

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

THAÍS FERNANDES MENDONÇA MOTA

Diversidade genética em populações de *Moenkhausia* e *Hemigrammus*

(Pisces: Characiformes)

Maringá
2014

THAÍS FERNANDES MENDONÇA MOTA

Diversidade genética entre populações de *Moenkhausia* e *Hemigrammus*
(Pisces: Characiformes)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Alves Pinto Prioli

Maringá
2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

M917d Mota, Thais Fernandes Mendonça
Diversidade genética em populações de *Moenkhausia*
e *Hemigrammus* (Pisces: Characiformes)/ . -- Maringá,
2013.
66 f. il. : figs., tabs. , mapa

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli.
Coorientadora: Prof.^a. Dr.^a. Sônia Maria Alves
Pinto Prioli
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Biologia Comparada, 2014.

1. Taxonomia - Identificação de espécie. 2.
Molecular. 3. Characiformes. I. Prioli, Alberto
José, orient. II. Universidade Estadual de Maringá.
Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Comparada. III. Título.

CDD 22. ED.597.48135

JLM-000632

FOLHA DE APROVAÇÃO

THAÍS FERNANDES MENDONÇA MOTA

Diversidade genética entre populações de *Moenkhausia* e *Hemigrammus*
(Pisces: Characiformes)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Alberto José Prioli - orientador
Universidade Estadual de Maringá – Presidente

Dr. Horácio Ferreira Júlio Junior
Universidade Estadual de Maringá – Titular

Dra. Alessandra Valéria de Oliveira
Centro Universitário de Maringá – Titular

Aprovada em: 18 de fevereiro de 2014.

Local de defesa: Sala 214, Bloco G80, *campus* da Universidade Estadual de Maringá

DEDICATÓRIA

Com amor dedico este trabalho ao Espírito Santo que ilumina e guia meus caminhos, a minha família Cláudio, Giovana e Gabriele que me apoiam em todas as decisões que tenho tomado na vida, e aos meus pais Santo e Rosa e irmãs Viviane e Ana Maria por todo apoio, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a algumas pessoas, dentre as muitas que me ajudaram a realizar este trabalho:

A Deus e à Maria Santíssima, por todas as graças, conquistas e por toda a minha vida e a vida das pessoas que eu amo.

Ao meu orientador, prof. Dr. Alberto José Prioli pela orientação, por todos os ensinamentos, exemplos, confiança e amizade.

À minha co-orientadora, professora Dra. Sônia Maria A. P. Prioli pela amizade, oportunidade, apoio, confiança, orações, ensinamentos e exemplos.

À Universidade Estadual de Maringá.

À Capes pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada pela oportunidade de realização desta dissertação.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Biologia Comparada pelos ensinamentos.

A todos os funcionários do DBC e do Nupélia, especialmente ao Donizete e à Maria José.

Ao Luís pela coleta de material na localidade-tipo.

A todos os colegas do laboratório de Genética e do curso de Pós-Graduação, pela amizade. Em especial ao Luciano, Igor, Isadora, Jéssica, Adriana, Vivian, Gabriel, Fagner, Thaís, Thiago, Nédia, Rodrigo, Flávia, Flávio, Thomaz, Nathália, Tatiane. Obrigada por toda ajuda.

Aos colegas da carona, Claudinéia, Helito, Natália, Geraldo, Fernanda, ...

Ao meu esposo Cláudio, por todo apoio, amizade, amor e carinho. Te amo!!!

As minhas filhas Giovana e Gabriele, que são a razão da minha vida e me fazem a cada dia mais feliz, obrigada por todo amor, risada, abraço, ...Amo vocês!!!

À meus pais Santo e Rosa, por tudo o que vocês fizeram e fazem por mim, por todo amor, apoio, sacrifícios, orações, exemplos, e pela ajuda com as meninas. Amo muito vocês.

À minha sogra Maria da Conceição, pela amizade e por sempre me ajudar com as meninas durante os meus estudos.

Às minhas irmãs Viviane e Ana Maria, por todo amor, ajuda, torcida e amizade.

Aos meus cunhados Gilson, Wellington, Roberto, Cristina, Dioni e Carlos Henrique, pela amizade e ajuda.

Aos meus sobrinhos Guilherme e Rafael, que fazem a titia muito feliz.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Tudo posso naquele que me fortalece”

Filipenses 4:13

Diversidade genética entre populações de *Moenkhausia* e *Hemigrammus* (Pisces: Characiformes)

RESUMO

Os peixes da ordem Characiformes estão entre os mais diversos e abundantes componentes de água doce do mundo, com aproximadamente 2.000 espécies. Os Characiformes apresentam uma variada especialização ecológica, evidenciada pela enorme variedade de formas, tamanhos e hábitos alimentares. Possuem notável importância ecológica, devido sua abundância e diversidade, além de muitos serem comercialmente importantes como alimentos e peixes ornamentais. A classificação deste grupo vem sofrendo grandes modificações e há necessidade de muito outros estudos para estabelecer suas relações filogenéticas. A família Characidae é a maior e mais complexa, com mais de 1050 espécies. Esta família tem apresentado uma alta taxa de descrição, mais de 80 espécies foram descritas nos últimos quatro anos. Os gêneros *Moenkhausia* Eigenmann 1903 e *Hemigrammus* Gill 1858 estão entre os grupos considerados não-monofiléticos e com taxonomia problemática. As espécies *Moenkhausia bonita* Benine, 2004 e *Hemigrammus marginatus* Ellis, 1911 diferenciam-se principalmente por a primeira apresentar linha lateral completa e a segunda linha lateral incompleta. Porém, alguns exemplares atribuídos a *M. bonita* coletados na bacia do alto rio Paraná apresentam diferentes níveis de desenvolvimento da linha lateral, dificultando a correta separação de *H. marginatus*. Para explorar os temas destacados anteriormente, esta dissertação foi organizada em dois capítulos. No primeiro foi realizado um estudo cienciométrico para avaliar o desenvolvimento do conhecimento sobre a Filogenia de Characiformes. No segundo, ferramentas moleculares foram utilizadas para analisar a similaridade genética entre populações de *M. bonita* que apresentam variados níveis de desenvolvimento da linha lateral, encontradas no alto rio Paraná, de *M. bonita* da localidade-tipo e populações de *H. marginatus*.

Palavras-chave: Characiformes. Filogenia. Characidae. Molecular. *Moenkhausia bonita*.

Genetic diversity among *Moenkhausia* and *Hemigrammus* populations
(Pisces:Characiformes)

ABSTRACT

The fishes of the order Characiformes are between the most diverse and abundant components of freshwater in the world, with approximately 2.000 species. Characiformes have a varied ecological specialization evidenced by the huge variety of shapes, sizes, and eating habits. They have an outstanding ecological importance, because of its abundance and diversity, besides many are commercially important as food and ornamental fish. The classification of this group has undergone a lot of changes and there is much need for further studies to establish their phylogenetic relationships. The Characidae family is the largest and the most complex, with more than 1.050 species. This family has shown a high rate of description, more than 80 species have been described in the past four years. The genera *Moenkhausia* Eigenmann 1903 and *Hemigrammus* Gill 1858 are between the groups considered non-monophyletic and with problematic taxonomy. The species *Moenkhausia bonita* Benine, 2004 and *Hemigrammus marginatus* Ellis, 1911 differ mainly because the first has a complete lateral line and the second incomplete lateral line. However, some specimens assigned to *M. bonita* listed in the upper rio Paraná basin have different levels of the lateral line development, making the correct separation *H. marginatus* to be difficult. To explore the issues previously highlighted, this dissertation was organized in two chapters. At first a scientometric study was conducted to evaluate the development of knowledge about the Characiformes phylogeny. Then, molecular tools were used to analyze the genetic similarity between populations of *M. bonita* that present varying levels of the lateral line development, found in the upper Paraná River, of *M. bonita* locality-type and *H. marginatus* populations.

Keywords: Characiformes. Phylogeny. Characidae. Molecular. *Moenkhausia bonita*.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	11
Estudos filogenéticos da Ordem Characiformes: tendências e carências	12
Resumo.....	14
Abstract	15
Introdução	16
Metodologia	17
Resultados e Discussão	17
Conclusão.....	34
Referências.....	34
ANEXO 1	38
CAPÍTULO 2	40
Variabilidade e distância genética em populações de <i>Moenkhausia</i> e <i>Hemigrammus</i> (Pisces: Characiformes).....	41
Resumo.....	43
Abstract	44
Introdução	45
Material e métodos.....	46
Material biológico	46
Processamento do DNA	47
Análises de dados	48
Resultados	49
<i>COI</i>	49
<i>Histona H3</i>	53
<i>S7 íntron 1</i>	56
Discussão	59
Referências.....	62
ANEXO 2	66

CAPÍTULO 1

Estudos Filogenéticos da Ordem Characiformes: tendências e carências

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para a publicação científica no periódico *Publicatio UEPG – Ciências Biológicas e da Saúde*.

**ESTUDOS FILOGENÉTICOS DA ORDEM CHARACIFORMES:
TENDÊNCIAS E CARÊNCIAS**

**PHYLOGENETIC STUDIES OF THE ORDER CHARACIFORMES:
TRENDS AND LACKS**

Thaís Fernandes Mendonça Mota¹, Sônia Maria Alves Pinto Prioli^{2,3}, Alberto José Prioli^{2,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada (PGB), Universidade Estadual de Maringá (UEM)

²Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia), Universidade Estadual de Maringá (UEM)

³Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá (UEM)

*Rua José de Souza Leite, 1622 Jd. Laranjeiras, Paranavaí, Paraná.
tfmm_0412@hotmail.com. (044) 3422-5362.

ESTUDOS FILOGENÉTICOS DA ORDEM CHARACIFORMES: TENDÊNCIAS E CARÊNCIAS

RESUMO

Estima-se que o número de espécies existentes hoje é de aproximadamente de 3 a 5 milhões. Entre os peixes de água doce, a ordem Characiformes está entre as mais diversas, com aproximadamente 2.000 espécies. A classificação deste grupo vem sendo reavaliada e novos estudos devem ser feitos para estabelecer suas relações filogenéticas. Através de dados cienciométricos é possível identificar as tendências e o desenvolvimento do conhecimento, indicando quais abordagens devem ser conduzidas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo cienciométrico para avaliar o desenvolvimento do conhecimento sobre a filogenia de Characiformes. O levantamento dos estudos foi realizado por meio do banco de dados publicados no sítio do *Thomson Reuters Web of Knowledge*. Alguns critérios foram utilizados para selecionar as publicações. Foram selecionados 44 trabalhos. Durante o ano de 2013, 15,9% dos trabalhos foram publicados. A maior parte dos trabalhos foi em nível de gênero. O gênero *Moenkhausia* foi o mais estudado. As famílias mais estudadas foram Characidae e Alestidae. A grande maioria das reconstruções filogenéticas utilizaram caracteres moleculares. Instituições brasileiras realizaram 43,1% dos trabalhos. Podemos concluir que a filogenia de Characiformes ainda não está bem resolvida, com apenas alguns táxons estudados e poucos trabalhos fizeram uma análise mais abrangente da ordem. Sugerimos novas pesquisas em táxons poucos estudados, sobretudo análises mais abrangentes e com dados moleculares e morfológicos.

Palavras-chave: Filogenia; Cienciométrica; Peixes; Molecular; Morfologia.

PHYLOGENETIC STUDIES OF THE ORDER CHARACIFORMES: TRENDS AND LACKS

ABSTRACT

It is estimated that the number of species existing today is nearly 3 to 5 million. Among freshwater fish, the order Characiformes is among the most diverse, with nearly 2.000 species. The classification of this group has been re-evaluated and further studies should be made to establish their phylogenetic relationships. Through scientometric data is possible to identify trends and knowledge development, indicating which approaches should be conducted. Thus, the aim of this study was to conduct a scientometric study to evaluate the development of knowledge about the phylogeny of Characiformes. The survey of the studies was conducted by the database published on the website of the *Thomson Reuters Web of Knowledge*. Some criteria were used to select publications. 44 papers were selected. During the year 2013, 15.9 % of work were posted. Most of the work was at genus level. The *Moenkhausia* genus was the most studied. The most studied families were Characidae and Alestidae. The vast majority of phylogenetic reconstructions used molecular characters. Brazilian institutions did 43.1 % of work. We conclude that phylogeny of Characiformes is still not well solved, with only a few taxa studied and few studies have made a more comprehensive analysis of the order. We recommend further researches on understudied taxa, mainly analyzes broader and with molecular and morphological data.

Keywords: Phylogeny; Scientometrics; Fish; Molecular; Morphology.

INTRODUÇÃO

Existe uma alta diversidade de vida na Terra, estima-se que o número de espécies existentes hoje é de aproximadamente de 3 à 5 milhões (COSTELLO et al., 2013). A sistemática filogenética é uma ferramenta importante para entender esta diversidade à luz da evolução e para reconstruir a história evolutiva da vida (HENNIG, 1966). Segundo a metodologia filogenética, a classificação dos organismos deve refletir as relações de parentesco entre os táxons incluídos na classificação (AMORIM, 2002). Essas relações genealógicas são obtidas a partir de análises de homologias, que são características de origem comum em grupos geneticamente relacionados. A análise filogenética pode utilizar diferentes tipos de caracteres morfológicos, moleculares e etológicos (WHEELER et al., 2006).

A história evolutiva dos peixes da ordem Characiformes ainda é incerta. Os peixes desta Ordem estão entre os mais diversos e abundantes componentes de água doce do mundo, com aproximadamente 2.000 espécies distribuídas em 23 famílias, destas quatro são africanas e 19 neotropicais (OLIVEIRA et al., 2011; ESCHMEYER; FONG, 2013). Os Characiformes apresentam uma variada especialização ecológica, evidenciada pela enorme variedade de formas, tamanhos e hábitos alimentares (GERY, 1977). Possuem notável importância ecológica, devido sua abundância e diversidade (LOWE-MCCONNELL, 1999), além de muitos serem comercialmente importantes como alimentos e peixes ornamentais (WEITZMAN; PALMER, 2003).

A família Characidae é a maior da Ordem e as inter-relações deste grupo permanecem confusas, com muitos gêneros considerados *incertae sedis* (LIMA et al., 2003). A classificação dos Characiformes vem sofrendo grandes modificações, com vários estudos recentes (CALCAGNOTTO et al., 2005; JAVONILLO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; DATOVO; CASTRO, 2012; MATTOX; TOLEDO-PIZA, 2012). Contudo, há necessidade de muitos outros estudos para estabelecer as relações filogenéticas deste grupo (NELSON, 2006).

Com base no desenvolvimento do conhecimento científico se tornou necessária a avaliação de tais avanços. A quantificação da produção científica é um dos meios de avaliar o desenvolvimento científico de uma determinada área. A cienciometria pode ser definida como o estudo dos aspectos quantitativos da ciência (TAGUE-SUTCLIFFE,

1992). Através de dados cienciométricos é possível identificar as tendências e o desenvolvimento do conhecimento, indicando quais estudos devem ser realizados. Desta forma, é uma ferramenta interdisciplinar para auxiliar políticas para o desenvolvimento científico (SPINAK, 1998).

Como a filogenia dos Characiformes ainda não está bem resolvida, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo cienciométrico para avaliar o desenvolvimento do conhecimento sobre a filogenia de Characiformes.

METODOLOGIA

A busca por textos científicos foi realizada na base de dados *ISI Web of Knowledge*, devido a sua abrangência quanto ao número de publicações e qualidade das revistas indexadas. As palavras-chave utilizadas foram “*Phylogeny and Characiformes*” para selecionar os artigos com assuntos interligados. Não foi delimitando o período específico, pois foram contabilizados todos os trabalhos encontrados até dezembro de 2013. A quantidade de vezes que o artigo foi citado também está disponível neste banco de dados. Foram selecionadas as publicações que apresentavam as seguintes informações: (I) Filogenia de algum táxon relacionado à Characiformes (II) ano de publicação; (III) táxon estudado; (IV) marcadores utilizados (V) autores; (VI) países onde estão filiados os autores; (VII) número de vezes que o artigo foi citado; (VIII) periódico em que o artigo foi publicado. Através da coleta destas informações foi elaborado um conjunto de dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ordem Characiformes é um dos maiores grupos de peixes de água doce. As relações filogenéticas deste grupo ainda não foram bem estabelecidas, em parte, devido sua grande diversidade morfológica, pequena variação da morfologia externa de alguns grupos, e/ou evolução convergente comum (NELSON, 2006). Nos últimos anos vários estudos foram feitos em grande parte das famílias de Characiformes. De acordo com os critérios utilizados, foram selecionados 44 trabalhos.

