

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
CAMPUS IV – CHAPADINHA - MA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANTONIO MARCOS SILVA PEREIRA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR DNA *Barcoding* DE PEIXES DAS ORDENS
CICHLIFORMES E ACANTHURIFORMES EM RIOS DO MARANHÃO**

Chapadinha-MA

2017

ANTONIO MARCOS SILVA PEREIRA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR DNA *Barcoding* DE PEIXES DAS ORDENS
CICHLIFORMES E ACANTHURIFORMES EM RIOS DO MARANHÃO**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, para a obtenção do título de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Polivanov Ottoni

Chapadinha-MA

2017

PEREIRA, ANTONIO MARCOS SILVA.

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR DNA Barcoding DE PEIXES DAS
ORDENS CICHLIFORMES E ACANTHURIFORMES EM RIOS DO MARANHÃO /
ANTONIO MARCOS SILVA PEREIRA. - 2016. 36 f.

Orientador(a): Prof. Dr. Felipe Polivanov Ottoni.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Maranhão, UFMA/CCAA, 2016.

1. Bacia do Rio Munim. 2. Bacia do Rio Parnaíba. 3. Cichlidae. 4. DNA mitocondrial. 5.
Scianidae. I. Ottoni, Prof. Dr. Felipe Polivanov. II. Título.

Dedico a minha família que construíram as bases deste processo de educação, em especial a Dona Leonor Silva e a saudosa vó Ermita Silva (*in memoriam*) serei eternamente grato.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Leonor Dos Santos Silva, Mãe e Pai, mulher de coragem e determinada que nunca mediu esforços para proporcionar aos filhos um sopro de educação da qual esta foi limitada. A tia Emilia e Eliane e aos irmãos Alex e Cristiano pelo incentivo ao estudo.

Ao professor Dr. Felipe Polivanov Ottoni, por aceitar o desafio desta orientação repentina, pela compreensão e empenho de ajudar com muita maestria a construção deste trabalho no momento de finalização de um processo de aquisição de conhecimento.

A minha querida amiga e tantas vezes orientadora Raimunda Silva, por contribuir imensamente com este trabalho, pela compreensão e paciência de somar conhecimento para este estudo.

Ao Professor Dr. Luís Fernando Carvalho Costa por também fazer parte deste trabalho contribuindo nesta orientação e disponibilização do Laboratório de Genética Animal e o projeto de iniciação científica, pela contribuição a construção do conhecimento científico.

Aos vários professores que durante a graduação ministraram as disciplinas específicas do curso, em especial aos professores Regis Catarino da Hora, Ricardo Rodrigues, Cláudio Gonçalves da Silva, Jomar Furtado e outros que estiveram presente na formação durante o período de graduação.

Aos amigos do Laboratório de Genética Animal, Fabiana Rodrigues, Solange Frazão, Luana Nascimento, Jardeani Mendes que por varias vezes me auxiliaram nos procedimentos, pela paciência e momentos de alegria. Aos amigos que nessa caminhada estiveram comigo, José Mendes, Leandro Shalcher, Marcos Renan, Sebastião Pimenta Adenias Teixeira, Paulo Siqueira, Karen Lynny, Pryscila Coelho, Lidiane Lacerda, Karen Rubim, Kleison Lima, Wdson Ellan, Rafael Bezerra, Maria das Dores e toda a Turma da qual tive a honra de fazer parte. Aos companheiros e amigos que durante a caminhada da graduação construímos laços de amizade tanto no trabalho, como nós momentos de descontração ao compartilhar aquela Bia ou na Paula, e tantas outras boas Cachaças que fizeram parte direta e indiretamente nos momentos desta conquista.

A família Marinho na pessoa do irmão Lourivaldo dos Santos Marinho Filho

A minha nova família Mayara Lira que sempre esteve ao meu lado dando apoio incondicional na busca do conhecimento e minha filha Maya Helena que há dez meses tem enriquecido as energias para seguir em frente na busca dos sonhos.

Serei eternamente grato!

“Ousar Lutar, Ousar Vencer”.

Carlos Lamarca

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	Genoma mitocondrial destacando a região do Citocromo Oxidase subunidade I (COI). Fonte: (nature), 201615
Figura 2	Mapa Ilustrando a bacia hidrográfica do Rio Parnaíba do Estado do Maranhão, Brasil. Fonte: (Antônio Marcos Pereira)18
Figura 3	Mapas ilustrando a bacia hidrográfica do Rio Munim no Estado do Maranhão, Brasil. Fonte: (Antônio Marcos Pereira)19
Figura 4	Árvores do tipo Neighbor-joining baseado no método de Kimura 2 parâmetros (K2P) do gene COI de peixes da ordem Cichliformes do Rio Munim27
Figura 5	Árvores do tipo Neighbor-joining baseado no método de Kimura 2 parâmetros (K2P) do gene COI de peixes da ordem Cichliformes do Rio Munim28
Figura 6	Árvores do tipo Neighbor-joining baseado no método de Kimura 2 parâmetros (K2P) do gene COI de peixes da ordem Acanthuriformes do Rio Munim28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Local de Coleta, família, e espécie de peixes das ordens, Cichliformes e Acanthuriformes de rios do Maranhão24
Tabela 2	Divergência intra e interespecífica para espécies de peixes das ordens, Cichliformes e Acanthuriformes de rios do Maranhão25
Tabela 3	Espécie, porcentagem de identificação molecular nas Plataformas BOLD SYSTEM e NCBI dos espécimes, Cichliformes e Acanthuriformes coletados nos rios Parnaíba e Munim26
Tabela 4	Linhagens (espécies) delimitadas a partir das topologias geradas27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	12
1.1 Referencial Teórico	14
2 OBJETIVO	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivo específico	17
3 MATERIAIS & MÉTODOS.....	18
3.1 Classificação.....	18
3.2 Áreas de estudo.....	18
3.3 Rio Parnaíba.....	18
3.4 Rio Munin.....	19
3.5 Amostragem.....	19
3.6 Extração, Eletroforese em gel e Diluição do DNA.....	20
3.7 Amplificação do gene COI e Eletroforese para análise dos produtos de PCR..	21
3.8 Purificação, sequenciamento e precipitação.....	22
3.9 Análise de dados.....	23
4 RESULTADOS.....	24
4.1 Identificação Molecular a partir de comparações com BOLD e NCBI, e divergências inter e intraespecíficas.....	24
4.2 Linhagens delimitadas pela topologia da arvores filogenéticas.....	26
5 DISCUSSÃO.....	29
6 CONCLUSÃO.....	30
7 REFERÊNCIAS.....	31

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR POR DNA *Barcoding* DE PEIXES DAS ORDENS CICHLIFORMES E ACANTHURIFORMES EM RIOS DO MARANHÃO

Antônio Marcos Silva Pereira¹ & Felipe Polivanov Ottoni²

¹Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais – Chapadinha, Maranhão, Brasil.

²Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais– Laboratório de Sistemática e Ecologia de Organismos Aquáticos (LASEOA)-Chapadinha, Maranhão, Brasil

RESUMO

A Região Neotropical apresenta a maior porcentagem da diversidade de peixes de água doce do mundo, sendo a ictiofauna de água doce a mais diversificada, com cerca de 50% da fauna conhecida. Com toda essa biodiversidade, faz-se necessário que métodos que identifiquem espécies, de maneira correta e rápida, estejam cada vez mais disponíveis. O DNA-Barcoding, que corresponde a um pequeno fragmento do gene mitocondrial da Citocromo C subunidade I (COI), é um método que vem se tornando um identificador único e padrão algumas das espécies animais, já tendo sido demonstrado como uma promissora ferramenta na identificação de espécies de aves, mamíferos, peixes, entre outros. No Maranhão, a fauna ictiológica é enorme, tendo como referência os poucos trabalhos científicos sobre esta diversidade biológica. Nesse contexto, este trabalho teve por finalidade avaliar o potencial do DNA Barcoding na identificação de peixes das ordens Cichliformes e Acanthuriformes de alguns rios do Maranhão. Foram obtidas extrações de DNA genômico de 27 amostras de peixes destas ordens, de duas bacias do estado do Maranhão (Munim, Parnaíba). Os fragmentos de COI foram obtidos pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), e posteriormente sequenciados pelo método de terminação em cadeia. A identificação molecular das espécies foi realizada usando as bases de dados BOLD SYSTEMS e GENBANK.

