): 199-204.
- Damm, S., B. Schierwater & H. Hadrys. 2010. An integrative approach to species discovery in odonates: from character-based DNA barcoding to ecology. *Molecular Ecology*, 19: 3881-3893.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85: 407-415.
- Dunn, M. R., A. Szabo, M. S. McVeagh & P. J. Smith. 2010. The diet of deepwater sharks and the benefits of using DNA identification of prey. *Deep-Sea Research I*, 57: 923-930.
- Ebach, M. C. & C. Holdrege. 2005. More taxonomy, not DNA barcoding. *BioScience*, 55: 822-823.
- Ebach, M. C. & M. R. de Carvalho. 2010. Anti-intellectualism in the DNA barcoding enterprise. *Zoologia*, 27(2): 165-178.
- Ekrem, T., E. Stur & P. D. N. Hebert. 2010. Females do count: Documenting Chironomidae (Diptera) species diversity using DNA barcoding. *Organisms Diversity & Evolution*, 10(5): 397-408.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz & R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294-299.
- Fontaneto, D., M. Kaya, E. A. Herniou & T. G. Barraclough. 2009. Extreme levels of hidden diversity in microscopic animals (Rotifera) revealed by DNA taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53: 182-189.
- Francis, C. M., A. V. Borisenko, N. V. Ivanova, J. L. Eger, B. K. Lim, A. Guillén-Servent, S. V. Kruskop, I. Mackie & P. D. N. Hebert. 2010. The Role of DNA barcodes in Understanding and Conservation of Mammal Diversity in Southeast Asia. *PLoS One*, 5(9): 1-12.

- Garavello, J.C. 1979. Revisão taxonômica do gênero *Leporinus* Spix, 1829 (Ostariophysi, Anostomidae). Unpublished Ph.D. Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo. 451p.
- Garavello, J. C. & H. A. Britski. 1990. Duas novas espécies do gênero *Schizodon* Agassiz da Bacia do Alto Paraná, Brasil, América do Sul (Ostariophysi, Anostomidae). São Paulo, Naturalia, 15: 153-170.
- Gaston, K. J. & M. A. O'Neill. 2004. Automated species identification: why not?. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 359: 655-667.
- Germann, C., M. Pollet, S. Tanner, T. Backeljau & M. V. Bernasconi. 2010. Legs of deception: disagreement between molecular markers and morphology of long-legged flies (Diptera, Dolichopodidae). Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 48(3): 238-247.
- Géry, J. 1977. Characoids of the world. New Jersey, Neptune City, T. F. H. Publications, 672p.
- Godbout, J. D., D. D. Aday, J. A. Rice, M. R. Bangs & J. M. Quattro. 2009. Morphological Models for Identifying Largemouth Bass, Spotted Bass, and Largemouth Bass X Spotted Bass Hybrids. North American Journal of Fisheries Management, 29(5): 1425-1437.
- Graça, W. J. & Pavanelli, C. S. 2007. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. Maringá, Eduem, 241 p.
- Griffiths, A. M., D. W. Sims, S. P. Cotterell, A. E. Nagar, J. R. Ellis, A. Lynghammar, M. McHugh, F. C. Neat, N. G. Pade, N. Queiroz, C. Serra-Pereira, T. Rapp, V. J. Wearmouth & M. J. Genner. 2010. Molecular markers reveal spatially segregated cryptic species in a critically endangered fish, the common skate (*Dipturus batis*). Proceedings of the Royal Society B, 277(1687): 1497-1503.
- Guschanski, K., G. Olivieri, S. M. Funk & U. Radespiel. 2007. MtDNA reveals strong genetic differentiation among geographically isolated population of the golden brown mouse lemur, *Microcebus ravelobensis*. Conservation Genetics, 8: 809-821.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41: 95-98.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball & J. R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B, 270: 313-321.
- Hebert P. D. N., M. Y. Stoeckle, T. S. Zemlak & C. M. Francis. 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes. PLoS Biology, 2(10): 1657-1663.