A primeira publicação é de 1987 e a mais recente foi publicada em dezembro de 2013 (figura 1). Durante o ano de 2013, 15,9% dos trabalhos foram publicados. Na última década, mais de 300 espécies de Characiformes foram descritas, e a previsão é

que este número aumente (OLIVEIRA et al., 2011). Desta forma, ainda existem várias questões a serem resolvidas, principalmente porque a filogenia de algumas famílias é problemática, como por exemplo, a posição da família Crenuchidae (MIRANDE, 2010; OLIVEIRA et al., 2011).

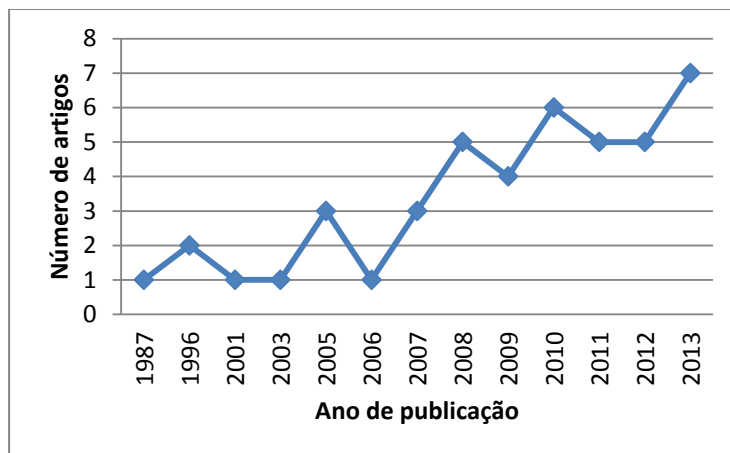


Figura 1. Número de artigos sobre filogenia de Characiformes e ano de publicação.

A maior parte dos trabalhos foi em nível de gênero, seguido de família, com 36,3% e 27,2%, respectivamente. Somente um artigo em nível de ordem (figura 2). Entre os trabalhos que estudaram a filogenia de famílias, nove famílias foram incluídas nos estudos, e entre a filogenia de gênero, 15 gêneros foram analisados. As famílias mais estudadas foram Characidae em quatro trabalhos e Alestidae em três trabalhos. A filogenia do gênero *Moenkhausia* foi analisada em três trabalhos e dois artigos abordaram a filogenia do gênero *Leporinus*. Contudo, considerando as 23 famílias da ordem e os diversos gêneros, muitos grupos não foram devidamente explorados. Entre os 291 gêneros, 70 não foram estudados em nenhum dos trabalhos selecionados, entre estes gêneros não estudados, 26 são considerados *incertae sedis* (tabela 1). Da mesma forma, a Ordem carece de pesquisas mais amplas, já que existem alguns pontos conflitantes entre os diferentes estudos realizados.

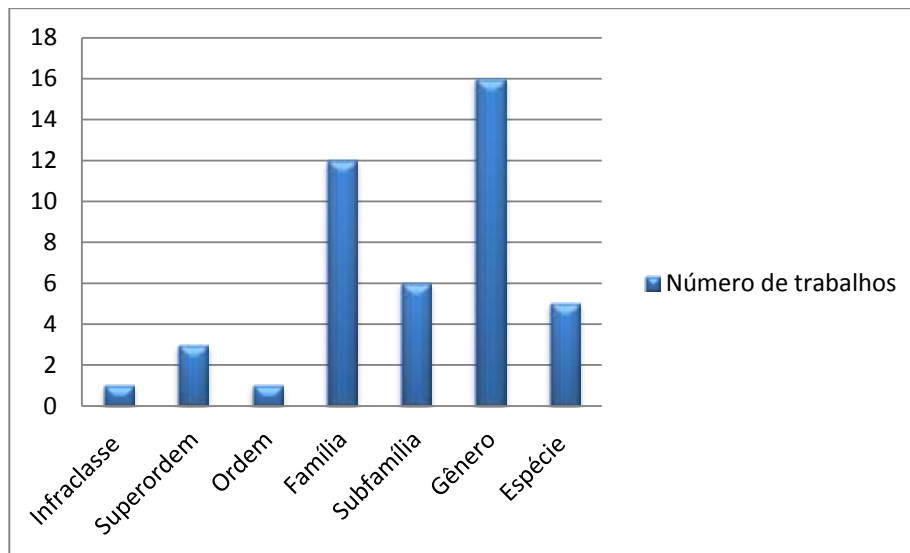


Figura 2. Táxon estudado nos artigos sobre filogenia de Characiformes.

Tabela 1. Todas as famílias e gêneros estudados nos artigos selecionados e marcadores utilizados na reconstrução na filogenia. Em destaque gêneros não estudados nas filogenias.

GRUPO	MARCADOR		
	Morfológico	Molecular	
		Nuclear	Mitocondrial
Acestrorhynchidae			
<i>Acestrorhynchus</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6/sh3px3/ S7/ TROP/ fkh/ Sia	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI/ ATPase
<i>Gilbertolus</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Gnathocharax</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Heterocharax</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Hoplocharax</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Lonchogenys</i>	Osteológicos		
<i>Roestes</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
Alestidae			
<i>Alestes</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6/ sh3px3/ SEPY I/ AEPY 6	12 s RNA/ 16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Alestopetersius</i>	Merísticos Morfométricos Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG1/ MYH6/sh3px3/	16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Arnoldichthys</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/	16 s RNA/ cyt-b/ COI

		MYH6/sh3px3	
<i>Bathyaethiops</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/MYH6/ sh3px3	16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Brachypetersius</i>	Osteológicos	MYH6/sh3px3	cyt-b/ COI
<i>Brycinus</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6/ RH/ EGR 1/ EGR 2B EGR3/ sh3px3	12 s RNA/ 16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Bryconaethiops</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6/ sh3px3	12 s RNA/ 16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Bryconalestes</i>	Osteológicos	MYH6/sh3px3	cyt-b/ COI
<i>Chalceus</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6/ SEPY 1/ AEPY 6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Clupeocharax</i>	Osteológicos	MYH6/sh3px3	cyt-b/ COI
<i>Hemigrammopetersius</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ MYH6/sh3px3	16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Hydrocynus</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6/ sh3px3	16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Ladigesia</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6/ sh3px3	16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Lepidarchus</i>	Osteológicos	MYH6/sh3px3	cyt-b/ COI
<i>Micralestes</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6/ sh3px3	12 s RNA/ 16 s RNA/ cyt-b/COI
<i>Nannopetersius</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ MYH6/sh3px3	16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Petersius</i>	Osteológicos		
<i>Phenacogrammus</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6/ RH/ EGR 1/ EGR 2B EGR3/ sh3px3/ SEPY 1/ AEPY 6	16 s RNA/ cyt-b/COI/ Genoma mitocondrial
<i>Rhabdalestes</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ MYH6/sh3px3	12 s RNA/ 16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Tricuspidalestes</i>	Osteológicos	MYH6/sh3px3	cyt-b/ COI
<i>Virilia</i>	Osteológicos		
Anostomidae			
<i>Abramites</i>			12 s RNA /16 s RNA/ D-loop
<i>Anostomoides</i>			
<i>Anostomus</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Arrhinolemur</i>	Osteológicos		
<i>Gnathodolus</i>			
<i>Laemolyta</i>			
<i>Leporellus</i>			
<i>Leporinus</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6/ SEPY	12 s RNA / D-loop /16 s

	Catiotípicos	I/ AEPY 6	RNA/ cyt-b
<i>Pseudanos</i>	Osteológicos		
<i>Rhytidus</i>			
<i>Sartor</i>			
<i>Schizodon</i>		RAG 1/ RAG 2/MYH6/RH/ EGR 1/ EGR 2B EGR3	16 s RNA/ cyt-b
<i>Synaptolaemus</i>			
<i>Hypomasticus</i>			
<i>Petulanos</i>			
Bryconidae			
<i>Brycon</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6/ sh3px3	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Chilobrycon</i>	Osteológicos		
<i>Henochilus</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Salminus</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
Chalceidae			
<i>Chalceus</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6/ RH/ EGR 1/ EGR 2B EGR3/ sh3px3	16 s RNA/ cyt-b/ COI/ Genoma mitocondrial
Characidae			
<i>Acanthocharax</i>			
<i>Acestrocephalus</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Acinocheiroidon</i>	Glandulares	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Acrobrycon</i>	Osteológicos		
<i>Amazonspinter</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Aphyocharacidium</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Aphyocharax</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6/ Sai/ TROP	12 s RNA / 16 s RNA/ cyt-b/ COI/ ND2
<i>Aphyocheiroidon</i>	Glandulares	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Aphyodite</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Argopleura</i>			
<i>Astyanacinus</i>		TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Astyanax</i>	Espermáticos Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6/ RH/ EGR 1/ EGR 2B EGR3/ TROP/ fkh/ Sia	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ 12 s RNA/ COI
<i>Atopomesus</i>			
<i>Attonitus</i>	Osteológicos		
<i>Aulixidens</i>	Osteológicos		

<i>Axelrodia</i>	Osteológicos		
<i>Bario</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Boehlkea</i>	Espermáticos		
<i>Brachyhalcinus</i>	Cariotípicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Bramocharax</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Brittanichthys</i>		RAG 2/ 12 s RNA / 16 s RNA COI	
<i>Bryconacidnus</i>			
<i>Bryconadenos</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Bryconamericus</i>	Espermáticos Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Bryconella</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Bryconexodon</i>	Osteológicos		
<i>Caiapobrycon</i>			
<i>Carlana</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Ceratobranchia</i>	Espermáticos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Charax</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Cheirodon</i>	Glandulares Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Cheirodontops</i>	Glandulares	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia	16 s RNA/ cyt-b
<i>Chrysobrycon</i>	Osteológicos		
<i>Compsura</i>	Glandulares	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Coptobrycon</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Corynopoma</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Creagrutus</i>	Espermáticos Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Ctenobrycon</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Ctenocheirodon</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Cyanocharax</i>	Espermáticos Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Cyanogaster</i>			
<i>Cynopotamus</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Dectobrycon</i>			
<i>Deuterodon</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Diapoma</i>	Osteológicos	RAG 2	12 s RNA /16 s RNA/ COI

<i>Ectrepopterus</i>			
<i>Erythrocharax</i>			
<i>Exodon</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Galeocharax</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Genycharax</i>			
<i>Gephyrocharax</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6/ S7	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI/ ATPase
<i>Gandulocauda</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Grundulus</i>	Osteológicos		
<i>Gymnocharacinus</i>	Osteológicos		
<i>Gymnocorymbus</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6/ SEPY I/ AEPY 6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Gymnotichthys</i>			
<i>Hasemania</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Hemibrycon</i>	Espermáticos Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Hemigrammus</i>	Espermáticos Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6/ sh3px3	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Heterocheirodon</i>	Glandulares	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Hollandichthys</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6/Sia/ Trop	16 s RNA/ cyt-b/ COI/ND2/ 12 s RNA
<i>Hyphessobrycon</i>	Espermáticos Osteológicos Morfométricos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6	16 s RNA/ cyt-b/ COI/ND2/ 12 s RNA
<i>Hypobrycon</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Hysteronotus</i>			
<i>Inpaichthys</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Iotabrycon</i>			
<i>Jupiaba</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Knodus</i>	Espermáticos Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Kolpotocheirodon</i>	Glandulares	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Landonia</i>			
<i>Lepidocharax</i>	Osteológicos Histológicos		
<i>Leptagoniates</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b

<i>Leptobrycon</i>			
<i>Lophiobrycon</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6/ Sai/TROP	16 s RNA/ cyt-b/ COI/ND2
<i>Macropsobrycon</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Markiana</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Megalamphodus</i>			
<i>Microgenys</i>			
<i>Microschemobrycon</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Mimagoniates</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6	16 s RNA/ cyt-b/ COI/ND2/ 12 s RNA
<i>Mixobrycon</i>			
<i>Moenkhausia</i>	Espermáticos Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia RAG 1/ MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Monotocheiroidon</i>			
<i>Myxiops</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Nanocheiroidon</i>	Glandulares	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Nantis</i>	Osteológicos		
<i>Nematobrycon</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Nematocharax</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6/Sia/Trop	16 s RNA/ cyt-b/ COI/ND2
<i>Odontostilbe</i>	Glandulares Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Odontostoechus</i>	Espermáticos Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Oligobrycon</i>			
<i>Oligosarcus</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Orthospinus</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Othonocheiroidus</i>			
<i>Oxybrycon</i>			
<i>Paracheiroidon</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6/ SEPY I/ AEPY 6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Paragoniates</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Parapristella</i>	Osteológicos		
<i>Parastremma</i>			
<i>Parecbasis</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Petitella</i>			
<i>Phallobrycon</i>			
<i>Phenacobrycon</i>			

<i>Phenacogaster</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Phenagoniates</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Piabarchus</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Piabina</i>	Espermáticos Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Planaltina</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Poptella</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Priocharax</i>			
<i>Prionobrama</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Pristella</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Probolodus</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Prodontocharax</i>	Glandulares Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Psellogrammus</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Pseudochalceus</i>	Osteológicos	Sia/ TROP	16 s RNA/ COI/ND2/
<i>Pseudocheirodon</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Pseudocorynopoma</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Pterobrycon</i>			
<i>Ptychocharax</i>			
<i>Rachoviscus</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6/ Sia/ TROP	16 s RNA/ cyt-b/ COI/ND2/ 12 s RNA
<i>Rhinobrycon</i>	Espermáticos Osteológicos		
<i>Rhinopetitia</i>			
<i>Rhoadsia</i>	Osteológicos		
<i>Roeboexodon</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Roebooides</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6/ S7	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI/ ATPase
<i>Saccoderma</i>	Glandulares	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Schultzites</i>			
<i>Scissor</i>			
<i>Scopaeocharax</i>			
<i>Serrabrycon</i>			
<i>Serrapinnus</i>	Glandulares Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Spintherobolus</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Stethaprion</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b

<i>Stichonodon</i>	Osteológicos		
<i>Stygichthys</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Tetragonopterus</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Thayeria</i>	Espermáticos Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Thrissobrycon</i>			
<i>Trochilocharax</i>			
<i>Tucanoichthys</i>			
<i>Tyttobrycon</i>			
<i>Tyttocharax</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Xenagoniates</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Xenurobrycon</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
Chilodontidae			
<i>Caenotropus</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Chilodus</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA / D-loop / 16 s RNA/ cyt-b
Citharinidae			
<i>Citharinus</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ MYH6/sh3px3/ENC1/Gly T/ RAG 1/ RH/ EGR 1/ EGR 2B EGR3	COI/cyt-b/nd 2/16 s RNA/ cyt-b
<i>Citharidium</i>			
<i>Citharinops</i>			
Crenuchidae			
<i>Ammocryptocharax</i>			
<i>Characidium</i>	Cariotípicos Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6/RH/ EGR 1/ EGR 2B EGR3	16 s RNA/ cyt-b
<i>Crenuchus</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Elachocharax</i>		TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia	16 s RNA/ cyt-b
<i>Geryichthys</i>			
<i>Klausewitzia</i>			
<i>Leptocharacidium</i>			
<i>Melanocharacidium</i>		TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Microcharacidium</i>			
<i>Odontocharacidium</i>			
<i>Poecilocharax</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Skiotocharax</i>			
Ctenoluciidae			