Palavras-chave: Bacia do Rio Munim; Bacia do Rio Parnaíba; Cichlidae; Scianidae; DNA mitocondrial.

1INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O ambiente aquático apresenta diversidades de formas de vida, destacando dentre os demais organismos principalmente entre os vertebrados, os peixes. Esses animais dentro de um processo evolutivo, vem apresentando uma diversidade de formas muito bem sucedidos, ocupando os mais variados habitats, desde ambientes dulcícolas e marinhos, submetidos às mais variadas condições ambientais. Atualmente, estes organismos estão distribuídos em 62 ordens, 515 famílias, mais de 4.400 gêneros além de mais de 27.900 espécies, a grande maioria peixes ósseos (NELSON, 2006; HELFMAN et al, 2013). Na água doce, a fauna de peixes é estimada em 13.000 espécies em todo o globo (NELSON, 2006).

A região Neotropical representa a maior porcentagem da diversidade de peixes de água doce do mundo, com cerca de 50% da fauna conhecida (VARI & MALABARBA 1998; REIS et al., 2003). As espécies presentes nesta região (cerca de 6.000 espécies) representam cerca de 10% de todas as espécies de vertebrados conhecidas (REIS et al., 2003; SANTOS et al., 2004; CALCAGNOTTO et al., 2005). Só no Brasil, estão presentes 43% dessa ictiofauna, dando ao país um enorme destaque (BUCKUP et al., 2007) em função de sua área continental e sua diversidade de sistemas ecológicos.

Ao longo de anos, a identificação de espécies tem sido realizada por taxonomistas baseada apenas em caracteres morfológicos, contudo com o advento e evolução da biologia molecular, surgiu um novo conjunto de ferramentas úteis para a identificação de espécies (GUSMÃO et al., 2000). Diante de toda a riqueza presente no grupo dos peixes é relevante atentar para a identificação das espécies por métodos que demandem menos tempo e treinamento, porém mantendo níveis de credibilidade e segurança para tais procedimentos. Devido ao grande avanço da exploração desordenada dos recursos naturais, que vem levando várias espécies animais e vegetais à extinção, sem ao menos serem conhecidas, faz-se necessário um método de identificação eficaz, objetivo e preciso no intuito de aprimoramento dos esforços na descoberta e identificação das espécies e conseqüentemente conhecimento de toda essa gama da biodiversidade. Muitos estudos têm sido publicados utilizando um conjunto diversificado de ferramentas moleculares e marcadores para identificar espécies (ARON E SOLÉ-CAVA ,1991; GUSMÃO et al., 2000).

Neste sentido, HERBERT et al. (2003) propuseram que uma pequena fração de DNA, com cerca de 648 pb a partir da extremidade 5' do gene mitocondrial do citocromo c oxidase subunidade I (COI), poderia ser usado como um sistema de identificação. Isso ocorre porque as mudanças nucleotídicas intra e interespecíficas ocorrem a taxas diferentes, funcionando

como um código universal para identificar a maioria das espécies do reino animal, que ficou conhecido como Código de Barras do DNA ou DNA Barcoding (HEBERT et al., 2003).

Desde 2003, ano em que foi proposto, diversos táxons foram estudados, e sequências geradas para formar um banco de dados acessível, onde é possível comparar espécies conhecidas ou desconhecidas (WARD et al., 2005).

É necessário salientar que também há críticos da técnica de DNA barcoding. Estudos recentes em gastrópodes refutam a ideia do barcode gap, assegurando que a amostragem escassa a nível interespecífico e intra-específico poderia indicar artificialmente essa lacuna (MEYER & PAULAY, 2005). Outra crítica diz respeito ao uso de métodos fenéticos para a construção de árvores filogenéticas, onde há a classificação por similaridade fenotípica, como é caso do método de Neighbour-Joining (DESALLE et al., 2005). Contudo, o uso de caracteres de DNA para descrever uma espécie seria capaz de funcionar como ocorre para a taxonomia tradicional, ultrapassando o enfoque por árvores, e construindo pontes entre os estudos moleculares e morfológicos para aperfeiçoar o processo de identificação de espécies (DESALLE et al., 2005).

No Brasil, há vários grupos de pesquisa que também contribuem para o enriquecimento da base de dados mundial. No Maranhão, o laboratório de Genética Animal da Universidade Federal do Maranhão (UFMA/CCAA) é um destes grupos de pesquisa, que está se somando a pesquisa sobre a diversidade da ictiofauna dos rios do Estado, contribuindo com outros laboratórios para a identificação da diversidade de peixes brasileira.

O estado do Maranhão possui um rico e particular sistema hidrográfico. No contexto da Resolução Nº 32, de 15 de outubro de 2003, do Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH), que institui 12 regiões hidrográficas para o território brasileiro, o estado compreende a Região Hidrográfica do Atlântico Nordeste Ocidental (91 %), Região Hidrográfica do Parnaíba (5%) e Região Hidrográfica do Tocantins - Araguaia (4%), onde estão inseridas as três sub-bacias hidrográficas (Munin, Parnaíba e Tocantins) que fizeram parte deste estudo (MMA, 2006a, 2006b, 2006c). Com todo este potencial, o Estado ainda apresenta poucos estudos de diversidade ictiológica.

Portanto há a necessidade da realização de estudos de levantamento da diversidade biológica, identificação da fauna de peixes de rios do Maranhão e avaliar a importância biológica e de conservação desses ecossistemas aquáticos. A técnica de DNA Barcoding permitiu avaliar e validar tal ferramenta para o conhecimento das espécies presentes em bacias hidrográficas do Maranhão, gerando dados para o planejamento ambiental, a conservação genética de importantes espécies para economia local e a preservação de recursos pesqueiros. O referido estudo ictiofaunístico contribui para o conhecimento científico das

espécies de peixes de rios do Maranhão de forma precisa, rápida e com custo razoável.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

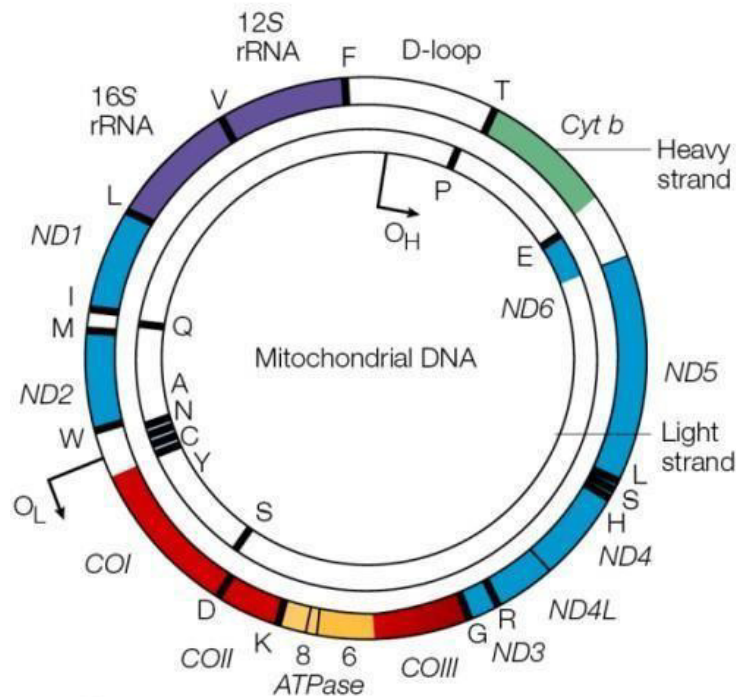
Existe um número gigantesco de espécies ainda não descritas e o método de identificação morfológica tradicional nem sempre é apropriado em muitas áreas, além do número de taxonomistas tradicionais ser baixo para lidar com esta diversidade, de modo que espécies crípticas podem ser negligenciadas por tais métodos (HEBERT et al., 2003, YANJUN et al., 2015).