- Hirose, M., Y. Nozawa & E. Hirose. 2010. Genetic Isolation among Morphotypes in the Photosymbiotic Didemnid *Didemnum molle* (Ascidiacea, Tunicata) from the Ryukyus and Taiwan. *Zoological Science*, 27(12): 959-964.
- Hubert, N., R. Hanner, E. Holm, N. E. Mandrak, E. Taylor, M. BurrIDGE, D. Watkinson, P. Dumont, A. Curry, P. Bentzen, J. Zhang, J. April & L. Bernatchez. 2008. Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS ONE*, 3(6) 1-8.
- Janzen, D. H. 2010. Hope for tropical biodiversity through true bioliteracy. *Biotropica*, 42(5): 540-542.
- Javonillo, R., L. R. Malabarba, S. H. Weitzman & J. R. Burnz. 2010. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 498-511.
- Johnson N. K. & C. Cicero. 2004. New mtDNA data affirm the importance of Pleistocene speciation in North American birds. *Evolution*, 58: 1122–1130.
- Johnson, J. A., K. K. Burnham, W. A. Burnham & D. P. Mindell. 2007. Genetic structure among continental and island populations of gyrfalcons. *Molecular Ecology*, 16: 3145-3160.
- Kimura, M. A. 1980. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Kumar, S. & S. R. Gadagkar. 2000. Efficiency of the neighbor-joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large phylogenies. *Journal of Molecular Evolution*, 51: 544-553.
- Lara, A., J. L. P. León, R. Rodríguez, D. Casane, G. Côté, L. Bernatchez & E. García-Machado. 2010. DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Molecular Ecology Resources*, 10: 421-430.
- Lévêque, C., T. Oberdorff, D. Paugy, M. L. J. Stiassny & P. A. Tedesco. 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595: 545-567.
- Lima, F. C. T., L. R. Malabarba, P. A. Buckup, J. F. Pezzi da Silva, R. P. Vari, A. Harold, R. Benine, O. T. Oyakawa, C. S. Pavanelli, N. A. Menezes, C. A. S. Lucena, M. C. S. L. Malabarba, Z. M. S. Lucena, R. E. Reis, F. Langeani, L. Casatti, V. A. Bertaco, C. Moreira & P. H. F. Lucinda. 2003. Genera *Incertae Sedis* in Characidae. Pp. 106-169. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr. (Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Edipucrs, 729p.

- Lima, F. C. T. & H. A. Britski. 2007. *Salminus franciscanus*, a new species from the rio São Francisco basin, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 5(3): 237-244.
- Lohman, D. J., K. K. Ingram, D. M. Prawiradilaga, K. Winker, F. H. Sheldon, R. G. Moyle, P. K. L. Ng, P. S. Ong, L. K. Wang, T. M. Braile, D. Astuti & R. Meier. 2010. Cryptic genetic diversity in “widespread” Southeast Asian bird species suggests that Philippine avian endemism is gravely underestimated. *Biological Conservation*, 143: 1885-1890.
- Lundberg, J. G. & M. W. Littmann. 2003. Family Pimelodidae. Pp. 432-446. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr. (Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Edipucrs, 729p.
- Mabuchi, K., H. Senou & M. Nishida. 2008. Mitochondrial DNA analysis reveals cryptic large-scale invasion of non-native genotypes of common carp (*Cyprinus carpio*) in Japan. *Molecular Ecology*, 17: 796-809.
- Machida, R. J., Y. Hashiguchi, M. Nishida & S. Nishida. 2009. Zooplankton diversity analysis through single-gene sequencing of a community sample. *BMC Genomics*, 10(438): 1-7.
- Maniglia, T. C. 2010. Caracterização molecular de espécies de *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) da planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil: variabilidade e diferenciação genética, hibridação e filogeografia. Unpublished Ph.D. Dissertation, Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 62p.
- McFadden, C. S., Y. Benayahu, E. Pante, J. N. Thoma, P. A. Nevarez & S. C. France. 2011. Limitations of mitochondrial gene barcoding in Octocorallia. *Molecular Ecology Resources*, 11: 19-31.
- McMahan, C. D., A. D. Geheber & K. R. Piller. 2010. Molecular systematic of the enigmatic Middle American genus *Vieja* (Teleostei: Cichlidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57: 1293-1300.
- Meier, R., K. Shiyang, G. Vaidya & P. K. L. Ng. 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, 55: 715-728.
- Meyer, C. P. & G. Paulay. 2005. DNA barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLoS Biology*, 3(12): 2229-2238.
- Mikich, S. B. & R. S. Bérnils. 2004. Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná. Curitiba: Instituto Ambiental do Paraná.