<i>Ctenolucius</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6/ RH/ EGR 1/ EGR 2B EGR3/ sh3px3	16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Boulengerella</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6/ SEPY I/ AEPY 6	16 s RNA/ cyt-b
Curimatidae			
<i>Curimata</i>			
<i>Curimatella</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Curimatopsis</i>			
<i>Cyphocharax</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA / D-loop / 16 s RNA/ cyt-b
<i>Potamorhina</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Psectogaster</i>			
<i>Pseudocurimata</i>			
<i>Steindachnerina</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6/ 5S rDNA	12 s RNA / D-loop / 16 s RNA/ cyt-b
Cynodontidae			
<i>Cynodon</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Gilbertolus</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Hydrolycus</i>		RAG 1/ RAG 2/MYH6/ RH/ EGR 1/ EGR 2B EGR3/ TROP/ fkh/ Sia	16 s RNA/ cyt-b
<i>Rhaphiodon</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6/ S7/ TROP/ fkh/ Sia	12 s RNA / D-loop / 16 s RNA/ cyt-b/ ATPase
Distichodontidae			
<i>Belonophago</i>		MYH6/sh3px3/ENC1/Gly T	COI/cyt-b/nd 2
<i>Congocharax</i>			
<i>Distichodus</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ MYH6/sh3px3/ENC1/Gly T/ RAG 1/ RH/ EGR 1/ EGR 2B EGR3/ SEPY I/ AEPY 6	COI/cyt-b/nd 2/16 s RNA
<i>Dundocharax</i>			
<i>Eugnathichthys</i>		MYH6/sh3px3/ENC1/Gly T	COI/cyt-b/nd 2
<i>Hemigrammocharax</i>		TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ MYH6/sh3px3/ENC1/Gly T/ RAG 1	COI/cyt-b/nd 2/16 s RNA
<i>Hemistichodus</i>		TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ MYH6/sh3px3/ENC1/Gly T	COI/cyt-b/nd 2/16 s RNA
<i>Ichthyborus</i>		TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ MYH6/sh3px3/ENC1/Gly T/ RAG 1	COI/cyt-b/nd 2/16 s RNA
<i>Mesoborus</i>		MYH6/sh3px3/ENC1/Gly T	COI/cyt-b/nd 2
<i>Microstomatichthyoborus</i>		MYH6/sh3px3/ENC1/Gly T	COI/cyt-b/nd 2
<i>Nannaethiops</i>		MYH6/sh3px3/ENC1/Gly T	COI/cyt-b/nd 2

<i>Nannocharax</i>		TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ MYH6/sh3px3/ENC1/Gly T	COI/cyt-b/nd 2/16 s RNA
<i>Neolebias</i>		TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ MYH6/sh3px3/ENC1/Gly T/ RAG 1	COI/cyt-b/nd 2/16 s RNA
<i>Paradistichodus</i>		MYH6/sh3px3/ENC1/Gly T	COI/cyt-b/nd 2
Paraphago			
<i>Phago</i>		TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ MYH6/sh3px3/ENC1/Gly T	COI/cyt-b/nd 2/16 s RNA
<i>Xenocharax</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ MYH6/sh3px3/ENC1/Gly T/ RAG 1	COI/cyt-b/nd 2/16 s RNA
Erythrinidae			
<i>Erythrinus</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Hoplerythrinus</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Hoplias</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ RH/ EGR 1/ EGR 2B EGR3/ MYH6/ sh3px3/ SEPY I/ AEPY 6	16 s RNA/ cyt-b/ COI
Gasteropelecidae			
<i>Carnegiella</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Clupeacharax</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Gasteropelecus</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6/ SEPY I/ AEPY 6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
<i>Thoracocharax</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI
Hemiodontidae			
<i>Anodus</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Argonectes</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Bivibranchia</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Hemiodus</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6/ SEPY I/ AEPY 6	12 s RNA / D-loop / 16 s RNA/ cyt-b
<i>Micromischodus</i>			
Hepsetidae			
<i>Hepsetus</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ RH/ EGR 1/ EGR 2B EGR3/ MYH6	16 s RNA/ cyt-b
Iguanodectidae			
<i>Bryconops</i>	Espermáticos Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI/ND2
<i>Iguanodectes</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Piabucus</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b

Lebiasinidae			
<i>Nannostomus</i>		TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ RH/ EGR 1/ EGR 2B EGR3	16 s RNA/ cyt-b
<i>Copeina</i>			
<i>Copella</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Derhamia</i>			
<i>Pyrrhulina</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Lebiasina</i>			
Parodontidae			
<i>Apareiodon</i>	Osteológicos Cariotípicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA / D-loop/ 16 s RNA/ cyt-b
<i>Parodon</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Saccodon</i>			
Prochilodontidae			
<i>Ichthyoelephas</i>			
<i>Prochilodus</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	ATPase 6/ ATPase 8/ 12 s RNA / D-loop / 16 s RNA/ cyt-b
<i>Semaprochilodus</i>		RAG 1/ RH/ EGR 1/ EGR 2B EGR3/ RAG 2/MYH6	ATPase 6/ ATPase 8/ 16 s RNA/ cyt-b
Serrasalmidae			
<i>Acnodon</i>			12 s RNA /16 s RNA/ D-loop
<i>Catoprion</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA / D-loop/ 16 s RNA/ cyt-b
<i>Colossoma</i>		TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1//MYH6	12 s RNA /D-loop / 16 s RNA/ cyt-b
<i>Metynnis</i>	Espermáticos Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/RAG 1/ MYH6/ SEPY 1/ AEPY 6	12 s RNA / D-loop/ 16 s RNA/ cyt-b
<i>Mylesinus</i>		TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia	12 s RNA /16 s RNA/ COI/ D-loop/ cyt-b
<i>Myletes</i>			
<i>Myleus</i>		TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia	12 s RNA /16 s RNA/ D-loop/ cyt-b
<i>Myloplus</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA / D-loop / 16 s RNA/ cyt-b
<i>Mylossoma</i>	Espermáticos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6	12 s RNA / D-loop / 16 s RNA/ cyt-b
<i>Ossubtus</i>			12 s RNA /16 s RNA/ D-loop
<i>Piaractus</i>	Espermáticos Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI/ D-loop
<i>Pristobrycon</i>			12 s RNA /16 s RNA/

			D-loop
<i>Pygocentrus</i>		TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI/ D-loop
<i>Pygopristis</i>			12 s RNA /16 s RNA/ D-loop
<i>Serrasalmus</i>	Espermáticos Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ D-loop
<i>Tometes</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	12 s RNA / D-loop / 16 s RNA/ cyt-b
<i>Utiaritchthys</i>			
Triportheidae			
<i>Agoniates</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Clupeacharax</i>		RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Engraulisoma</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Lignobrycon</i>	Osteológicos	RAG 1/RAG 2/MYH6	16 s RNA/ cyt-b
<i>Triportheus</i>	Osteológicos	TROP/ fkh/ RAG 2/ Sia/ RAG 1/ MYH6	12 s RNA /16 s RNA/ cyt-b/ COI

Entre as abordagens utilizadas em filogenética, o papel das evidências morfológicas e moleculares na reconstrução da filogenia tem passado por rigorosas avaliações (HILLIS, 1987; SCOTLAND et al., 2003; SMITH; TURNER, 2005; DE CARVALHO et al., 2008). Entre os marcadores utilizados para as análises filogenéticas nos artigos encontrados, a grande maioria utilizou caracteres moleculares (figura 3).

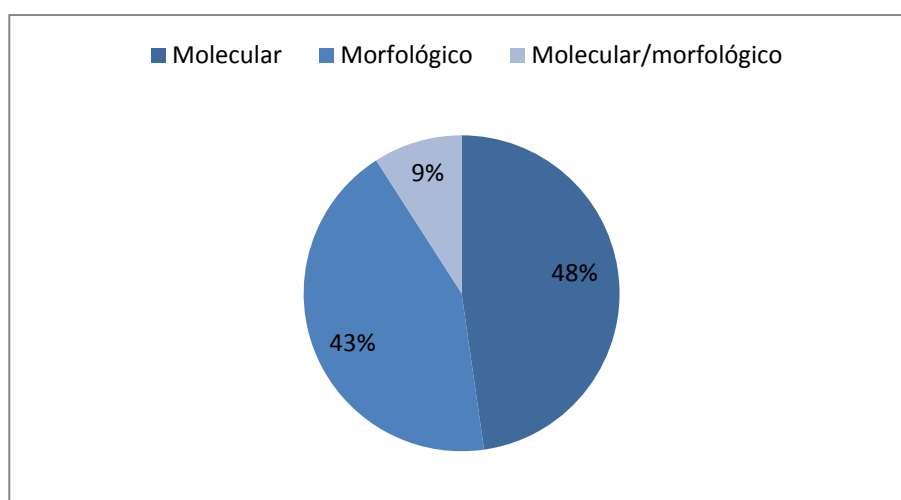


Figura 3. Marcadores utilizados nas análises filogenéticas dos Characiformes.

Nos estudos que utilizaram marcadores moleculares, 48% foram realizados utilizando marcadores nucleares e mitocondriais. Somente marcadores mitocondriais foram utilizados em 40% dos artigos, e apenas 12% dos trabalhos usaram unicamente marcadores nucleares. Os marcadores mitocondriais são mais utilizados em filogenias. O DNA mitocondrial possui algumas características favoráveis, como ausência de recombinação, herança materna, alta taxa de mutação e fácil isolamento, desta forma, até mesmo espécies muito próximas podem ser discriminadas (RUBINOFF, 2006).

Entre os marcadores mitocondriais mais utilizados estão sequências parciais de genes *16s rRNA*, *cyt-b* e *coi*. A maior parte dos trabalhos com genes nucleares utilizaram *myh6*, *rag1* e *rag2*. As análises morfométricas foram as mais utilizadas como marcadores morfológicos, seguida de caracteres osteológicos e cariótipo.

De acordo com os defensores da filogenética morfológica, somente a morfologia pode estabelecer relações entre táxons vivos e fósseis (WIENS, 2004), em reconstrução de clados com divergência profunda e radiação rápida, as análises moleculares podem não ser tão confiáveis (ROKAS et al., 2003). Por outro lado, o sequenciamento do DNA possui vários benefícios como: grande quantidade de dados de forma rápida e barata, as sequências parecem oferecer uma medida mais objetiva, além de não sofrerem interferência ambiental (WHEELER et al., 2013). Contudo, vários autores defendem que o DNA é mais uma entre várias fontes de evidências, e que todas as evidências disponíveis devem ser usadas para reconstruir a filogenia, tanto molecular como morfológica (WIENS, 2004; SMITH; TURNER, 2005; WHEELER et al., 2013).

Vários trabalhos estão sendo realizados envolvendo análises combinadas, demonstrando que em alguns casos somente as análises simultâneas podem resultar em filogenias bem resolvidas (CARPENTER, 1999; FREITAS; BROWN, 2004; WAHLBERG et al., 2005). Como exemplo, para estabelecer a filogenia da família Alestidae, Hubert et al. 2005 utilizaram dados morfológicos e moleculares em análise combinada. Neste estudo ambos os dados foram complementares. No entanto, nos artigos encontrados somente 9% utilizou análises combinadas para estabelecer a filogenias de Characiformes. As parcerias realizadas pode ser um dos fatores para explicar os poucos trabalhos que utilizaram dados de diferentes abordagens em suas análises, pois nesses artigos, a média de autores foi de três e os autores estavam filiados a departamentos diferentes.

O número médio de autores por trabalho foi de 3,73, e o artigo com maior quantidade de autores foi *Chromosomal painting and ZW sex chromosomes*

differentiation in Characidium (Characiformes, Crenuchidae), com 11 autores no total. Dois trabalhos tiveram autoria de só um autor.

Considerando o número de total de artigos e o país em que os autores estão filiados, 43,1% dos trabalhos foram realizados por instituições brasileiras, 11,3 % por instituições americanas (figura 4). Muitos trabalhos foram realizados em parcerias entre diferentes países, num total de 31,8%. Destes, três foram realizados por autores de três países diferentes e 11 em parceria entre dois países. Cinco trabalhos foram feitos em parceria entre Brasil e Estados Unidos (figura 5).

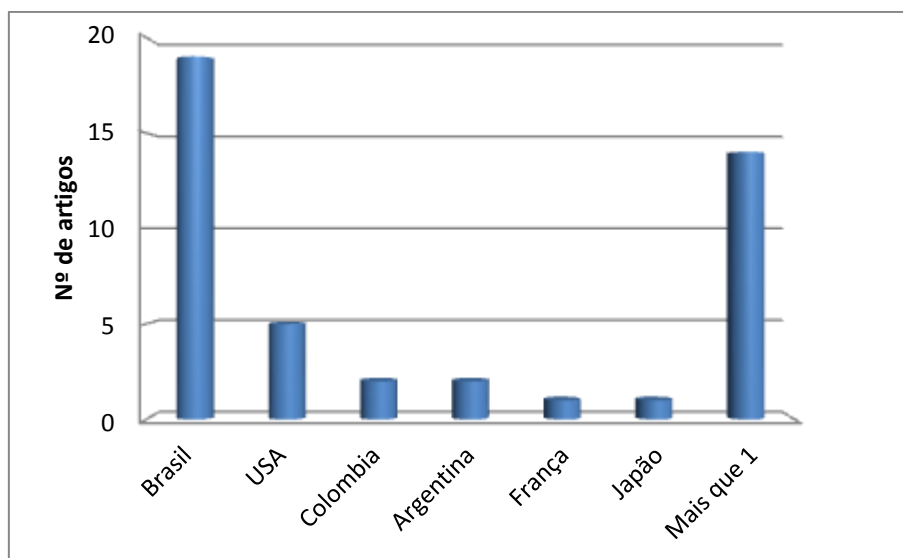


Figura 4. Número de artigos sobre filogenia de Characiformes em relação ao país de filiação dos autores.

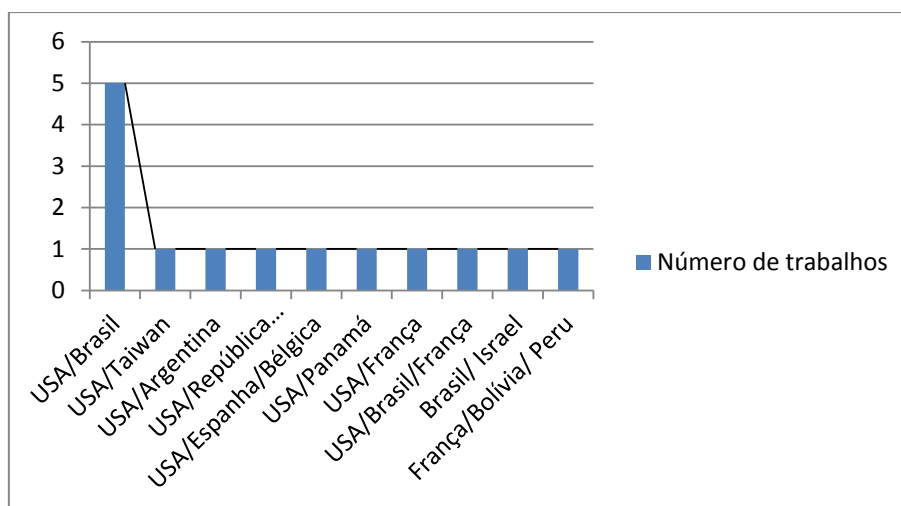


Figura 5. Países que realizaram parcerias nos trabalhos sobre filogenia dos Characiformes.

O Brasil possui um número expressivo em publicações, uma das razões é que o país lidera o número de peixes de água doce, com mais de 2.500 espécies catalogadas

(BUCKUP et al., 2007). Os Estados Unidos ficaram com a segunda posição, e é o país que mais realizou parcerias. O maior número de publicações de autores americanos reflete o investimento local em infraestrutura e pesquisa (JAPPE, 2007). As vantagens das colaborações científicas dependem do tipo de pesquisa, da disciplina, das instituições e dos países envolvidos. A colaboração internacional além de aumentar o número de citações também favorece pequenas universidades e países em desenvolvimento (GOLDFINCH et al., 2003).