O estudo da biodiversidade molecular utiliza da premissa envolvida na evolução das espécies, a variabilidade genética, que permite comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes (SOLÉ-CAVA, 2001; HEBERT et al., 2004). Em estudos filogenéticos e populacionais, é possível identificar gêneros e espécies por meio da observação de características morfológicas e anatômicas. Contudo, há espécies diferentes que apresentam problemas de taxonomia, onde genes mitocondriais vêm sendo bastante aplicados em estudos de identificação (SANTOS et al., 2003; VINSON et al., 2004; FRAGA et al., 2007).

Em animais, o DNA mitocondrial (DNAm_t) (Figura 1) é uma molécula de DNA circular, que pode variar de 15.000 a 17.000 pares de bases, contendo 13 genes codificadores de proteínas, 22 RNAs de transferência (RNAt) e dois genes de RNAs ribossômicos (RNAr), que tem taxa de variação mais rápida que a observada do DNA nuclear, fornecendo uma importante fonte de informação genética extra-nuclear (BROWN et al., 1979; AVISE, 1986). Sua alta taxa de mutação, quando comparado ao genoma nuclear, e seu pequeno tamanho fazem do DNAm_t um marcador apropriado em estudos comparativos entre espécies (CLAYTON et al., 1974; YAMAZAKI et al., 1997; RAWLINGS et al., 2001).

Em peixes, há diversas aplicações como a detecção de fraude ou substituição de espécies em acordos comerciais, estabelecimento de relações filogenéticas, estimativa do tamanho efetivo de populações, conservação de recursos pesqueiros (FERGUSON et al., 1995; SOLÉ-CAVA, 2001; SMITH et al., 2008; ARDURA et al., 2010). Além disso, as informações moleculares podem ser utilizadas para conservação de recursos genéticos, na definição de estratégias de melhoramento genético, conservação da fauna de peixes, e na identificação de ovos, alevinos, adultos e seus produtos (FERGUSON et al., 1995; METCALF et al., 2007; SMITH et al., 2008).

Figura 1: Genoma mitocondrial ilustrando a região do Citocromo Oxidase subunidade I (COI).



Fonte: Nature.

Em 2005, como forma de armazenar tais dados moleculares, iniciou-se uma colaboração internacional para o desenvolvimento do Fish Barcode of Life (FISHBOL), uma base de dados eletrônica e ferramenta de bioinformática (Ward et al., 2009), nas quais estão reunidos dados sobre o DNA barcoding de peixes de todo o mundo, desde informações sobre a coleta do espécime à validação da sequência do organismo como um código de barras genético, imagens e coordenadas geoespaciais disponível a quem interessar (WARD et al., 2009).

Esta biblioteca de dados comporta as sequências e analisa os dados obtidos derivados das contribuições de diversos pesquisadores de todo o mundo, dedicados à expansão da cobertura de código de barras, servindo como um veículo de colaboração entre diversos grupos de pesquisa do mundo, e permitindo um fácil acesso a diversas informações obtidas dos mais diversos laboratórios de pesquisa distribuídos pelo mundo (WARD et al., 2009).

Faz-se necessário gerar informações sobre a mega diversidade que representa a ictiofauna. Atualmente, de acordo com um novo esquema de classificação proposto por Betancur et al. (2013), algumas ordens foram divididas para melhor delimitação. Entre as mais especiosas ordens de peixes, a ordem Perciformes está mais restrita com a nova delimitação, agora com cerca de 50 famílias. Os peixes da família Cichlidae antes incluídos em Perciformes agora estão restritos como família única na nova ordem Cichliformes, assim

como os Gobiídeos, atualmente classificados na ordem Gobiiformes, com 8 famílias (BETANCUR, et al., 2013; NELSON et al., 2016).

Diante disso as oito maiores famílias, Gobiidae (ordem Gobiiformes), Cichlidae, (ordem Cichliformes), Serranidae (ordem Perciformes), Labridae (ordem Labriformes), Blenniidae (ordem Blenniiformes), Pomacentridae (Subsérie Ovalentaria, *incertae sedis*), Apogonidae (ordem Kurtiformes) e Sciaenidae (ordem Acanthuriformes), possuem 5479 espécies, que constituem 55% de todas as espécies da classe Actinopterygii (NELSON, 2006; BETANCUR et al., 2013; NELSON et al., 2016).

A maioria dos táxons citados acima são peixes de ambientes costeiros marinhos, enquanto 2.040 espécies ocorrem apenas em água doce, e há ainda os que passam parte de sua história de vida em ambiente de água doce (2.335 espécies) (NELSON, 2006).

Informações sobre a biologia e genética de peixes de água doce ainda são insuficientes mesmo com a sua enorme importância para a diversidade biológica e como recursos naturais, exceto para determinadas espécies submetidas à aquicultura como tilápias e salmonídeos (ARDURA et al., 2010).

A ecologia das ordens Perciformes, Gobiiformes, Cichliformes, Blenniiformes apresentam a qualidade de habitar diferentes ambientes, desde ecossistemas lóticos (rios e riachos) até ecossistemas lênticos (lagos, etc) (BUCKUP et al., 2000; BETANCUR, et al 2013).

Estudos sobre estas e outras ordens têm sido cada vez mais frequentes durante os últimos anos na América do Sul e no Brasil. Este estudo se soma a outros que visam gerar informações sobre a diversidade de peixes presente, sobretudo no Maranhão onde trabalhos referentes à Ictiofauna são poucos, necessitando de mais pesquisas que permitam a gestão, conservação e conhecimento da fauna bem como dos recursos hídricos.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Identificar, por meio de sequências do gene Citocromo C Oxidase I se utilizando de amostras de peixes das ordens Cichliformes e Acanthuriformes coletadas em duas bacias Hidrográficas do Estado do Maranhão: Bacias dos Rios Munim e Parnaíba.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar as condições de amplificação do marcador mitocondrial nas espécies dessas ordens;
- Determinar a utilidade desta ferramenta para identificação de espécies e seu uso para a classificação rápida da biodiversidade;
- Auxiliar a identificação de novas espécies de Cichliformes e Acanthuriformes de rios do Maranhão através dessa metodologia;
- Contribuir com informações para a Rede de DNA *barcoding* da ictiofauna do Brasil e a conservação genética de recursos pesqueiros.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Classificação

Para o presente trabalho seguimos a classificação proposta por Betancur et al. (2013) e Nelson et al. (2016).