- Ministério do Meio Ambiente. 2004. Lista Nacional das Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Ameaçados de Extinção. Instrução Normativa nº 5 (21/maio/2004). Disponível em <http://www.mma.gov.br>.
- Monesi, N., M. Jacobs-Lorena & M. L. Paço-Larson. 1998. The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hygida* is specifically transcribed early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, 107(8): 559-569.
- Moran, P., I. Kornfield & P. N. Reinthal. 1994. Molecular Systematics and Radiation of the Haplochromine Cichlids (Teleostei, Perciformes) of Lake Malawi. *Copeia*, 2: 274-288.
- Moritz, C. & C. Cicero. 2004. DNA barcoding: Promise and Pitfalls. *PLoS Biology*, 2(10): 1529-1531.
- Nei, M. & S. Kumar. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. New York, Oxford University Press.
- Nelson, J. S. 2006. Fishes of the world. New York, John Wiley & Sons, 601p.
- Nielsen, R. & M. Matz. 2006. Statistical Approaches for DNA Barcoding. *Systematic Biology*, 55: 162-169.
- Nygren, A., J. Eklof & F. Pleijel. 2010. Cryptic species of *Notophyllum* (Polychaeta: Phyllodocidae) in Scandinavian waters. *Organisms Diversity & Evolution*, 10(3): 193-204.
- Oliveira, A. V., A. J. Prioli, S. M. A. P. Prioli, C. S. Pavanelli, H. F. Júlio Jr & R. S. Panarari. 2002. Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the upper Paraná river floodplain of Brazil. *Genetica*, 115: 259-267.
- Padial, J. M. & I. de La Riva. 2010. A response to recent proposals for integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101: 747-756.
- Page, T. J. & J. M. Hughes. 2010. Comparing the performance of multiple mitochondrial genes in the analysis of Australian freshwater fishes. *Journal of Fish Biology*, 77: 2093-2122.
- Pavanelli, C. S. & H. A. Britski. 1999. Description of a new species of *Steindachnerina* (Teleostei: Characiformes: Curimatidae) from the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Ichthyological Exploration Freshwaters*, 10(3): 211-216.
- Pereira, T. J., G. Fonseca, M. Mundo-Ocampo, B. C. Guilherme & A. Rocha-Olivares. 2010. Diversity of free-living marine nematodes (Enoplida) from Baja California assessed by integrative taxonomy. *Marine Biology*, 157: 1665-1678.