O impacto de um artigo, medido pelo número de citações, expressa a importância e reconhecimento de uma obra em seu meio (MACIAS-CHAPULA, 1998). Neste sentido, o trabalho mais citado foi “*Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas*” com 123 citações (tabela 2). Por outro lado, 61,3 % dos artigos foram citados menos de dez vezes. Esta é uma tendência esperada na literatura, onde poucos artigos são muito citados, enquanto que muitos recebem pouca ou nenhuma citação (NICOLAISEN; HJORLAND, 2007). O número de citações depende do ano de publicação (YU; LI, 2007). Portanto, artigos antigos tendem a ser mais citados que os mais recentes, fato corroborado pelos nossos resultados. É possível verificar também, que os trabalhos que apresentam uma abordagem mais ampla também são mais citados.

Tabela 2. Artigos selecionados sobre análise filogenética de Characiformes que foram mais citados.

Citações	Artigo	Autor	Ano
123	Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas	Guillermo Orti et al.	1996
112	Mitochondrial genomics of ostariophysan fishes: Perspectives on phylogeny and biogeography	Kenji Saitoh et al.	2003
106	Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus : Characiformes) in major South American rivers	Arjun Sivasundar et al.	2001
84	Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences	Daniela Calcagnotto et al.	2005

Geralmente, a revista em que o artigo foi publicado é um dos critérios utilizados para avaliar a área de conhecimento da pesquisa (VANTI, 2002). Ao todo, 24 periódicos publicaram sobre o assunto, e as revistas que mais publicaram foram *Molecular Phylogenetics and Evolution* e *Neotropical Ichthyology*, ambos com oito trabalhos. A primeira é específica em trabalhos relacionados com filogenia molecular, e a segunda aborda estudos sobre peixes neotropicais. Entre as revistas específicas que publicaram sobre o tema estão as da área de genética, zoologia, evolução e molecular. Poucos trabalhos foram publicados em revistas mais generalistas.

CONCLUSÕES

Conhecer melhor os padrões de diversidade é essencial para informar aos conservacionistas quais esforços devem ser priorizados. Como a ordem Characiformes é um dos mais importantes componentes de águas doces neotropicais, entender a história evolutiva do grupo e suas implicações para a taxonomia é extremamente necessário.

Desta forma, todos os meios que identifiquem o estado atual de conhecimento do grupo auxiliam a delimitar quais lacunas precisam ser preenchidas. Através deste trabalho podemos concluir que a filogenia de Characiformes ainda não está bem resolvida. Apenas alguns táxons foram estudados e poucos trabalhos fizeram uma análise mais abrangente da ordem. A filogenia de algumas famílias ainda não foi bem investigada. Entre os gêneros da ordem, 70 gêneros ainda não foram estudados em análises filogenéticas, vários destes são considerados *incertae sedis*. A maioria das filogenias utilizou abordagem molecular e o Brasil é o país que mais contribuiu com estudos neste assunto, revistas com diferentes enfoques publicam sobre o assunto.

Portanto, sugerimos que novas pesquisas sejam feitas para melhorar o conhecimento da filogenia de Characiformes, sobretudo análises mais abrangentes, em nível de ordem, e entre os grupos pouco estudados. Análises com dados moleculares e morfológicos também podem auxiliar nesta problemática.

REFERÊNCIAS

AMORIM, D. S. **Fundamentos de sistemática filogenética**. Ribeirão Preto: Holos, 2002.

BRUFREM, L., PRATES, Y. O saber científico registrado e as práticas de mensuração da informação. **Ciência da Informação**. Brasília, v. 34, n. 2, p. 9-25, 2005.

BUCKUP, P. A., N. A. MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. **Catálogo das Espécies de Peixes de Água Doce do Brasil**. Rio de Janeiro, Museu Nacional, 195p, 2007.

CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S. A.; DESALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 36, n. 1, p. 135-153, 2005.

CARPENTER, J. M. Towards simultaneous analysis of morphological and molecular data in Hymenoptera. **Zoologica Scripta**, v. 28, n. 1-2, p. 251-260, 1999.

COSTELLO, M. J.; MAY, R. M.; STORK, N. E. Can we name Earth's species before they go extinct?. **Science**, v. 339, n. 6118, p. 413-416, 2013.

DATOVO, A.; CASTRO, R. Anatomy and evolution of the mandibular, hyopalatine, and opercular muscles in characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). **Zoology**, v. 115, n. 2, p. 84-116, 2012.

DE CARVALHO, M. R. et al. Systematics must embrace comparative biology and evolution, not speed and automation. **Evolutionary Biology**, v. 35, n. 2, p. 150-157, 2008.

ESCHMEYER, W.N.; FONG, J.D. **Species by Family/Subfamily**. Disponível em: <<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>.

Acesso em: 19 dez. 2013.

FREITAS, A.; BROWN, K. S. Phylogeny of the Nymphalidae (Lepidoptera). **Systematic Biology**, v. 53, n. 3, p. 363-383, 2004.

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

GOLDFINCH, S.; DALE, T.; DEROUEN, K. Science from the periphery: Collaboration, networks and 'Periphery Effects' in the citation of New Zealand Crown Research Institutes articles, 1995-2000. **Scientometrics**, v. 57, n. 3, p. 321-337, 2003.

HENNIG, W. **Phylogenetic systematics**. Urbana: University of Illinois Press, 1999.

HILLIS, D. M. Molecular versus morphological approaches to systematics. **Annual review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 23-42, 1987.

HUBERT, N.; BONILLO, C.; PAUGY, D. Early divergence among the Alestidae (Teleostei, Ostariophyses, Characiformes): Mitochondrial evidences and congruence with morphological data. **Comptes rendus biologiques**, v. 328, n. 5, p. 477-491, 2005.

JAVONILLO, R. et al. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, n. 2, p. 498, 2010.

JAPPE, A. Explaining international collaboration in global environmental change research. **Scientometrics**, v. 71, n. 3, p. 367-390, 2007.

LAURINDO, R.; MAFRA, T. Cienciometria da revista Comunicação & Sociedade identifica interfaces da área. **Comunicação & Sociedade**, n. 53, p. 233-260, jan./jun. 2010.

LIMA, F. C. T., MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; PEZZI DA SILVA, J. F.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASATTI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C. & LUCINDA, P. H. F. Genera *Incertae Sedis* in Characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 106-169.

LOWE-MCCONNELL, R. **Estudos ecológicos em comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: EDUSP, 1999.

MACIAS-CHAPULA, C. A. O papel da informetria e da cienciometria e sua perspectiva nacional e internacional. **Ciência da informação**, v. 27, n. 2, p. 134-140, 1998.

MATTOX, G. M. T; TOLEDO-PIZA, M. Phylogenetic study of the Characinae (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 165, n. 4, p. 809-915, 2012.

MIRANDE, J. M. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology**, v. 8, n. 3, p. 385-568, 2010.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. New York: John Wiley & Sons, 2006.

NICOLAISEN, J.; HJORLAND, B. Practical potentials of Bradford's law: A critical examination of the received view. **Journal of Documentation**, v. 63, n. 3, p. 359-377, 2007.

OLIVEIRA, C. et al. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC evolutionary biology**, v. 11, n. 1, p. 275, 2011.

ORTÍ, G. et al. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. **Journal of Molecular Evolution**, v. 42, n. 2, p. 169-182, 1996.

ROKAS, A. et al. Conflicting phylogenetic signals at the base of the metazoan tree. **Evolution & development**, v. 5, n. 4, p. 346-359, 2003.

RUBINOFF, D. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. **Conservation Biology**, v. 20, n. 4, p. 1026-1033, 2006.

SAITOH, K. et al. Mitochondrial genomics of ostariophysan fishes: perspectives on phylogeny and biogeography. **Journal of Molecular Evolution**, v. 56, n. 4, p. 464-472, 2003.

SCOTLAND, R. W.; OLMSTEAD, R. G.; BENNETT, J. R. Phylogeny reconstruction: the role of morphology. **Systematic Biology**, v. 52, n. 4, p. 539-548, 2003.

SIVASUNDAR, A. et al. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 2, p. 407-417, 2001.

SPINAK, E. Indicadores cienciométricos. **Ciência da Informação**, v. 27, n. 2, p. 141-148, 1998.

SMITH, N. D.; TURNER, A. H. Morphology's role in phylogeny reconstruction: perspectives from paleontology. **Systematic Biology**, v. 54, n. 1, p. 166-173, 2005.

TAGUE-SUTCLIFFE, J. An introduction to informetrics. **Information processing & management**, v. 28, n. 1, p. 1-3, 1992.

VANTI, N. A. P. Da bibliometria à webometria: uma exploração conceitual dos mecanismos utilizados para medir o registro da informação e a difusão do conhecimento. **Ciência da Informação**, v. 31, n. 2, p. 152-162, 2002.

WAHLBERG, N. et al. Synergistic effects of combining morphological and molecular data in resolving the phylogeny of butterflies and skippers. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 272, n. 1572, p. 1577-1586, 2005.

WEITZMAN, S.H.; PALMER, L. Family Gasteropelecidae (Freshwater hatchetfishes). In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA)**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 101-103.

WHEELER, Q.; ASSIS, L.; RIEPPEL, O. Phylogenetics: Heed the father of cladistics. **Nature**, v. 496, n. 7445, p. 295-296, 2013.

WHEELER, W. et al. **Dynamic Homology and Phylogenetic Systematics: A Unified Approach Using POY**. New York: American Museum of Natural History, 2006.

WIENS, J. J. The role of morphological data in phylogeny reconstruction. **Systematic Biology**, v. 53, n. 4, p. 653-661, 2004.

YU, G.; LI, Y. Parameter identification of the observed citation distribution. **Scientometrics**, v. 71, n. 2, p. 339-348, 2007.

Anexo 1

Normas do periódico *Publicatio UEPG – Ciências Biológicas e da Saúde.*

Diretrizes para Autores

1. DAS NORMAS GERAIS

1.1 A Revista PUBLICATIO UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual de Ponta Grossa (ISSN 1676- 8485), destina-se à publicação de trabalhos de pesquisa básica e aplicada. A maioria das páginas da revista é reservada para: pesquisa original; observações clínicas com análise e discussão; relatos de casos ou reuniões clínicas, com discussões; estatísticas epidemiológicas, com análises e discussões; descrições ou avaliações de métodos ou procedimentos nas áreas de Ciências Biológicas e da Saúde. São aceitos artigos de revisão e comunicações breves.

1.2 Os trabalhos enviados para publicação devem ser inéditos, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico. A Revista PUBLICATIO UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde reserva todos os direitos autorais do trabalho publicado, inclusive de tradução, permitindo, entretanto, a sua posterior reprodução com devida citação de fonte.

1.3 A Revista PUBLICATIO UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde receberá para publicação trabalhos redigidos em português e/ou inglês, ficando os textos dos mesmos sob inteira responsabilidade dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião dos Editores Associados e do Corpo de Consultores.

1.4 Deverão constar, no final dos trabalhos, e-mail dos autores, e colaboradores.

1.5 A Revista PUBLICATIO UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde reserva o direito de submeter todos os originais à apreciação do Editor Associado e Corpo de Consultores, que dispõem de plena autoridade para decidir sobre a conveniência ou não da publicação, podendo, inclusive reapresentá-los aos autores, com sugestões para que sejam feitas alterações necessárias no texto e/ou para que os adaptem às normas editoriais da Revista. Nesse caso, o referido trabalho será reavaliado pelos consultores.

1.6 Caberá a cada autor de artigo, um exemplar da revista, como única indenização por direitos autorais.

1.7 Não serão publicadas fotos coloridas, a não ser em casos de absoluta necessidade e a critério da comissão editorial, com custos para os autores.

1.8 Todos os trabalhos que envolvam estudo com seres humanos, incluindo-se órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com as normas internacionais para pesquisa em seres humanos.

2. DA APRESENTAÇÃO DO ORIGINAL

Publicatio UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde
Publicatio UEPG - Biological and Health Sciences

ESCLARECIMENTOS E NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DOS TRABALHOS

Os originais destinados à Revista PUBLICATIO UEPG - Ciências Biológicas e da Saúde deverão ser redigidos de acordo com as seguintes normas:

2.1 Os originais deverão ser redigidos na ortografia oficial e digitados em folhas de papel tamanho A4 (210 mm X 297 mm com espaço 1,5cm e margem de 3cm de cada um dos lados, e margens superior e inferior 2,5cm perfazendo o total de no máximo 30 páginas, incluindo as ilustrações (gráficos, tabelas, fotografias etc.). Utilizar fonte Times New Roman, tamanho 12, exceto para notas de rodapé e título que deverão apresentar corpo 9 e 14 respectivamente.

2.2 Ilustrações:

- devem ser de boa qualidade;
- em separado do texto, numeradas em algarismos arábicos.;
- legendas em folha à parte com indicação do local aproximado de inserção no corpo do texto;
- figuras digitais devem ser apresentadas em JPG - 300 dpi de resolução em CD);
- gráficos devem ser apresentados no programa Excel ou no Word;
- mantendo as devidas proporções, usar tamanho máximo de largura de 8,5 cm ou 17,5 cm x 23,5 cm.

2.3 Tabelas e quadros

- legendas serão colocadas na parte superior. Numeradas em algarismos arábicos, conforme norma ABNT NBR 14724 de 17/03/2011.
- usar tamanho máximo de largura de 8,5 cm ou 17,5 cm.

2.4 As notas devem ser reduzidas ao mínimo e digitadas em pé de página, numeradas a partir de 1. Se houver nota no título, ela receberá asterisco e não numeração. As notas não devem ser utilizadas para referência bibliográfica. Estas devem ser feitas no corpo do trabalho.

2.5 Recomenda-se anotar, no texto, os nomes compostos e dos elementos, ao invés de suas fórmulas ou símbolos; preferencialmente, os períodos de tempo, também por extenso, ao invés de números; binômios da nomenclatura zoológica e botânica, por extenso e sublinhados, ao invés de abreviaturas; os símbolos matemáticos e físicos, conforme as regras internacionalmente aceitas e os símbolos métricos, de acordo com a legislação brasileira vigente.

2.6 No preparo do original, deverá ser observada a seguinte estrutura:

a) Cabeçalho:

Título do artigo e subtítulo (quando os artigos forem em PORTUGUÊS, colocar título e subtítulo em português e inglês; quando os artigos forem em INGLÊS, colocar título e subtítulo em inglês e português).

Nome do(s) autor(es) - Com indicação da instituição de origem. Endereço, e-mail, telefone e fax do autor principal, e e-mail dos demais autores.

b) Resumo

Consiste na apresentação concisa dos pontos relevantes do texto, com as principais conclusões, em no máximo 250 palavras.

c) Palavras-chave- Correspondem às palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo. No máximo 5.

d) Abstract- Consiste na apresentação concisa, em inglês, dos pontos relevantes do texto, com as principais conclusões, e deve conter, no máximo, 250 palavras.

e) Keywords- Correspondem às palavras ou expressões em inglês que identificam o conteúdo do artigo. No máximo 5.

f) Texto- Introdução, material e método, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos (quando houver).

g) Referências- Observar a norma ABNT para as referências NBR-6023/2002. As referências deverão estar ordenadas alfabeticamente pelo sobrenome do autor. As abreviaturas dos títulos dos periódicos citados deverão estar de acordo com as normas internacionais.

Obs.: A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos em andamento e os não publicados não devem ser incluídos na lista de referências bibliográficas, mas citados em notas de rodapé.

Alguns exemplos de referências bibliográficas:

Livro com um autor:

SANTI, V.

Livro com dois autores, elencar os nomes:

FIDALGO, O.; BONONI, V. L. R.

Livro com três autores, elencar os nomes conforme a ordem que aparecem na publicação, separados por ponto e vírgula:

ALMEIDA, J. C.; VARGAS, F.; LOBATO, M. L.

Mais de três autores, indica-se apenas o primeiro, seguido da expressão "et al."

CORREA, C. P. et al.

Capítulo de livro

STAHL, S. S. Marginal lesion. In: GOLDMAN, H. M.; COHEN, D. W. **Periodontal therapy**. 5.ed. St. Louis: Mosby, 1973. p. 94-98.