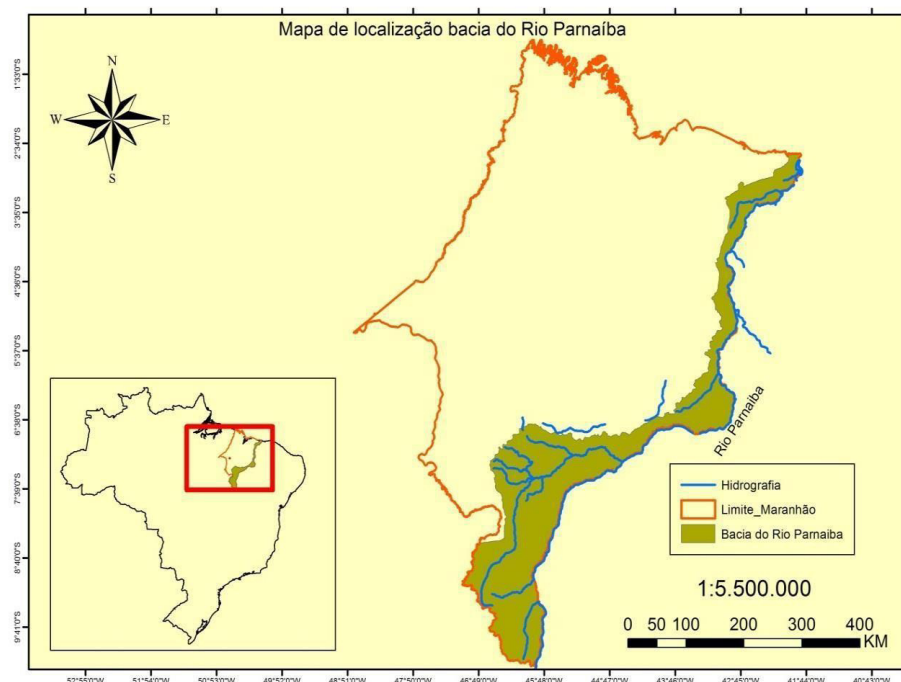
3.2 Áreas de estudo

O Estado do Maranhão apresenta uma singularidade e ampla área de recursos hídricos, segundo a Resolução N° 32, de 15 de outubro de 2003, do Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH). Sua drenagem é constituída, principalmente, pelos rios Gurupi, Tocantins, Parnaíba, Mearim, Itapecuru, Pindaré e Munim, sendo estes quatro últimos, bacias puramente maranhenses (ALCÂNTARA, 2004; MMA, 2006a; PIORSKI, 2010).

3.3 Rio Parnaíba

Depois da bacia do rio São Francisco, a Região Hidrográfica do Parnaíba (Figura 3) é hidrologicamente a segunda mais importante da Região Nordeste (ALCÂNTARA, 2004). Ele nasce na Chapada das Mangabeiras, no extremo sul do Maranhão, e é caracterizado como rio de planície caudal, em função do período de maior precipitação pluviométrica, que ocorre de dezembro a maio (MMA, 2006b).

Figura 2: Bacia Hidrográfica do Rio Parnaíba. Pereira, 2016.

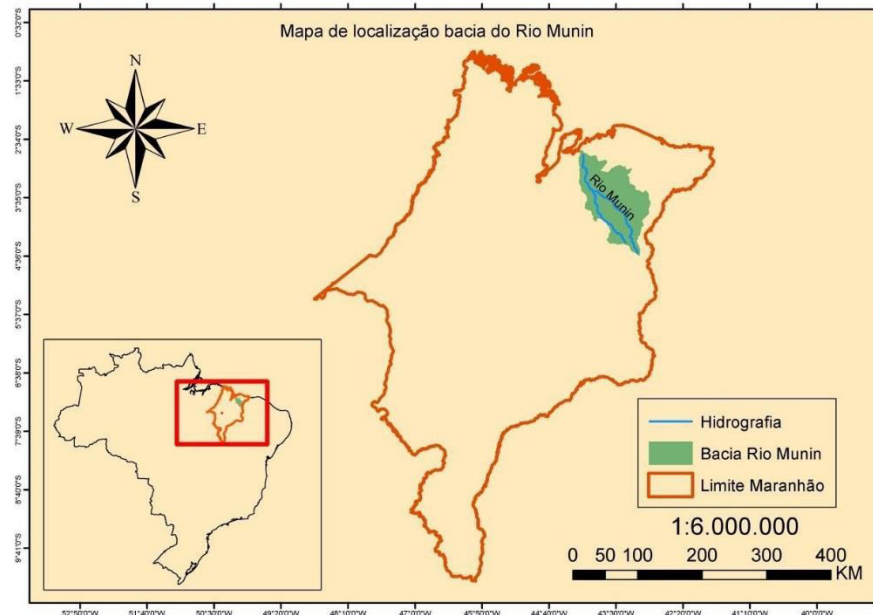


A região ocupa uma área de 333.056 km², o equivalente a 3,9% do território nacional, e drena a quase totalidade do estado do Piauí (99%) e parte do Maranhão (19%) e Ceará (10%) (RODRIGUES, 2001). O rio Parnaíba possui 1.400 quilômetros de extensão e a maioria dos afluentes localizados à jusante de Teresina são perenes e supridos por águas pluviais (MMA, 2006b). Os principais afluentes do Parnaíba são os rios Balsas, situado no Maranhão; Poti e Portinho, cujas nascentes localizam-se no Ceará; e Canindé, Piauí, Uruçui-Preto, Gurguéia e Longá, todos no Piauí (MMA, 2006b).

3.4 Rio Munim

A bacia do rio Munim, que nasce nos tabuleiros da Formação Barreiras, a nordeste de Caxias, tem uma área de 15.800 km², banhando a porção extremo-leste do Estado do Maranhão. Tem como principais afluentes os rios Muquém, Iguará, Preto, Mocambo, Prata, Pirangi, Costa e Santana, e desagua na baía de São José, entre Axixá e Icatu, após um percurso de mais de 320 km (SANTOS, 1983; MMA, 2006b; RIBEIRO et al., 2006) (Figura 4).

Figura 3: Bacia hidrográfica do Rio Munim. Pereira, 2016.



3.5 Amostragem

A amostragem dos peixes das ordens Cichliformes e Acanthuriformes ocorreu a partir de espécimes coletados nas bacias hidrográficas dos rios Munim e Parnaíba respectivamente que estão armazenadas em freezer a -20°C no Laboratório de Genética Animal (GENEAL), da

Universidade Federal do Maranhão, que compõe a coleção científica da ictiofauna da região. Foram utilizadas, no mínimo, cinco amostras por espécie de cada bacia nas localidades de Chapadinha e Santa Quitéria respectivamente.

3.6 Extração, Eletroforese em gel e Diluição do DNA

A extração do DNA genômico seguiu o protocolo de extração de (ALJANABI & MARTINEZ, 1997), onde o tecido foi reduzido a pequenos pedaços (picotado) usando pinça e tesoura. Posteriormente, foi adicionado 600µl de tampão salino (NaCl 5M 0,4; Tris HCl 10mM pH 8,0; SDS 10%; Proteinase K 20 ηg/ml). As amostras junto ao tampão foram incubadas em banho-maria a uma temperatura de 55°C por cerca de 14 horas. Após esse procedimento, as amostras foram misturadas a 300µl de NaCl 6M e vortexadas a uma velocidade máxima por 30s.

Seguindo o protocolo, as amostras foram levadas a microcentrífuga por 30 minutos a uma velocidade de 13.000 RPM (Rotações por minutos). Após a centrifugação, foi transferido o sobrenadante para outros tubos de 2 ml devidamente identificados e adicionados 900µl de

Isopropanol gelado. As amostras foram levadas ao freezer por 20 minutos. Após esse período, as amostras foram novamente centrifugadas por 20 minutos a 13.000 RPM onde foi descartado o sobrenadante e adicionados 300µl de etanol 70%. Novamente, as amostras passaram pela centrífuga por 5 minutos a 13.000 RPM.

Após esses procedimentos, foi descartado o último sobrenadante e os tubos colocados para secar por um período de 8 horas na bancada. Posteriormente, foi adicionado 100µl de TE, armazenando-se as amostras em freezer a uma temperatura -20°C.