- Pie, M. R., R. A. Baggio, W. A. Boeger, L. A. Patella, A. Ostrensky, J. R. S. Vitule & V. A. A. Abilhoa. 2009. Molecular data reveal a diverse *Astyanax* species complex in the upper Iguaçú River. *Journal of Fish Biology*, 75: 2357-2362.
- Prendini, L. 2005. Comment on 'Identifying spiders through DNA barcoding'. *Canadian Journal of Zoology*, 83: 498–504.
- Prioli, S. M. A. P., A. J. Prioli, H. F. Júlio-Jr, C. S. Pavanelli, A. V. Oliveira, H. Carrer, D. M. Carraro & L. M. Prioli. 2002. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçú River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, 25(4): 421-430.
- Reece, K. S., J. F. Cordes, J. B. Stubbs, K. L. Hudson & E. A. Francis. 2008. Molecular phylogenies help resolve taxonomic confusion with Asian *Crassostrea* oyster species. *Marine Biology*, 153: 709-721.
- Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr. (Eds.). 2003. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs, 729p.
- Robinson, E. A., G. A. Blagoev, P. D. N. Hebert & S. J. Adamowicz. 2009. Prospects for using DNA barcoding to identify spiders in species-rich genera. *ZooKeys*, 16: 27-46.
- Roe, K. J., D. Conkel & C. Lydeard. 1997. Molecular systematics of middle American cichlid fishes and the evolution of trophic-types in 'Cichlasoma (Amphilophus)' and 'C-(Thorichthys)'. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7(3): 366-376.
- Rosenthal, A., O. Coutelle & M. Craxton. 1993. Large-scale of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Research*, 21(1): 173-174.
- Rubinoff, D. 2006. Utility of Mitochondrial DNA Barcodes in Species Conservation. *Conservation Biology*, 20(4): 1026-1033.
- Solé-Cava, A. M. & G. Wörheide. 2007. The perils and merits (or the Good, the Bad and the Ugly) of DNA barcoding of sponges- a controversial discussion. Pp. 603-612. In: Custódio M. R., G. Lôbo-Hajdu, E. Hajdu & G. Muricy (Eds.). *Porifera Research - Biodiversity, Innovation and Sustainability*. Série Livros 28, Museu Nacional, Rio de Janeiro. 684p.
- Solé-Cava, A. M. 2008. Código de barras de DNA: o rabo que abana o cachorro. *Ciência Hoje*, 41(245): 65-67.
- Steinke, D., T. S. Zemlak, J. A. Boutillier & P. D. N. Hebert. 2009. DNA barcoding of Pacific Canada's fishes. *Marine Biology*, 156: 2641-2647.
- Suzuki, H. I., A. E. A. Vazzoler, E. E. Marques, M. A. P. Lizama & P. Inada. 2004. Reproductive ecology of the fish assemblage. Pp. 271-292. In: Thomaz, S. M., A. A.

- Agostinho & N. S. Hahn (Eds.). The Upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, 399p.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins & T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequencing weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- Toffoli, D., T. Hrbek, M. L. G. Araújo, M. P. Almeida, P. Charvet-Almeida & I. P. Farias. 2008. A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 31(1): 324-336.
- Turner, J. R. G. 2004. Explaining the global biodiversity gradient: energy, area, history and natural selection. *Basic and Applied Ecology*, 5(5): 435-448.
- Urta, A., D. Oliva & M. Sepulveda. 2007. Use of a morphometric analysis to differentiate *Adelomelon ancilla* and *Odontocymbiola magellanica* (Caenogastropoda : Volutidae) of southern Chile. *Zoological Studies*, 46(3): 253-261.
- Valdez-Moreno, M., N. V. Ivanova, M. Elías-Gutiérrez, S. Contreras-Balderas & P. D. N. Hebert. 2009. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *Journal of Fish Biology*, 74: 377-402.
- Valdez-Moreno, M., L. Vasquez-Yeomans, M. Elias-Gutierrez, N. V. Ivanova & P. D. N. Hebert. 2010. Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Peninsula, Mexico: potential in fisheries management. *Marine and Freshwater Research*, 61(6): 665-671.
- Vari, R. P. 1991. Systematics of the Neotropical Characiform genus *Steindachnerina* Fowler (Pisces: Ostariophysi). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 507: 97-102.
- Vari, R. P. 2003. Family Curimatidae. Pp. 51-64. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr. (Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Edipucrs, 729p.
- Vogler, A. P. & M. T. Monaghan. 2007. Recent advances in DNA taxonomy. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 45: 1-10.

- Ward, R. D., T. S. Zemlak, B. H. Innes, P. R. Last & P. D. N. Hebert. 2005. DNA Barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360(1462): 1847-1857.
- Wares, J. P. & C. W. Cunningham. 2001. Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution*, 12: 2455-2469.
- Wen, J., C. Hu, L. Zhang, P. Luo, Z. Zhao, S. Fan & T. Su. 2010. The application of PCR-RFLP and FINS for species identification used in sea cucumbers (*Aspidochirotida: Stichopodidae*) products from the market. *Food Control*, 21: 403-407.