Tese

JANSEN, J. L. **Modificação da superfície de partículas sólidas através de tensoativos não iônicos em solução aquosa**: adsolubilização de esteróides, ácidos barbitúricos e outras moléculas ativas. Paris, 1995. 734 p. Tese (Doutorado em) - Université de Paris-Sud.

Artigo de periódico

TAKEDA, I. J. M.; GUERRERO, R. T. Fungos endófitos do gênero *Xylaria* em *Ilex paraguariensis* St. Hil (Aquifoliaceae). **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v.1, n.3, p.109-125, 1997.

Maiores detalhes sobre referenciação, consultar norma NBR 6023/2002 ou o Manual de Normalização Bibliográfica para Trabalhos Científicos no endereço: <http://ri.uepg.br:8080/riuepg/handle/123456789/441>

CAPÍTULO 2

Variabilidade e distância genética em populações de
***Moenkhausia e Hemigrammus* (Pisces: Characiformes)**

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para a publicação científica no periódico Genetics and Molecular Research.

Variabilidade e distância genética em populações de *Moenkhausia e Hemigrammus* (Pisces: Characiformes)

Thaís Fernandes Mendonça Mota¹, Sônia Maria Alves Pinto Prioli^{2,3} e Alberto José Prioli^{2,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada (PGB), Universidade Estadual de Maringá (UEM)

²Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia), Universidade Estadual de Maringá (UEM)

³Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá (UEM)

*Rua José de Souza Leite, 1622 Jd. Laranjeiras, Paranavaí, Paraná.
tfmm_0412@hotmail.com. (044) 3422-5362.

Variabilidade e distância genética em populações de *Moenkhausia* e *Hemigrammus* (Pisces: Characiformes)

RESUMO

As espécies *Moenkhausia bonita* Benine, 2004 e *Hemigrammus marginatus* Ellis, 1911 diferenciam-se principalmente por a primeira apresentar linha lateral completa e a segunda linha lateral incompleta. Porém, alguns exemplares atribuídos a *M. bonita* coletados na bacia do alto rio Paraná apresentam diferentes níveis de desenvolvimento da linha lateral, dificultando a correta separação de *H. marginatus*. Desta forma, o objetivo do trabalho é utilizar ferramentas moleculares para analisar a similaridade genética entre populações de *M. bonita* que apresentam variados níveis de desenvolvimento da linha lateral, encontradas no alto rio Paraná, de *M. bonita* da localidade-tipo e populações de *H. marginatus*. Foram utilizadas sequências parciais do gene *COI*, *Histona H3* e *S7 íntron 1*. Foram incluídas nas análises sequências *COI* de *H. marginatus* disponível do GenBank. Para o gene *COI* foram encontrados 20 haplótipos, para o gene *Histona H3* e *S7 íntron 1*, um e três haplótipos, respectivamente. O gene *Histona H3* não se mostrou eficiente em distinguir as espécies analisadas. O gene *S7 íntron 1* corroborou os resultados encontrados com o gene *COI*. Os espécimes de *H. marginatus* e *M. bonita* podem ser considerados grupo-irmãos. Os espécimes atribuídos à *M. bonita*, coletados no alto rio Paraná, que apresentam variados níveis de desenvolvimento da linha lateral são de fato da espécie *M. bonita*, portanto o desenvolvimento da linha lateral pode não ser um caráter consistente para a discriminação entre *Hemigrammus* e *Moenkhausia*.

Palavras-chave: *Coi*; *S7*; *Histona H3*; *Hemigrammus*; Linha lateral;

Variability and genetic distance in populations of *Moenkhausia* and *Hemigrammus* (Pisces: Characiformes)

ABSTRACT

The species *Moenkhausia bonita* Benine, 2004 and *Hemigrammus marginatus* Ellis, 1911 differ mainly because the first has a complete lateral line and the second incomplete lateral line. However, some specimens assigned to *M. bonita* listed in the upper rio Paraná basin have different levels of the lateral line development, making the correct separation *H. marginatus* to be difficult. So, the aim of this work is to use molecular tools to analyze the genetic similarity between populations of *M. bonita* that present varying levels of lateral line development, found in the upper Paraná River, of *M. bonita* locality-type and populations of *H. marginatus*. Partial sequences of gene *COI*, *Histone H3* and *S7 intron 1* were used. *COI* of *H. marginatus* were included in the sequences analyzes available of GenBank. For the *COI* gene 20 haplotypes were found, for the *Histona H3* and *S7 intron1* gene, one and three haplotypes, respectively. The *Histona H3* gene was not efficient in distinguishing the two species analyzed. The *S7 intron1* gene corroborated the results found with the *COI* gene. The specimens of *H. marginatus* and *M. bonita* can be considered sib groups. The specimens assigned to *M. bonita*, collected at Upper River Paraná, which have varying levels of the lateral line development are in fact of the *M. bonita* specie, so the lateral line development can not be a consistent character for the discrimination between *Hemigrammus* and *Moenkhausia*.

KEYWORDS: *Coi*; *S7*; *Histone H3*; *Hemigrammus*; Lateral line;

INTRODUÇÃO

A região Neotropical apresenta uma comunidade ictiofaunística muito rica e diversificada. A ordem Characiformes compreende um dos maiores grupos de peixes e a família Characidae é a maior e mais complexa, com mais de 1050 espécies (Nelson, 2006; Eschmeyer e Fong, 2013). Esta família tem apresentado uma alta taxa de descrição, com mais de 80 espécies descritas nos últimos quatro anos. Contudo, pouco se sabe sobre as inter-relações deste grupo e dos 165 gêneros que compõe a família, 88 são considerados *incertae sedis*. Os gêneros *Moenkhausia* Eigenmann 1903 e *Hemigrammus* Gill 1858 estão entre os grupos considerados não-monofiléticos e com taxonomia problemática (Lima et al., 2003).

O gênero *Moenkhausia* é composto por 75 espécies válidas de pequenos peixes, amplamente distribuídos pelas bacias hidrográficas da América do Sul, apresentando maior diversidade nas bacias Amazônica e Guianas (Gery, 1977; Eschmeyer e Fong, 2013). Compreendendo 52 espécies válidas, o gênero *Hemigrammus* possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em 10 países da América do Sul e em um país da América Central. No Brasil ocorrem 35 espécies, sendo que 17 são endêmicas (Lima et. al., 2003; Bertaco e Carvalho, 2005). Estes dois gêneros são caracterizados por um conjunto de caracteres, porém, nenhum exclusivo e muitos destes sobrepostos. Os limites sugeridos por Eigenmann (1907) para diferenciar os gêneros *Moenkhausia* e *Hemigrammus* baseiam-se no grau de desenvolvimento da linha lateral, sendo completa para *Moenkhasia* e incompleta para *Hemigrammus*.

A espécie *Moenkhausia bonita* Benine, Castro & Sabino 2004, foi encontrada nas cabeceiras do rio Baía Bonita, no Município de Bonito, Mato Grosso do Sul, sudoeste do Brasil. Ocorre principalmente próximo à superfície em cardumes de 10 a 30 indivíduos, em zona de baixa corrente. Alimentam-se de insetos e algas e constituem um importante componente da cadeia alimentar, principalmente para outras espécies de peixes, de aves e outros carnívoros que vivem na planície de inundação (Lima, 2007). *Moenkhausia bonita* é muito semelhante a *Hemigrammus marginatus* Ellis 1911, e diferencia-se apenas por possuir uma linha lateral completa e uma mancha em forma de losango no pedúnculo caudal (Benine et al., 2004).

Moenkhausia bonita possui distribuição registrada somente na região do Mato Grosso do Sul. Entretanto, recentemente foi observado que exemplares desta espécie também vêm sendo capturados pelo Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia), da Universidade Estadual de Maringá, na planície de inundação do alto rio Paraná (Figura 1). A proximidade da bacia do rio Paraguai com riachos afluentes do rio Ivinhema

pode explicar a distribuição de *M. bonita* na bacia do rio Paraná. Porém, devido a sua grande similaridade morfológica com a espécie de *H. marginatus*, pode ser que esta espécie não tenha sido corretamente identificada, uma vez que problemas de identificação também são encontrados no gênero *Hemigrammus* (Graça e Pavanelli, 2007; Maniglia et al., 2012). A correta identificação se tornou ainda mais difícil, pois alguns exemplares atribuídos a *M. bonita* coletados na bacia do alto rio Paraná apresentam diferentes níveis de desenvolvimento da linha lateral, dificultando a correta separação.



Figura 1- *Moenkhausia bonita*, CP 29 mm; Brasil, planície de inundação do alto rio Paraná, bacia do alto rio Paraná, Estado do Paraná, município de Porto Rico.

Uma vez que a correta determinação taxonômica é um fator essencial para a quantificação da riqueza de espécies, padrões de biodiversidade, composição e estruturação das comunidades (Gotelli, 2004), o uso de técnicas moleculares pode auxiliar nesta problemática, pois marcadores moleculares são ferramentas eficazes para solucionar problemas taxonômicos.

Nas últimas décadas o emprego de técnicas de biologia molecular tem se mostrado muito importante no estudo da variabilidade genética e estudos taxonômicos em populações naturais (Prioli et al., 2002; Moyer et al., 2004). Desta forma, a proposta do presente trabalho é utilizar ferramentas moleculares para analisar a similaridade genética entre populações de *M. bonita* que apresentam variados níveis de desenvolvimento da linha lateral, encontradas no alto rio Paraná, de *M. bonita* da localidade-tipo e populações de *H. marginatus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Na planície de inundação do alto rio Paraná os exemplares foram coletados em três localidades. As coletas foram realizadas no Ressaco do Leopoldo no rio Paraná (22° 45' S 53°

16'O), no rio Baía (22°43'S 53° 7'O) e no riacho Caracu (22°46'S 53°15'O). Foram coletados exemplares identificados como *M. bonita* que apresentam linha lateral completa, linha lateral incompleta e linha lateral descontínua, além de, alguns exemplares de *Moenkhausia gracilima* Eingenmann, 1908 e *Moenkhausia intermedia* Eingenmann, 1908.

Na bacia do rio Paraguai, no rio Baía Bonita (21°09'S 56°25'O), no município de Bonito (MS), que é a localidade-tipo de *M. bonita*, foram coletados espécimes de *M. bonita* com linha lateral completa.

Os pontos de coleta estão indicados na Figura 2. Os indivíduos inteiros foram colocados em frascos com álcool comercial e armazenados a -20°C.



Figura 2- Pontos de coleta de *Moenkhausia*. (1) Planície de inundação da bacia do alto rio Paraná. (2) Rio Baía Bonita, afluente do rio Miranda na bacia do rio Paraguai. Brasil.

Processamento do DNA

O DNA total foi extraído do músculo utilizando o kit de extração Wizard® (Wizard Genomic DNA Purification Kit - Promega Corporation, EUA), seguindo as instruções do

fabricante. Sequências parciais do gene mitocondrial citocromo C oxidase I (*COI*) e dos genes nucleares *Histona H3* e primeiro íntron do gene ribossômico *S7 (S7 íntron 1)* foram amplificadas por reação em cadeia polimerase (PCR), com as mesmas condições propostas por Prioli et al. (2002). Os padrões de temperatura de amplificação foram os seguintes: um ciclo inicial de 94°C por dois minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50-58°C (de acordo com o primer) por 40 segundos e 72°C por dois minutos, seguido de extensão final de 72° por cinco minutos. Para o *locus S7 íntron 1*, foram utilizados os primers descritos por Chow e Hazama (1998), para o *COI* os descritos por Ward et al. (2005) e para o *Histona H3* os primers descritos por Colgan et al. (1998). Todos os produtos da extração e do PCR foram quantificados por comparação com quantidades conhecidas de fago λ em gel de agarose (0,8%) corados com brometo de etídeo. Os *amplicons* foram purificados em Polietilenoglicol-NaCl (PEG-NaCl) como descrito por Rosenthal et al., (1993) e posteriormente utilizados na reação de sequenciamento com Big Dye Terminator Cycle Sequencing, de acordo com as instruções do fabricante. A determinação da sequência dos nucleotídeos foi realizada em sequenciador automático MegaBace (Amersham) seguindo instruções do fabricante.

Análise de dados

As sequências nucleotídicas com confiabilidade superior a 90% foram editadas manualmente com o programa BioEdit (Hall, 1999) e alinhadas em Clustal W (Thompson et al., 1994) utilizando o programa Mega 5.2 (Tamura et al., 2011). As sequências foram analisadas através do modelo de substituição nucleotídica selecionado com auxílio dos programas *Modeltest 3.7* (Posada e Crandal, 1998) implementado no programa Mega 5.2, utilizando os critérios de Akaike (*Corrected Akaike Information Criterion -AICc*) e bayesiano (*Bayesian Information Criterion - BIC*). As matrizes de distância p de cada região foram utilizadas para o cálculo dos autovalores e autovetores com correção de Lingoes através do programa DistPCoA (Legendre e Anderson, 1999). O gráfico de dispersão em coordenadas principais foi construído a partir de autovetores, com o Software Statística 7.1. Foram construídos o dendrograma *neighbor-joining* com 10.000 reamostragens *bootstrap*, no programa Mega 5.2.

Todas as sequências parciais obtidas e analisadas serão posteriormente depositadas no GenBank. As sequências do GenBank HM906014, HM906016, HM906015, HM906017 de *H. marginatus* foram incluídas nas análises. Como *outgroup* também foram inseridas as

sequências do GenBank HM405066 de *Hemigrammus cf gracilis* (Lutken 1875), BC153403 de *Danio rerio* (Hamilton 1822), EF176129.1 de *Paracheirodon axelrodi* (Schultz 1956).

RESULTADOS

Após a edição das sequências, as regiões *COI*, *S7 íntron 1* e *Histona H3*, foram avaliadas individualmente para a realização do alinhamento, verificando o número de variáveis e o melhor modelo evolutivo. O modelo Tamura 3 parâmetros (T92) foi selecionado como melhor modelo evolutivo para *COI* e *Histona H3*, enquanto que o modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) foi indicado para *S7 íntron 1*. Os resultados estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação entre gene, melhor modelo evolutivo, tamanho da sequência e número de sítios variáveis.

Gene	Modelo evolutivo	Tamanho da sequência	Número de sítios variáveis
<i>COI</i>	T92	579 bases	22
<i>S7 íntron 1</i>	HKY	420 bases	2
<i>Histona H3</i>	T92	271 bases	0

COI

Foram amplificados e sequenciados um fragmento parcial do gene *COI* de 41 espécimes de *M. bonita*, três de *M. intermedia* e três de *M. gracilima*, além das sequências obtidas no GenBank de *H. marginatus* e *H. cf gracilis*. A amplificação resultou em um fragmento de aproximadamente 700 pares de bases (pb), após a edição manual e exclusão das regiões de baixa qualidade de sequenciamento, foram obtidas sequências com 579 pb. Este fragmento corresponde a uma sequência de 190 aminoácidos. Foram encontrados 20 haplótipos (Tabela 2). Os espécimes de *M. bonita* da localidade tipo e do alto rio Paraná não compartilham haplótipos. Os diferentes haplótipos encontrados nos espécimes do alto rio Paraná não estão relacionados com o grau de desenvolvimento da linha lateral.

Tabela 2. Polimorfismo nucleotídico de sequências do gene *COI* do DNA mitocondrial de *Moenkhausia bonita* com diferentes morfótipos quanto à linha lateral.