Para quantificação do DNA, usou-se a eletroforese em gel de agarose. O gel de Agarose esteve concentrado em 0,8%, em cuba eletroforética horizontal. Primeiramente, o gel foi levado ao microondas por 5 minutos para derretimento. Após seu resfriamento, o mesmo foi colocado em cuba eletroforética juntamente com o pente, para que houvesse a formação dos poços. Após a sua total solidificação, o gel foi conduzido ao aparelho de eletroforese e adicionado TBE (Tris-base, ácido bórico, ácido etileno diamino tetra acético) a 1X, até que este toque os eletródos. Após isso, as amostras foram preparadas para a quantificação usando 1µl de azul de bromofenol, 2µl de Gelred e 1µl de DNA, que foram colocados a partir do segundo poço de gel, porque o primeiro poço é destinado ao marcador de quantificação (Low mass DNA Ladder).

Aplicadas todas as amostras, a cuba foi ligada através dos cabos de energia (carga positiva e negativa) na fonte elétrica a 90 V, permitindo que haja a corrida do DNA por 60 minutos. Após a corrida, o gel foi levado ao Transiluminador de luz UV para observação da intensidade das bandas e posterior quantificação do DNA (ηg/ µl).

As amostras diluídas em água MilliQ. De acordo com os cálculos de concentrações abaixo:

- **Para amostras com 200 ng/ µl e com volume final da diluição de 50 µl:**

$$C1V1=C2V2$$

$$200V1=50.50$$

$$V1=12,5 \mu\text{l da amostra de DNA}$$

$$12,5 \mu\text{l da amostra de DNA} - 50 \mu\text{l do volume final} = 37,5 \mu\text{l H}_2\text{O milli-Q}$$

- **Para amostras com 120 ng/ µl e com volume final da diluição de 50 µl**

$$C1V1=C2V2$$

$$120V1=50.50$$

$$V1=20,83 \mu\text{l da amostra de DNA}$$

$$20,83 \mu\text{l da amostra de DNA} - 50 \mu\text{l do volume final} = 29,17 \mu\text{l H}_2\text{O Milli-Q}$$

- **Para amostras com 80 ng/µl e com volume final da diluição de 50 µl**

$$C1V1=C2V2$$

$$80V1=50.50$$

$$V1=31,25 \mu\text{l da amostra de DNA}$$

$$31,25 \mu\text{l da amostra de DNA} - 50 \mu\text{l do volume final} = 18,75 \mu\text{l H}_2\text{O milliQ}$$

OBS.: Feitas essas diluições o DNA seguiu para a Amplificação.

3.7 Amplificação do gene COI e Eletroforese para análise dos produtos de PCR

Antes de iniciar a amplificação foi necessário descongelar os reagentes e identificar os tubos. A luz da estação de trabalho foi ligada, onde foi possível colocar em uma placa os tubos e identificá-los. Feito isso, a luz UV foi ligada por cerca de 10 minutos para esterilizar o ambiente de preparação e os materiais que foram usados (tubos, ponteiros, pipetas). Enquanto procedeu esse tempo de esterilização, as amostras foram colocadas em gelo triturado com a finalidade de conservar em baixa temperatura os reagentes usados. Para a preparação do mix (Mistura dos reagentes usados) com volume total de 25 µL, foi usado 9,5 µL de H₂O ultrapura (Nuclease Free Water), 12,5µL de Go Top Taq Color Less Master Mix, 1µL Primer Fish F1, 1µL de Primer Fish R1 e 1 µL de DNA molde (50 ng), sendo adicionado um controle negativo, contendo água ao invés de DNA, para verificar se as amostras não estão contaminadas. Os primers serão aqueles descritos por Ward et al. (2005): FISH F1 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3' e FISH R1 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'. Depois de preparar o mix, o termociclador (My gene TM Series Peltier Thermal cycler, model MG96+) foi ligado, e os tubos foram colocados no aparelho.

A cuba foi novamente preparada para a eletroforese em gel de agarose à concentração

de 1%. A agarose foi levada ao micro-ondas para ser derretida. Quando o gel alcançou uma temperatura branda, foi posto em uma cuba de eletroforese, juntamente com o pente, para que haja a formação dos poços. Após a sua total solidificação, a cuba foi conduzida ao aparelho de eletroforese, sendo que após sua introdução no próprio, acrescentou-se o tampão de corrida (TBE 1X) até que este estivesse em contato com os eletrodos. Logo após, o pente foi retirado e as amostras de PCR aplicadas nos poços, como descrito anteriormente. O primeiro poço deve ser destinado ao marcador de tamanho de DNA (1 KB plus ladder), sendo utilizado 6 µl deste marcador, 1 µl de Gelred, 1 µl de azul de bromofenol. As bandas desse marcador são de tamanhos conhecidos, com as quais as bandas dos produtos de PCR são comparadas. A corrida eletroforética, a 90V, durou cerca 60 minutos em seguida o gel foi levado ao Transiluminador de luz UV para observação das bandas.

3.8 Purificação, sequenciamento e precipitação

Para a purificação foi usado a enzima ExoSap-IT® (USB Corporation), seguindo-se instruções do fabricante, onde consiste de 2 µl da enzima e 5 µl dos produtos de PCR. Após isso, foi ligado o termociclador e escolhido o programa: 37°C por 15 minutos, seguido de 80°C por mais 15 minutos.

Após a purificação, o material foi efetuado a precipitação das amostras, onde a placa foi submetida a spin em centrífuga refrigerada à -4°C. Logo após, adicionou-se 2,5 µl de EDTA (ácido etileno diamino tetra acético), vedada a placa com adesivo específico e submetendo-a novamente a um spin. Depois disso, s adicionou-se 30 µl de Etanol 100%, vedando-se a placa e invertendo-a de 4-5 vezes cuidadosamente. Então a placa foi envolvida em papel alumínio e deixada em repouso a temperatura ambiente por 15 minutos.

Decorrido esse tempo, a placa foi centrifugada a 4.000 RPM por 30 minutos e depois invertida bruscamente para descartar o álcool, sendo colocada para secar um pouco em papel absorvente. Logo em seguida, foi colocada para centrifugar invertida por 15 minutos a 1.150 RPM. Em seguida, foram adicionados 30 µl de etanol à 70% à placa, que foi vedada centrifugada à 3.440 RPM por 15 minutos.

Novamente, a placa foi invertida bruscamente descartando assim todo álcool e secando-a em papel absorvente. A placa foi levada invertida a centrífuga por um minuto à 1.150 RPM. Ao sair da centrífuga, levou-se a placa a estufa numa temperatura de 37°C por, aproximadamente, 10 minutos para evaporação do excesso de álcool. Após esse tempo, o pellet da placa foi ressuscitado em formamida (9 µl) e seu conteúdo injetado em sequenciador automático de DNA modelo ABI 3500 (Applied Biosystems), presente no

Laboratório de Genética e Biologia Molecular do CESC-UEMA (Caxias).

3.9 Análise de dados

As sequências foram editadas no programa BioEdit 5.0.9.0 (HALL, 1999). Para o alinhamento das sequências, foi empregado o programa ClustalW (TOMPSON et al., 1994), presente no BioEdit. As distâncias genéticas foram aferidas usando o modelo de Kimura-2-parâmetro (K2P) (KIMURA, 1980), que novamente foi usada para estimar as relações filogenéticas entre as espécies através de árvores de Neighbor-joining (NJ) usando Software Mega 6, (TAMURA et al., 2011) onde foi testado através do método bootstrap com 1000 × valores de replicações. Após analisadas as divergências genéticas, todas as sequências foram comparadas na Plataforma BOLD SYSTEMS (Barcode of Life Data Systems).