Espécime	Morfótípoda linha lateral	Sítio nucleotídico polimórfico																					
		9	10	19	39	51	52	60	99	177	213	225	227	228	351	339	339	448	448	510	517	517	517
BC 1	Completa	A	G	G	C	C	C	T	C	G	A	C	T	A	T	C	C	C	G	T	A	C	A
BC 2	Completa	.	.	.	T	A	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	T	.	.
BC 3	Completa	G
BC 5	Completa	G
BC 6	Completa	T	.	G
BC 7	Completa	G	.	.	.	G	G
BC 8	Completa	.	.	.	T	A	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	T	.	.
BC 9	Completa	G	.	.	.	G	G
BC 10	Completa	A	G	.	.	G	C	.	.	G	.	C	.	G	G
BC 11	Completa	.	.	.	T	A	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	T	.	.
BC 12	Completa	G
BC 13	Completa	G
BC 14	Completa	.	.	.	T	A	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	T	.	.
BC 15	Completa	G
BC 16	Completa	.	T	G
BC 17	Completa	G
BD 3	Descontínua	G
BD 4	Descontínua	T	A	T	.	G
BD 5	Descontínua	G
BD 7	Descontínua	A	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	G	G
BD 8	Descontínua	.	.	T	G	.	.	.	G	G
BD 9	Descontínua	G
BD 10	Descontínua	G
BD 11	Descontínua	.	.	.	T	A	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	T	G	G
BD 12	Descontínua	G
BD 13	Descontínua	G
BI 1	Incompleta	G
BI 3	Incompleta	G
BI 6	Incompleta	G
BI 7	Incompleta	.	.	.	T	A	G	.	.	.	C	.	.	G	.	.	T	.	.
BI 8	Incompleta	A	G	.	.	.	C	.	.	G
BI 9	Incompleta	.	.	.	T	G
BI 10	Incompleta	T	G
BM 1	Baía Bonita	G	.	A	G	T	G	.	.	.	T	G	A	.	.	G	G	
BM 2	Baía Bonita	A	G	T	T	G	A	.	.	G	G	
BM 3	Baía Bonita	A	G	T	T	G	A	
BM 4	Baía Bonita	.	.	.	T	T	.	.	A	G	T	T	G	A	.	.	G	G	
BM 5	Baía Bonita	A	G	T	T	G	A	.	.	G	G	
BM 6	Baía Bonita	A	G	T	T	G	A	
BM 7	Baía Bonita	A	G	T	T	G	A	

As proporções de diferenças nucleotídicas entre os indivíduos identificados como *M. bonita* da planície de inundação do alto Paraná e do rio Baía Bonita variaram em média 0,014.

Ocorreu uma menor variação entre os exemplares de *M. bonita* e *H. marginatus*, em média 0,073, quando comparados aos outros exemplares do gênero *Moenkhausia* (Tabela 3).

Tabela 3. Média dos valores de distância p não corrigida, baseados em sequências do gene *COI*, entre indivíduos de *M. bonita* do rio Baía Bonita, do alto rio Paraná com linha lateral completa, incompleta e descontínua, de *M. gracilima*, de *M. intermedia* e de *H. marginatus*. Em destaque valores intra-grupos.

	<i>M. bonita</i> Baía Bonita	<i>M. bonita</i> incompleta	<i>M. bonita</i> descontínua	<i>M. bonita</i> completa	<i>M.</i> <i>gracilima</i>	<i>M.</i> <i>intermedia</i>	<i>H.</i> <i>marginatus</i>
<i>M. bonita</i> Baía Bonita	0,004						
<i>M. bonita</i> incompleta	0,014	0,004					
<i>M. bonita</i> descontínua	0,014	0,006	0,007				
<i>M. bonita</i> completa	0,014	0,008	0,008	0,008			
<i>M. gracilima</i>	0,175	0,174	0,176	0,177	0,007		
<i>M. intermedia</i>	0,225	0,225	0,225	0,227	0,106	0,003	
<i>H. marginatus</i>	0,076	0,071	0,071	0,074	0,173	0,221	0,002

A análise de diversidade intra-específica, a partir de sequências do gene *COI*, demonstrou baixos valores, em média 0,73%. A maior diversidade intra-específica foi observada entre os espécimes de *M. bonita* coletados no alto rio Paraná e os indivíduos coletados no rio Baía Bonita. As médias dos valores interespecíficos variaram em média de 15,97%. O menor valor interespecífico foi encontrado entre as espécies de *H. marginatus* e *M. bonita* e o maior valor interespecífico foi observado entre as espécies de *M. intermedia* e *M. bonita*.

Os resultados obtidos na reconstrução filogenética e no gráfico de dispersão (Figura 3 e Figura 4, respectivamente), demonstraram a formação de quatro grupos bem definidos

denominados: *M. gracilima*, *M. intermedia*, *H. marginatus* e *M. bonita*. Todos os espécimes de *M. bonita* ficaram no mesmo agrupamento. O grupo *H. marginatus* ficou como grupo irmão de *M. bonita*.

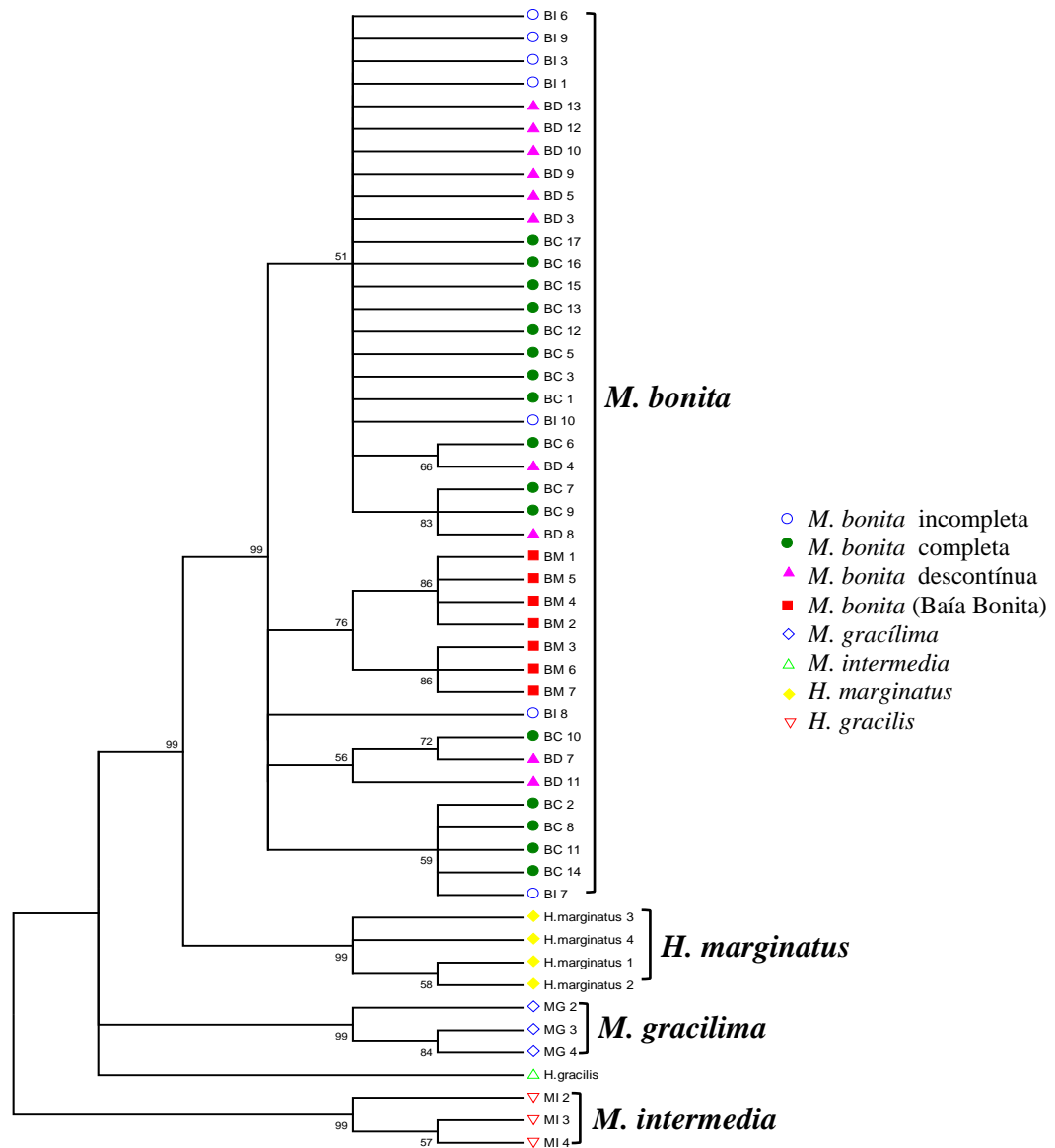


Figura 3. Dendrograma *neighbor-joining*, com 10.000 reamostragens *bootstrap*, baseado na matriz de distância genética calculado com o modelo T92 de seqüências do gene *COI*.

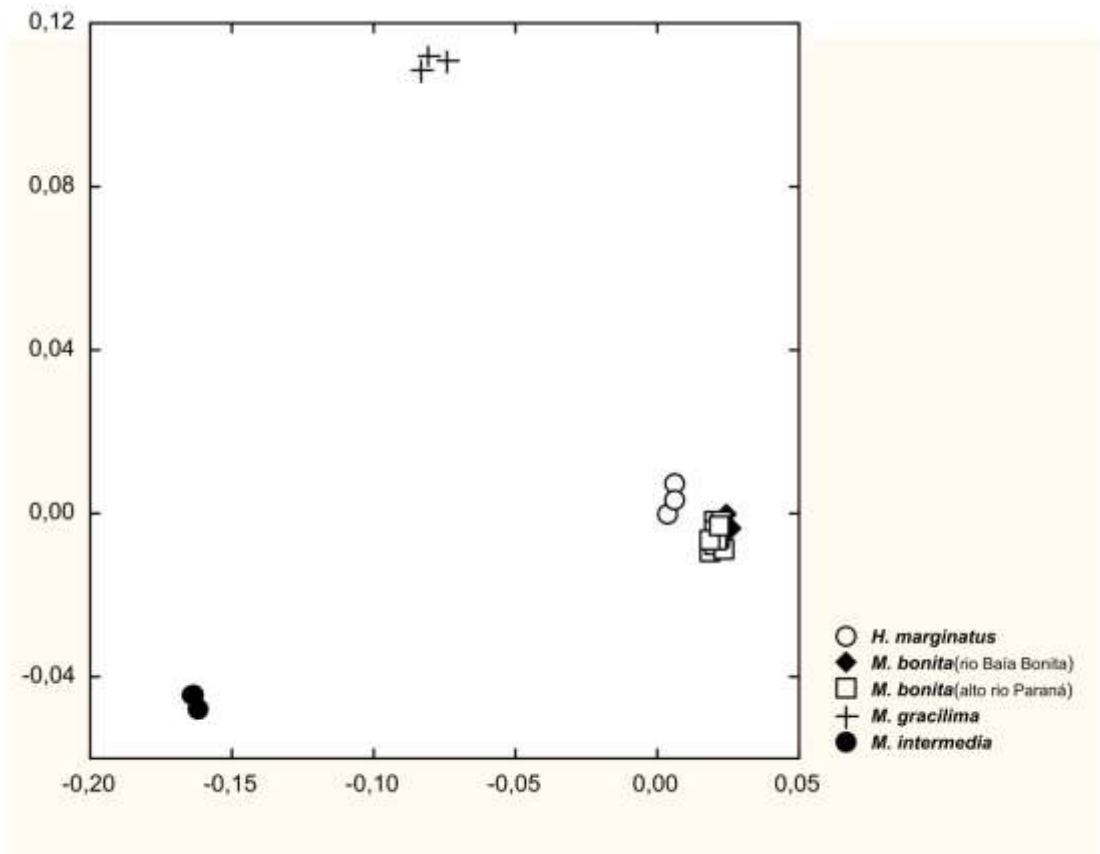


Figura 4. Gráfico de dispersão genética dos indivíduos de *M. bonita* do rio Baía Bonita, de *M. bonita* do alto rio Paraná com linha lateral completa, incompleta e descontínua, de *H. marginatus*, de *M. gracilima* e de *M. intermedia*, baseado nos autovetores calculados após correção de Lingoes a partir da matriz de distância p de seqüências do gene *COI*.

Histona H3

Seqüências parciais do gene *Histona H3* foram amplificadas e sequenciadas. A amplificação resultou em um fragmento de aproximadamente 300 pb, após o alinhamento foram obtidas seqüências de 271 pb. Este fragmento corresponde a uma seqüência de 90 aminoácidos. Foram obtidas seqüências de quatro espécimes de *M. bonita* do rio Baía Bonita, 27 de *M. bonita* do alto rio Paraná, quatro de *M. gracilima*, três de *M. intermedia*, além da seqüência de *D. rerio* obtida no GenBank. Comparando os indivíduos do gênero *Moenkhausia*, esta região apresentou apenas dois sítios variáveis para os espécimes de *M. gracilima*. Os espécimes de *M. bonita* e *M. intermedia* compartilham o mesmo haplótipo. A proporção de divergência nucleotídica entre *M. gracilima* e os outros espécimes de *Moenkhausia* variaram 0,007 (Tabela 4).

Tabela 4. Média dos valores de distância p não corrigida entre espécimes de *M. bonita*, de *M. gracilima*, de *M. intermedia* e de *D. rerio*, baseados em sequências do gene *Histona H3*.

	<i>M. bonita</i>	<i>M. gracilima</i>	<i>M. intermedia</i>	<i>D. rerio</i>
<i>M. bonita</i>	0			
<i>M. intermedia</i>	0	0		
<i>M. gracilima</i>	0,007	0	0,007	
<i>D. rerio</i>	0,144	0,149	0,144	0

Por meio do gráfico de dispersão e da reconstrução filogenética (Figura 5 e Figura 6, respectivamente), não foi possível diferenciar os espécimes de *M. bonita* e *M. intermedia*, todos ficaram incluídos no mesmo agrupamento.

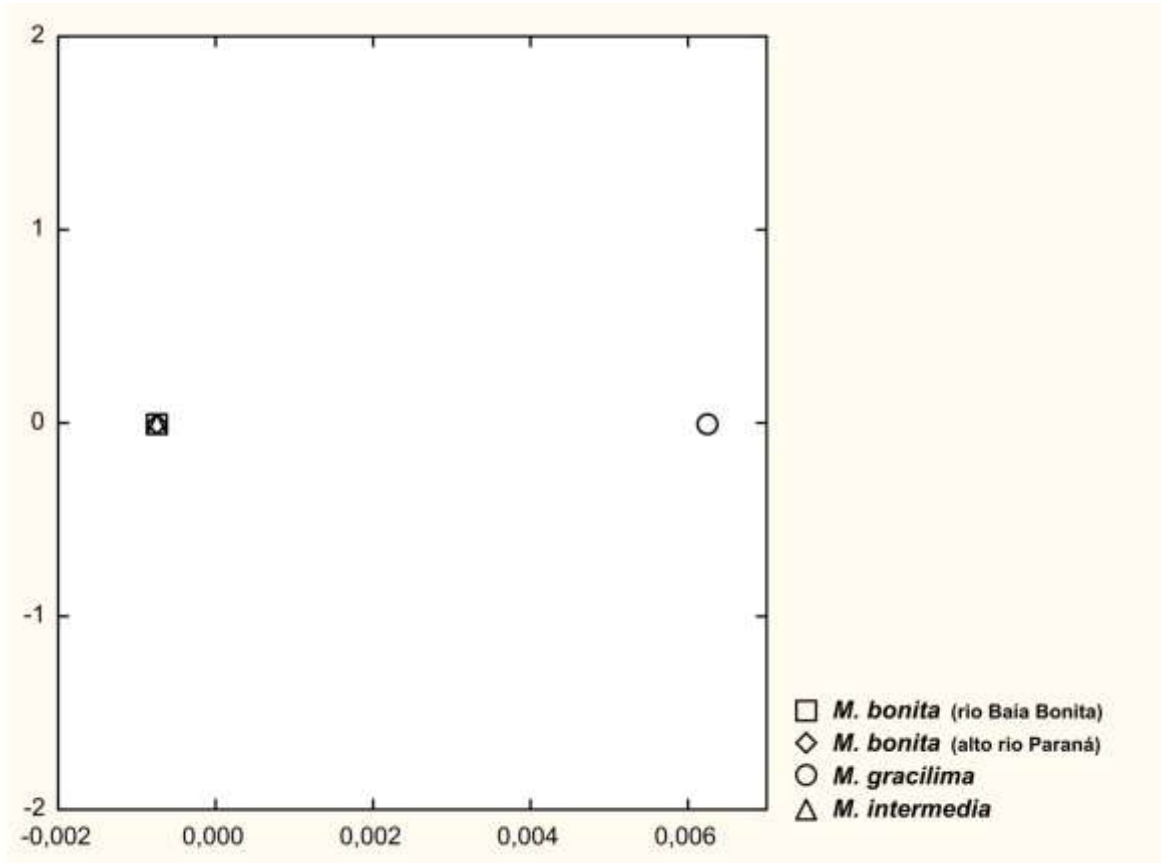


Figura 8. Gráfico de dispersão em coordenadas principais de indivíduos de *M. bonita* do alto rio Paraná com linha lateral completa, incompleta e descontínua, de *M. bonita* do rio Baía Bonita, de *M. gracilima* e de *M. intermedia*, baseado nos autovetores calculados após correção de Lingoes a partir da matriz de distância p de seqüências do gene *Histona H3*.

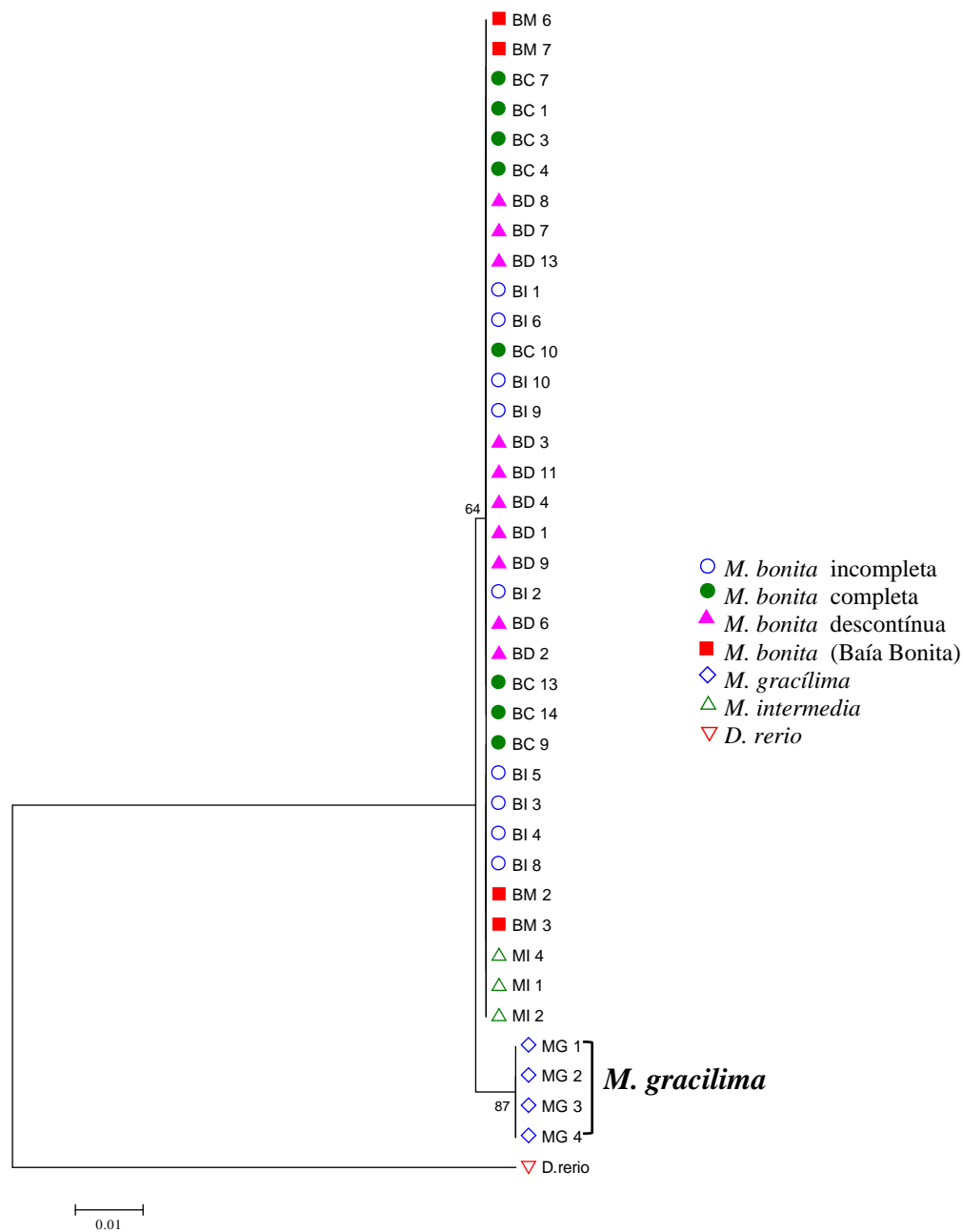


Figura 7. Dendrograma *neighbor-joining*, com 10.000 reamostragens *bootstrap*, baseado na matriz de distância genética T92 de seqüências parciais do gene *Histona H3*.

S7 íntron 1

A amplificação do fragmento parcial do gene *S7 íntron 1*, resultou em uma seqüência de aproximadamente 500 pb, após o alinhamento foram obtidas seqüências com 420 pb. Não foi possível sequenciar o gene *S7 íntron 1* de nenhum indivíduo do rio Baía Bonita, devido a problemas no sequenciamento. Foram obtidas seqüências de 17 indivíduos de *M. bonita* do

alto rio Paraná, três de *M. intermedia* e duas de *M. gracilima*, uma sequência de *P. axelrodi* disponível no GenBank foi incluída na análise. Os espécimes de *M. bonita* apresentaram apenas dois sítios nucleotídicos variáveis e três haplótipos, nenhum relacionado com os diferentes níveis de desenvolvimento da linha lateral.

As médias dos valores de distância p, obtidas a partir de sequências parciais do gene *S7 íntron1*, entre os indivíduos de *M. bonita* com diferentes níveis de desenvolvimento da linha lateral coletadas no alto rio Paraná, foram muito pequenas. Os espécimes de *M. intermedia* em relação a *M. bonita*, apresentaram uma proporção de divergência nucleotídica maior que os de *M. gracilima*, concordando com os resultados obtidos por meio das sequências do gene *COI* (Tabela 5).

Tabela 5. Média dos valores de distância p não corrigida entre indivíduos de *M. bonita* do alto rio Paraná com linha lateral completa, incompleta e descontínua, de *M. gracilima*, de *M. intermedia* e de *Paracheirodon axelrodi*, baseados em sequências do gene *S7 íntron1*.

	<i>M. bonita</i> incompleta	<i>M. bonita</i> descontínua	<i>M. bonita</i> completa	<i>M.</i> <i>gracilima</i>	<i>M. intermedia</i>	<i>P. axelrodi</i>
<i>M. bonita</i> incompleta	0					
<i>M. bonita</i> descontínua	0,001	0,001				
<i>M. bonita</i> completa	0,003	0,003	0,003			
<i>M. gracilima</i>	1,086	1,086	1,086	0		
<i>M. intermedia</i>	1,431	1,431	1,431	1,254	0,001	
<i>P. axelrodi</i>	1,293	1,293	1,293	1,063	1,133	0

O dendrograma e o gráfico de dispersão (Figura 8 e Figura 9, respectivamente), confirmaram os resultados obtidos com o *COI* e também mostraram a formação de grupos bem definidos, desta vez nomeados: *M. bonita*, *M. gracilima* e *M. intermedia*.

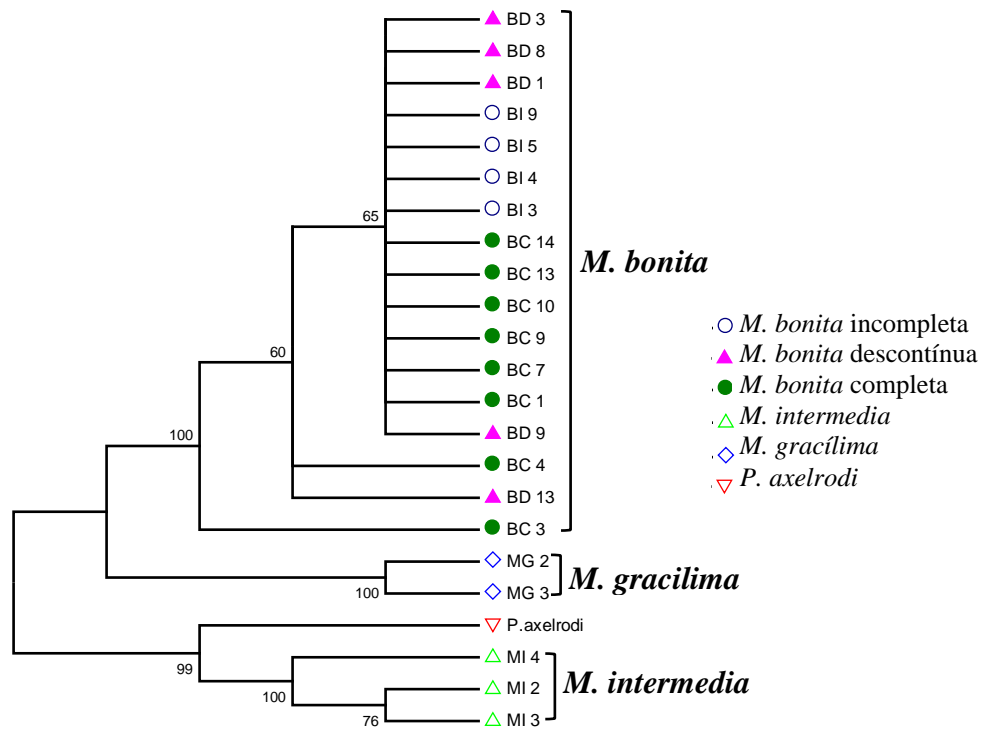


Figura 8. Dendrograma *neighbor-joining*, com 10.000 reamostragens *bootstrap*, baseado na matriz de distância genética HKY de sequências S7 intron 1.

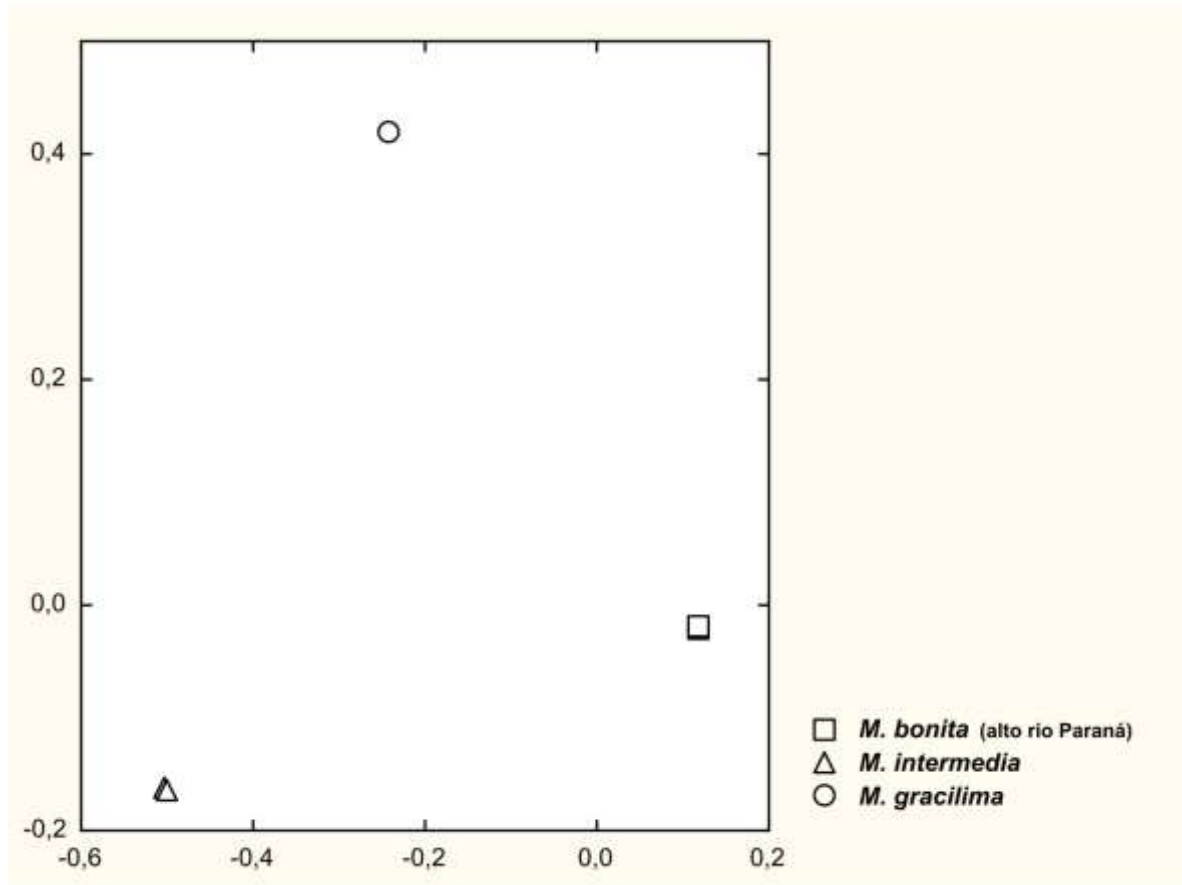


Figura 9. Gráfico de dispersão em coordenadas principais de indivíduos de *M. bonita* do alto rio Paraná com linha lateral completa, incompleta e descontínua, de *M. gracilima* e de *M. intermedia*, baseado nos autovetores calculados após correção de Lingoes a partir da matriz de distância p de sequências *S7 íntron 1*.

DISCUSSÃO

O DNA mitocondrial é um importante marcador molecular, pois possui algumas características favoráveis, como ausência de recombinação, herança materna, alta taxa de mutação e fácil isolamento, desta forma, até mesmo espécies muito próximas podem ser discriminadas (Rubinoff, 2006). O gene *COI*, conhecido como *DNA barcode*, é capaz de discriminar uma grande variedade de espécies animais (Hebert et al., 2003). A sequência desta região tem sido amplamente utilizada como uma ferramenta rápida e precisa para identificar espécies (Hajibabaei et al., 2007), inclusive se mostrou eficiente em discriminar corretamente espécies de peixes de água doce (Bellafronte et al., 2013; Pereira et al., 2013).

As análises do gene *COI* foram eficientes em separar os espécimes de *M. bonita*, *M. gracilima*, *M. intermedia* e *H. marginatus*. O consórcio da Vida CBOL propõe que os valores

interespecíficos devem ser 10 vezes maiores que os valores intra-específicos para diferenciar espécies (Hebert et al., 2004). As médias dos valores interespecíficos foram bem maiores que as médias dos valores intra-específicos (diversidade intra-específica de 0,73% e interespecífica de 15,97%). Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos realizados com *DNA barcode* em peixes (Bellafronte et al., 2013; Pereira et al., 2013).

As proporções de diferenças nucleotídicas entre os espécimes do *H. marginatus* e *M. bonita* foram baixas, indicando uma proximidade maior entre estas duas espécies. Na descrição de *M. bonita* este fato já é mencionado. Recentemente, foi feita uma análise filogenética com características de espermas de espécies de *Moenkhausia* e *Hemigrammus* entre outros. Esta análise coloca a hipótese de *M. bonita* e *H. marginatus* serem grupos irmãos (Santana et al. 2012). Esta mesma hipótese é aventada em uma análise filogenética que utiliza caracteres osteológicos, coloração e morfologia externa (Serra, 2010) e outra análise que utiliza dados moleculares indicam esta mesma relação (Mariguela et al., 2013).

Os gêneros *Moenkhausia* e *Hemigrammus* provavelmente não são monofiléticos (Mirande, 2010; Oliveira et al., 2011). Recentemente, Mariguela (2013) por meio de análises moleculares indicou que o gênero *Moenkhausia* é polifilético e necessita de uma extensa revisão. Uma análise filogenética do gênero *Hemigrammus* indica que o grupo também não constitui uma unidade monofilética (Serra, 2010).