4 RESULTADOS

Foram obtidas no total de amostras, sequências parciais do gene COI de 27 espécimes de peixes pertencentes a duas ordens: Cichliformes e Acanthuriformes. Ocorrentes em duas bacias: Parnaíba e Munim, vinte e uma para o Rio Munim e seis para o Rio Parnaíba (Tabela 1). Houve dados para o Rio Tocantins como previsto no projeto, contudo em função das sequências não estarem ideal para a análise optou-se por não incluir tais dados ficando apenas os dados referentes a bacia do Munim e Parnaíba.

Tabela 1: Local de Coleta, família, e espécie de peixes das ordens, Cichliformes e Acanthuriformes.

Local de coleta	Ordem	Família	Espécie
Munim	Cichliformes	Cichlidae	<i>Cichlasoma cf. orientale</i>
			<i>Crenicichla menezesi</i>
			<i>Crenicichla sp.</i>
Parnaíba	Acanthuriformes	Sciaenidae	<i>Plagioscion squamosissimus</i>
			<i>Plagioscion auratus</i>

4.1 Identificação Molecular a partir de comparações com BOLD e NCBI, e divergências inter e intraespecíficas

De posse das sequências efetuou-se o alinhamento para verificar as divergências intra e interespecífica. Para as divergências encontradas nas amostras o valor obtido para a análise de divergência interespecífica foi maior entre *Cichlasoma cf. orientale* x *Crenicichla menezesi* que foi de 1.78%, já o menor valor da análise se deu entre *Plagioscion auratus* x *Crenicichla sp.* que foi de 0,19 considerando que esse valor foi baixo para espécies diferentes como mostra a Tabela 2.

Já para as análises de divergências dentro da mesma espécie o presente trabalho obteve os seguintes valores: *Plagioscion squamosissimus* = 1.893 %, *Cichlasoma cf. oriental* = 1.874%, *Crenicichla menezesi* = 1.653%. Com isso temos o maior valor de divergência para *Plagioscion squamosissimus* (1.893) e o menor para *Crenicichla menezesi* (1.653). Para *Plagioscion auratus* e *Crenicichla sp* não foi possível calcular tal divergência haja vista haver apenas uma sequência amostrada como mostra a tabela 2.

Tabela 2: Divergência interespecífica e intraespecífica.

Divergência interespecífica					
	<i>Plagioscion squamosissimus</i>	<i>Plagioscion auratus</i>	<i>Cichlasoma cf. orientale</i>	<i>Crenicichla menezesi</i>	<i>Crenicichla sp.</i>
<i>Plagioscion squamosissimus</i>					
<i>Plagioscion auratus</i>	1.249				
<i>Cichlasoma cf. zarskei</i>	1.640	1.173			
<i>Crenicichla menezesi</i>	1.484	1.189	1.783		
<i>Crenicichla sp.</i>	1.256	0.191	1.338	1.156	0.00
Divergência intraespecífica					
	<i>Plagioscion squamosissimus</i>	<i>Plagioscion auratus</i>	<i>Cichlasoma cf. orientale</i>	<i>Crenicichla menezesi</i>	<i>Crenicichla sp.</i>
	1.893	N/C	1.874	1.653	N/C

As 27 amostras de espécimes de peixes dos Rios Parnaíba e Munim, pertencentes às Ordens Cichliformes e Acanthuriformes que tiveram suas sequências genéticas do trecho do gene COI geradas obtiveram valores de similaridade acima de 98 %, valor necessário para confirmar a identificação correta das espécies. Neste trabalho 21 de 27 dos indivíduos, tiveram valores aceitáveis de acordo com a similaridade de sequências depositadas nas plataformas de banco de dados (NCBI- National Center for Biotechnology Information) e (BOLD Barcode of Life Data Systems), contudo 6 amostras de indivíduos não obtiveram valores suficientemente confiáveis para serem consideradas como espécies com similaridade corretas (tabela 3).

Tabela 3: Espécie, porcentagem de identificação molecular nas Plataformas BOLD SYSTEM e NCBI.

Espécie/Nº de indivíduos amostrados	Identificação BOLD e NCBI %
<i>Cichlasoma cf. orientale</i> (12)	85-99,83
<i>Crenicichla menezesi</i> (8)	86-100
<i>Crenicichla sp.</i> (1)	86
<i>Plagioscion squamosissimus</i> (6)	86-100
<i>Plagioscion auratus</i> (1)	86

Dentro das amostragens dos espécimes comparados nas plataformas temos a espécie *Cichlasoma cf. orientale* com 9 indivíduos, *Crenicichla menezesi* 7 indivíduos, *Plagioscion squamosissimus* 5 indivíduos, todos estes obtiveram valores acima de 98% de similaridade para as referidas espécies o que consiste no valor aceitável para a identificação correta.

4.2 Linhagens delimitadas pela topologia da árvores filogenéticas

De posse de tais dados foram geradas árvores a partir da metodologia de otimização Neighbor-joining para se avaliar o relacionamento entre as sequências de cada gênero (figuras 4, 5 e 6); sendo delimitadas três linhagens (espécies) para *Cichlasoma cf. orientale*, duas linhagens para *Crenicichla* Heckel, 1840 e duas linhagens para *Plagioscion* Gill, 1861 (tabela 4).

Tabela 4: Linhagens (espécies) delimitadas a partir das topologias geradas.

Gêneros	Linhagens	Sequências
<i>Cichlasoma cf. orientale</i>	1	01-07 + 09
	2	08 + 10 + 12
	3	11
<i>Crenicichla</i>	1	01-06+9
	2	07 e 08
<i>Plagioscion</i>	1	1+02+03+06
	2	4+05

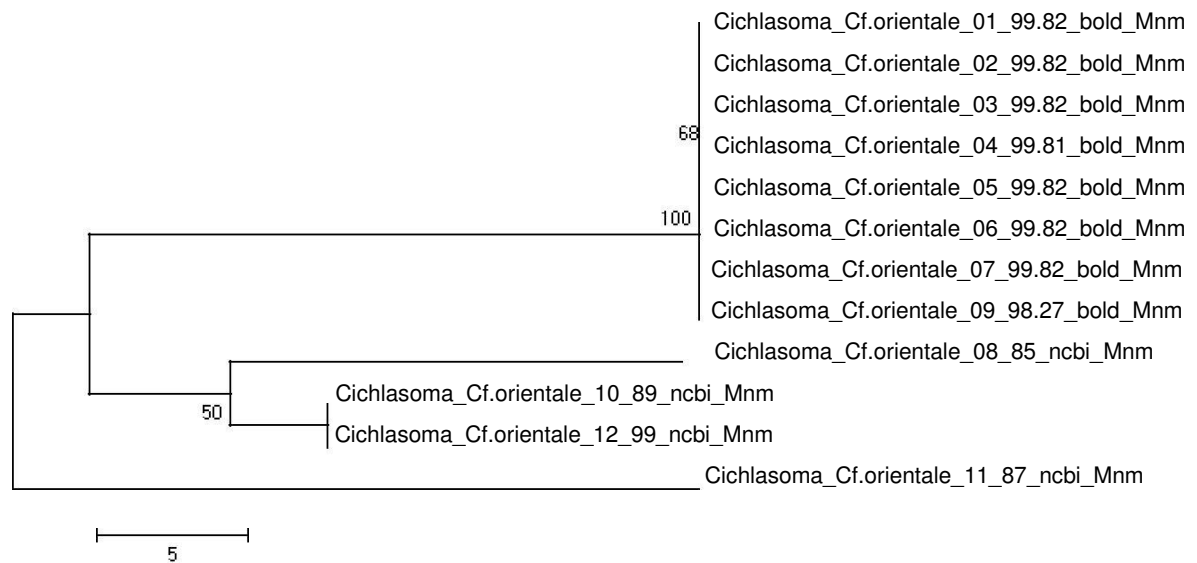
Figura 4: Árvore do tipo Neighbor-joining baseado no método de Kimura 2 parâmetros (K2P) do gene COI de peixes da ordem Cichliformes do rio Munim. É apresentado o nome da espécie, número de identificação do indivíduo, porcentagem de similaridade com a sequência já depositada e o banco de dados consultado (NCBI-National Center for Biotechnology Information) e (BOLD Barcode of Life Data Systems) e a respectiva bacia de coleta, (Mnm) Munim. Bem como os valores de bootstrap estão representados nas bases dos nós.

Figura 5: Árvore do tipo Neighbor-joining baseado no método de Kimura 2 parâmetros (K2P) do gene COI de peixes da ordem Cichliformes do Rio Munim. É apresentado o nome da espécie, número de identificação do indivíduo, porcentagem de similaridade com a sequência já depositada e o banco de dados consultado (NCBI- National Center for Biotechnology Information) e (BOLD Barcode of Life Data Systems) e a respectiva bacia de coleta, (Mnm) Munim. Bem como os valores de bootstrap estão representados nas bases dos nós.

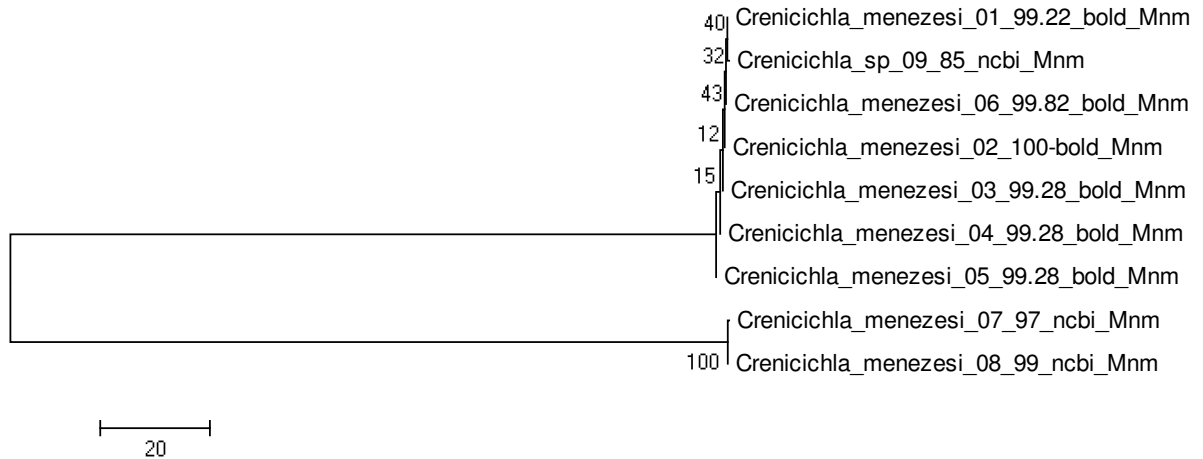
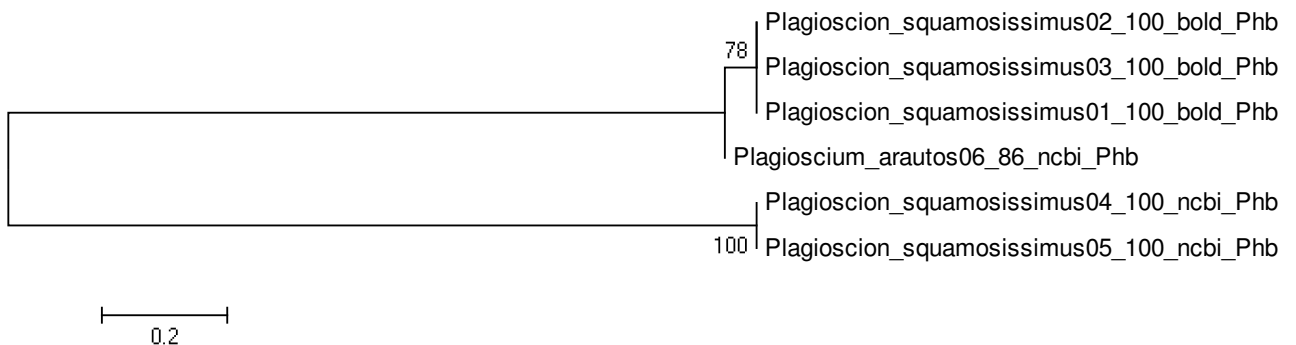


Figura 6: Árvore do tipo Neighbor-joining baseado no método de Kimura 2 parâmetros (K2P) do gene COI de peixes da ordem Acanthuriformes de rio do Rio Parnaíba. É apresentado o nome da espécie, número de identificação do indivíduo, porcentagem de similaridade com a sequência já depositada e o banco de dados consultado (NCBI- National Center for Biotechnology Information) e (BOLD Barcode of Life Data Systems) e a respectiva bacia de coleta, (PHB) Parnaíba. Bem como os valores de bootstrap estão representados nas bases dos nós.



5 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados, a identificação molecular dos espécimes das Ordens Cichliformes e Acanthuriformes das bacias do Munim e Parnaíba respectivamente, obteve sucesso no resultado de 77,77% do total.

Contudo houveram amostras de indivíduos que não alcançaram o mínimo de 98 % de similaridade como proposto por Hebert et al. (2003) e Ward et al. (2005); como é o caso de uma amostra de *Plagioscion auratus*, três amostras de *Cichlasoma cf. orientale*, uma amostra de *Crenicichla menezesi* e uma amostra de *Crenicichla sp.*. Tal fato possivelmente pode ter ocorrido devido não haver sequências disponíveis nas plataformas, National Center for Biotechnology Information e Barcode of Life Data Systems, dessas espécies para as drenagens analisadas. Além disso, no caso de *Cichlasoma cf. orientale*, existe uma outra espécie do mesmo gênero foi recentemente descrita (*Cichlasoma zarskei*) para a bacia do Rio Mearim, no Estado do Maranhão. Porém esta não possui sequências disponíveis nos bancos de dados *online* consultados no presente trabalho. Sendo assim, este pode ser outro motivo para indivíduos de *Cichlasoma cf. orientale* não terem alcançado o mínimo estabelecido pelo método.

A partir das árvores filogenéticas geradas pelas sequências do presente trabalho foram delimitadas três linhagens (espécies) para *Cichlasoma cf. orientale*; onde as amostras dos indivíduos de 01 a 07 e 09 (tabela 4) formaram um agrupamento consistente com uma única linhagem (espécie); amostras de indivíduos 08,10 e 12 agruparam-se de maneira consiste em outra linhagem; e a amostra do indivíduo 11 que ficou isolado gerando outra linhagem (figura 4). Portanto é possível que essas linhagens sejam espécies distintas.

Já para o gênero *Crenicichla* foram delimitadas duas linhagens (espécies). As amostras dos indivíduos de 01 à 06 e 09 (tabela 4) foram agrupadas em um mesmo ramo compondo uma mesma linhagem, mas não houve um alto índice de suporte para este agrupamento. As amostras 07 e 08, por sua vez, foram suportadas com alto suporte, como uma linhagem distinta (figura 5).

Para o gênero *Plagioscion* foram delimitadas duas linhagens; as amostras 01, 02, 03 e 06 (tabela 4) formaram um agrupamento consistente com uma única linhagem (espécie), e os indivíduos 04 e 05 foram agrupados de maneira consistente como outra linhagem. Entretanto, esse resultado encontrado foi conflitante com a identificação molecular através da base de dados BOLD e NCBI, já que a sequência 06 foi identificada molecularmente como *P. auratus* e as sequências 01 à 03 como *P. squamosissimus*; e essas sequências, na análise do presente trabalho, foram delimitadas como pertencendo a mesma linhagem (espécie) (figura 6).