O grau de desenvolvimento da linha lateral tradicionalmente distingue *Moenkhausia* (completa), *Hemigrammus* (incompleta) (Eigenmann, 1907). Entretanto, esta distinção foi questionada por Costa (1994), Lima e Toledo-Piza (2001) e Benine (2009), que descreveram novas espécies de *Moenkhausia* de acordo com outras características que eram mais semelhantes às espécies do gênero. Provavelmente os caracteres que definem tanto *Hemigrammus* como *Moenkhausia* evoluíram muitas vezes em diferentes linhagens, como a linha lateral, fato que justifica uma profunda análise no contexto filogenético para resolver sua real importância para delimitar grupos em Characidae (Marinho, 2010).

A espécie *M. bonita*, em sua descrição possui linha lateral completa, porém alguns espécimes atribuídos a *M. bonita* que foram coletados no alto rio Paraná possuem variados níveis de desenvolvimento de linha lateral. De acordo com os resultados obtidos pelo gene *COI*, estes espécimes podem ser considerados todos como *M. bonita*. Da mesma forma, a espécie *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Steindachner 1907) também inclui espécimes que possuem linha lateral completa, incompleta e descontínua. Diferenças na linha lateral podem variar intra-especificamente nos dois gêneros, como ocorre em *Moenkhausia*

cotinho Eigenmann 1908 e *Hemigrammus barrigonae* Eigenmann & Henn 1914 (Marinho e Langeani, 2010).

A distribuição geográfica da espécie *M. bonita* no alto rio Paraná, pode ser explicada pela proximidade das bacias Paraná-Paraguai. A ictiofauna do alto rio Paraná possui uma história própria complexa e compartilhada com drenagens vizinhas (Langeani et al., 2007). A bacia do rio Paraná, juntamente com a bacia do rio Uruguai e a bacias do rio Paraguai, constituem a bacia do rio da Prata, segunda maior bacia hidrográfica do Brasil. O rio Paraguai é o principal afluente do rio Paraná (Latrubesse et al. 2005) e, embora até a formação do reservatório de Itaipu os saltos de Sete Quedas representassem uma barreira, esta poderia ser a via de conexão para a dispersão de *M. bonita*, principalmente nos anos de grandes cheias. Outra possibilidade seria a dispersão da espécie pelas cabeceiras das sub-bacias dos rios Ivinhema, no alto rio Paraná, e Miranda na bacia do rio Paraguai. Atualmente não há estudos moleculares detalhados, mas amostragens em riachos nas cabeceiras das sub-bacias dos rios Ivinhema e Miranda e em riachos no médio Paraná e no rio Paraguai poderia mostrar gradientes de diversidade e indicar a provável rota de dispersão.

Os espécimes de *M. bonita* da localidade-tipo e *M. bonita* do alto rio Paraná apresentaram as maiores proporções de diferenças nucleotídicas intra-específicas. Em populações geograficamente separadas é esperado encontrar altas taxas de divergência intra-específica (Herbet et al., 2003).

O gene *Histona H3* codifica proteínas e é bem conservado em termos evolutivos (Colgan et al., 1998), tem sido utilizado para fins comparativos entre resultados de gene mitocondriais e nucleares, assim como auxiliar em problemas taxonômicos (Klaus et al., 2009). O gene *Histona h3* não se mostrou eficiente em distinguir as espécies analisadas, provavelmente por ser mais conservado. Estudos de filogenia em caranguejos ermitões também mostrou que este gene apresentou pouca variação interespecífica (Olguin e Mantelatto, 2013).

As regiões não codificadoras do DNA denominadas íntrons, como o gene *S7 íntron 1*, podem ser marcadores eficientes por apresentarem baixa pressão evolutiva (Friesen, 2000). Este gene foi suficiente para separar os indivíduos analisados, corroborando os resultados encontrados com o gene *COI*. Em um estudo em peixes actinoptérgios, Wright et al. (2012) utilizando o gene *COI*, *S7 íntron 1* e mais seis marcadores nucleares, obteve resultado semelhante, somente as árvores genéticas inferidas a partir de *COI* e *S7 íntron 1* foram completamente resolvidas.

Desta forma, os espécimes que apresentam variados níveis de desenvolvimento da linha lateral pertencem a *M. bonita*, portanto o desenvolvimento da linha lateral pode não ser um caráter consistente para a discriminação entre *Hemigrammus* e *Moenkhausia*. Os genes *COI* e *S7 íntron 1* foram eficientes na caracterização e discriminação de espécies, enquanto que o gene *Histona H3* não apresentou muita variação interespecífica. Estes resultados demonstram que as sequências nucleotídicas dos genes *COI* e *S7 íntron 1* representam ferramentas auxiliares efetivas e de alta resolução na identificação de *M. bonita*.

REFERÊNCIAS

- Bellafronte E, Mariguela TC, Pereira LHG, Oliveira C (2013). DNA barcode of Parodontidae species from the La Plata river basin-applying new data to clarify taxonomic problems. *Neotropical Ichthyology*. 11: 497-506.
- Benine RC, Castro RM and Sabino J (2004). *Moenkhausia bonita*: A new small characin fish from the Rio Paraguay basin, southwestern Brazil (Characiformes: Characidae). *Copéia*. 1: 68-73.
- Benine RC, Mariguela TC, Oliveira C (2009). New species of *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) with comments on the *Moenkhausia oligolepis* species complex. *Neotropical Ichthyology*. 7: 161-168.
- Bertaco VA and Carvalho TP (2005). New characid fish, *Hemigrammus skolioplatus* (Characiformes: Characidae) from upper rio Tapajós drainage, Central Brazil. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Série Zoologia*. 18: 141-150.
- Chow S and Hazama K (1998) Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. *Molecular Ecology*. 7: 1247–1263.
- Colgan DJ, McLauchlan A, Wilson GDF, Livingston SP, et al. (1998). Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Aus. J. Zool.* 46: 419–437.
- Costa WJEM (1994). Description of two new species of the genus *Moenkhausia* (Characiformes: Characidae) from the central Brazil. *Zoologischer Anzeiger*. 232: 21-29.
- Eigenmann CH (1907). On further collections of fishes from Paraguay. *Annals of the Carnegie Museum*. 4, 108-157.
- Eschmeyer WN, Fong JD (2013). Species by Family/Subfamily. Disponível em: [<http://research.calacademy.org/redirect?url=http://researcharchive.calacademy.org/research/Ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>] Acesso em: 15 de janeiro de 2014.

Friesen VL (2000). Introns. In: Molecular methods in ecology (Baker AJ, ed.). Blackwell Science, Oxford, 274-294.

Géry J (1977). Characoids of the world. T. F. H. Publications, New Jersey.

Gotelli NJ (2004). A taxonomic wish-list for community ecology. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 359: 585-597.

Graça WJ and Pavanelli CS (2007). Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. Eduem, Maringá.

Hajibabaei M, Singer GA, Clare EL, Hebert PDN (2007). Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC Biology*. 5: 1-15.

Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*. 41: 95-98.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Waard JR (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*. 270: 313-321.

Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS biology*. 2: 1657-1663.

Klaus S, Brandis D, Ng PKL, Yeo DCJ (2009). Phylogeny and biogeography of Asian freshwater crabs of the family *Gecarcinucidae* (Brachyura: Potamoidea). *Crustacean Issues: Decapod Crustacean Phylogenetics*. 509-531.

Langeani F, Castro RMC, Oyakawa OT, Shibatta OA, et al. (2007). Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica*, 7: 1-17.

Latrubesse EM, Stevaux JC, Santos ML, Assine ML (2005). Grandes sistemas fluviais: geologia, geomorfologia e paleohidrologia. In: Quaternário no Brasil (Souza CRG, Suguio K, Oliveira AMS, Oliveira PE, eds.). Editora Holos, Ribeirão Preto, p. 276-297

Legendre P and Anderson MJ (1999). Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs*. 69: 1-24.

Lima ACSA (2007). Estudo do impacto do ecoturismo na ictiofauna do rio Sucuri (Bonito, MS, Brasil), utilizando as espécies de peixes *Crenicichla lepidota* (Heckel, 1840) e *Moenkhausia bonita* (Benine et al., 2004) como indicadores. Master's thesis. Universidade de Algarve, Faro.

Lima FC and Toledo-Piza M (2001). New species of *Moenkhausia* (Characiformes: Characidae) from the rio Negro of Brazil. *Copeia*, 4: 1058-1063.

- Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, Silva JFP, et al. (2003). Genera *Incertae Sedis* in Characidae. In: Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ Jr, eds). Edipucrs, Porto Alegre, 106-169.
- Maniglia TC, Prioli AJ, Bignotto TS, Boni TA, et al. (2012). Nucleotide diversity of *Hemigrammus cf. marginatus* (Characiformes, Characidae) in the upper Paraná river floodplain. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 34: 303-309.
- Mariguela TC, Benine RC, Abe KT, Avelino GS (2013). Molecular phylogeny of *Moenkhausia* (Characidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA evidence. *J Zoolog Syst Evol Res*. 51: 327-332.
- Marinho MMF (2010). A new species of *Moenkhausia* Eigenmann (Characiformes: Characidae) from the rio Xingu basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*. 8: 655-659.
- Marinho MMF and Langeani F (2010). *Moenkhausia celibela*: uma nova espécie da bacia do Amazonas, Brasil (Characiformes: Characidae). *Jornal da biologia dos peixes*. 77: 879.
- Mirande, JM (2010) Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology* , 8: 385-568.
- Nelson, J. S. (2006). Fishes of the world. John Wiley, New York.
- Olguín N and Mantelatto FL (2013). Molecular analysis validates of some informal morphological groups of *Pagurus* (Fabricius, 1775) (Anomura: Paguridae) from South America. *Zootaxa*. 3666: 436-448.
- Oliveira C, Avelino G, Abe K, Mariguela T, et al. (2011). Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC evolutionary biology*. 11: 275.
- Pereira LH, Hanner R, Foresti F, Oliveira C (2013). Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna?. *BMC genetics*. 14: 20.
- Posada D and Crandall KA (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14: 817-818.
- Prioli SMAP, Prioli AJ, Júlio Jr. HF, Pavanelli CS, et al. (2002). Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçú River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*. 25: 421-430.
- Rosenthal A, Coutelle O, Craxton M (1993). Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Research*. 21: 173-174.
- Rubinoff D (2006). Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conservation Biology*. 20:1026-1033.

- Santana JC, Baicere-Silva CM, Gusmão-Pompiani P, Benine RC (2012). An assessment approach for application of spermatid data in phylogenetic analyses: within the genus *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae). *Acta Zoologica*. 94: 335-354.
- Serra JP (2010) Análise filogenética das espécies de *Hemigrammus* Gill, 1858. Doctoral thesis, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*. 28: 2731-2739.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*. 22: 4673-4680.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, et al. (2005). DNA Barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 360: 1847-1857.
- Wright JJ, David SR, Near TJ (2012). Gene trees, species trees, and morphology converge on a similar phylogeny of living gars (Actinopterygii: Holostei: Lepisosteidae), an ancient clade of ray-finned fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 63: 848-856.

ANEXO 2

Normas do periódico Genetics and Molecular Research.

General information of GMR style

The Journal has a general format. You should always follow the general rules for the Journal concerning punctuation, use of capitals, italics, spaces, etc.

1. Title: only the first letter of the title is capitalized. If a proper noun is used in the title the first letter is also capitalized.
2. Authors: comma between each author except for the last two where “and” is used. Initials, no space.
3. Institutions: if more than one, superscript numbers correspond with authors. Observe order: Laboratory, Department, Faculty, University, city, state, country (no final periods)
4. Key words: each key word uses the first letter capitalized and is separated by semicolons.
5. INTRODUCTION, MATERIAL and METHODS, RESULTS, DISCUSSION, and ACKNOWLEDGMENTS are considered to be Title 1 (all letters are capitalized).
6. Title 2, which is a subtitle under Title 1, uses only the first letter capitalized. Title 3, which is a subtitle under Title 2, is in the same format but italicized. All on a separate line.
7. References are cited by name, followed by year of publication (by chronological order) in the text. Ex.: (Kim et al., 2006; Chen et al., 2009). See a recent publication for details.
8. Tables and Figures are cited in capital letters, write out in full, not abbreviated, and following the order of citation in text (For ex.: Figure 1, Figure 2, Figure 3, and so on).
9. Abbreviations: check the abbreviations used. They should be consistent throughout the manuscript (Since Introduction) and must be explained (if it is the case for those not known in general) only at first use (independent of the section). If the Abbreviation is not needed further in the article, it can be omitted. Definitions do not have capital letters. Ex: expressed sequence tags (ESTs); polymerase chain reaction (PCR) not PCR reaction.
10. Italics are used for scientific names (bacteria, Latin names, etc.). They should be cited in full, not abbreviated, at first use (from Introduction on); other citations are abbreviated. Ex.: *Bos taurus* (1st citation), *B. taurus* in others. Anatomic terms use normal type: area postrema, pars medialis, lamina propria, locus coeruleus, etc.
11. English from England is only used if the article is from British authors.
12. Two measures = use bar: mL/kg; three measures = use ⁻¹ (superscript) and a period (alt + 0183) mg·kg⁻¹·h⁻¹.
13. Italics are used for certain abbreviations: *im*, *ip*, *sc*, *g* (centrifugation), *in vivo*, *in vitro*, *in situ*, *per se*, *vs* (but versus, in normal type).
14. Note the following examples of spacing and use of capitals: $P \geq 0.05$, $P \leq 0.05$, $P = 0.05$, $N = 10$, 6.0 g, 1.2 μm , 12.2%, 37°C, means \pm SEM, means \pm SD, >76, etc.
15. Abbreviations used: s, second; min, minute; h, hour; am; pm; m, meter; cm, centimeter; km, kilometer; L, liter, kDa, kilodaltons; cM, centimorgans; mya (million years ago, not M.Y.A); pH; kHz; kg; kcal; IU; W; ms; sp and spp (both in normal type, no period); v/w; v/v; mAb; BALB/c; etc. But, day(s), week(s), years(s) always in full, not abbreviated.
16. HDL-C, HDL-C, VLDL-C (for high-density lipoprotein cholesterol, etc.), Tris-HCl, not tris-HCl.
17. M (not mol/L); pM (not pmol/L); mM (not mmol/L), etc.
18. K_m or K_M (Michaelis constant), H_o and H_E (observed and expected heterozygosity), N_A (allelic number), F_{ST} ; F_{IS} ; F_{IT} ; N_m ; OR; 95%CI; OD; ID; etc.
19. Other examples: Data were analyzed by **the** Student *t*-test (the *t* is always italicized and joined with a hyphen to the word test), by the Mann-Whitney U-test or by the chi-square test and are reported as means \pm SD for $N = 10$ animals per group (for at least three independent experiments). ANOVA, MANOVA, d.f. (degrees of freedom).
20. 1st, 2nd, 3rd (normal type, without superscript).
21. 1X PCR buffer; 200X magnification; 10 mL 1% polygalacturonic acid (not 10 mL **of**....); 0.2 M sodium acetate buffer, pH 4.5, 10 mL crude enzyme, [100 mM Tris-HCl (not Tris-HCl 100 mM)], [2% PVP (w/v) (not PVP 2% (w/v))]; 20 mL 0.4% Trypan blue solution; 2 to 3 mL 1% lidocaine, etc.
22. 6 x 10₃; 2.5 x 10⁻²; 1 x 5 cm; Al₃₊ (not Al⁺³); 6.58 vs 6.18 mm (not 6.58 mm vs 6.18 mm); 50 to 80% (not 50% to 80%), etc.
23. cmH₂O; mmHg; cf.; ca.; i.e.; e.g.; No.; Ref.
24. Manufacturers: the country of origin should be cited only the first time the manufacturer is mentioned. Obs.: Following the manufacturer protocol/following manufacturer protocols (both without apostrophe plus “s”).
25. Numerals: 1000 (no comma; not necessary), 10,000, 10,000,000 (with comma).
26. On (not in) agarose gel, in (not on) liquid medium, on solid medium, on agar plates, etc.