6 CONCLUSÃO

O DNA barcoding tem se revelado uma ferramenta eficiente na identificação das espécies já conhecidas e de novas espécies, como observado pelo presente trabalho.

Os resultados deste estudo representam um progresso na construção do conhecimento da ictiofauna dos rios do Maranhão. O uso da metodologia DNA Barcoding para identificação de espécies de peixes das ordens Cichliformes e Acanthuriformes de rios Maranhenses mostrou-se eficiente com uma taxa de sucesso de 77,7% de identificação correta. Os dados gerados nesta pesquisa somam para o enriquecimento na identificação de espécies de peixes de água doce, bem como colaboram para o conhecimento da biodiversidade ictiológica de rios do Estado do Maranhão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, B. V. **Estudos Hidrológicos da Bacia do Rio Pindaré-Mirim. Rio de Janeiro: UFRJ. Escola Politécnica.** 2013.

ALCÂNTARA, E. H. **Caracterização da bacia hidrográfica do rio Itapecuru, Maranhão – Brasil.** Caminhos de Geografia. 7(11): 97-113. 2004.

ALJANABE, S. M; MARTINEZ, I. **Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques.** Nucleic Acids Research 25, 4692–4693. 1997.

ARDURA, ALBA; LINDE, ANA ROSA; MOREIRA, JOSINO C.; GARCIA-VAZQUEZ, EVA. **DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish, Biological Conservation**, Volume 143, Issue 6, June 2010, Pages 1438-1443, ISSN 0006-3207, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2010.03.019>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006320710001084> Acessado em: 01/11/2015

ARON SL, SOLE-CAVA AM. **Genetic evaluation of the taxonomic status of two varieties of the cosmopolitan ascidian Botryllus niger (Ascidiacea: Botryllidae).** Biochem Syst Ecol 19: 271–276. 1991.

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

BETANCUR-R. R, BROUGHTON RE, WILEY EO, CARPENTER K, LÓPEZ JA, LI C, HOLCROFT NI, ARCILA D, SANCIANGCO M, CURETON II JC, ZHANG F, BUSER T, CAMPBELL MA, BALLESTEROS JA, ROA-VARON A, WILLIS S, BORDEN WC, ROWLEY T, RENEAU PC, HOUGH DJ, LU G, GRANDE T, ARRATIA G, ORTÍ G. **The Tree of Life and a New Classification of Bony Fishes. PLOS Currents Tree of Life.** 2013 Apr 18. Edition 1. Disponível em: [currents.tol.53ba26640df0ccaee75bb165c8c26288](https://doi.org/10.1371/journal.plos.curren.53ba26640df0ccaee75bb165c8c26288)

BROWN, W. M; GEORGE, M. J. R; WILSON, A. C. **Rapid evolution of animal mitochondrial DNA.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA.; 76: 1967-1971. 1979.

BROWER, A.V. Z. (2006). **Problems with DNA barcodes for species delimitation: 'ten species' of *Astrartes fulgurator* reassessed (Lepidoptera: HesperIIDae) Syst Biodiv, 4(2):127-132.**

BUCKUP, P. A; ZAMPROGNO, C; VIEIRA, F; TEIXEIRA, R. L. **Waterfall chibing in Characidium (Crenuchidae – Characidiinae) from eastern Brazil. Ichthyological Explorations Freshwaters.** 11(3): 273-278. 2000.

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

CALCAGNOTTO, D. **Taxas de evolução e o relógio molecular.** Pp 51-63. In: Mاتيoli, S.R. (Ed.). *Biologia Molecular e Evolução.* Holos Editora, Ribeirão Preto. 202 pp. 2004.

CALCAGNOTTO, D; SCHAEFER, S. A; DESALLE, R. **Relationships among Characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences.** *Mol. Phylogenet Evol.* 36: 135-153. 2005.

CATERINO M.S; CHO S; SPERLING F.A.H. **The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of babel.** *Annual Review of Entomology,* 45, 1– 54.2000.

CLAYTON D.A; DODA J.N; FRIEDBERG E.C. **The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1974.

DESALLE, R., EGAN, M. G., & SIDDALL, M. (2005). **The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences,* 360(1462), 1905–1916. <http://doi.org/10.1098/rstb.2005.1722>.

FERGUSON A, TAGGART JB, PRODHÖL PA, MCMEEL O, THOMPSON C, STONE C, MCGINNITY,P, HYNES RA. R.A. **The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to Salmo.** *J Fish Biol,* v.47, suppl A, p.103-126, 1995.

FRAGA, E; SCHANEIDER, H; NIRCHIO, M; SANTA-BRIGIDA, E; RODRIGUES-FILHO, L. F; SAMPAIO, I. **Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae, Mugiliformes) based on two mitochondrial genes.** *J. Appl. Ichthyol.* 2007.

GUSMÃO J, LAZOSKI C, SOLE ´-CAVA AM. **A new species of Penaeus (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses.** *Mar Biol* 137:435–446. 2000.

HALL TA. **BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis**

program for windows 95/98/nt. Nucleic acids symposium, 41: 95-98. 1999.

HEBERT, P. D. N; CYWINSKA, A; BALL, S. L; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B, v. 270, p. 313-321. 2003.

HEBERT, P. D. N; PENTON, E. H; BURNS, J. M; JANZEN, D. H; HALLWACHS, W. (2004a) **Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*.** PNA v.101, n.41, 14812-14817.

HEBERT, P. D. N., STOECKLE, M. Y., ZEMLAK, T. S., FRANCIS, C. M. (2004b). **Identification of birds through DNA Barcodes.** PLoS Biol, 2(10):1567-1663.

HEBERT P. D. N; WAARD, D. J. R; LANDRY, J.F. **DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom.** Biol. Lett., Online. 2009.

HELFMAN, GS, BB COLLETTE, DE FACEY & BW BOWEN. 2009. **A diversidade de peixes: Biologia, Evolução e Ecologia.** West Sussex, Wiley-Blackwell, 720 p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia. **Zoneamento geoambiental do estado do Maranhão.** 44p.1997.

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

KULLANDER, S.O. **A revision of the South American cichlid genus *Cichlasoma* (Teleostei: Cichlidae).** Swedish Museum of Natural History, Stockholm, 296 pp. 1983.

METCALF JL, PRITCHARD VL, SILVESTRI SM, JENKINS JB, WOOD JS, COWLEY DE, EVANS RP, SHIOZAWA DK, MARTIN AP. **Across the great divide: genetic forensics reveals misidentification of endangered cutthroat trout populations.** Mol Ecol, v.16, p.4445-4454, 2007.

MEYER CP, PAULAY G (2005) **DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling.** PLoS Biol 3(12): e422.

MMA (Ministério do Meio Ambiente), Secretaria de Recursos hídricos. **Caderno da Região Hidrográfica Atlântico Nordeste Ocidental. Brasília, MMA. 2006a.** Disponível em:http://www.mma.gov.br/estruturas/161/_publicacao/161_publicacao03032011024629.pdf. Acessado em 22/10/2015

MMA (Ministério do Meio Ambiente), Secretaria de Recursos hídricos. **Caderno da Região Hidrográfica Parnaíba. Brasília, MMA. 2006b.** Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/161/_publicacao/161_publicacao03032011024629.pdf.

Acessado em 22/10/2015

MMA (Ministério do Meio Ambiente), Secretaria de Recursos hídricos. **Caderno da Região Hidrográfica Tocantins-Araguaia. Brasília, MMA. 2006 c.** Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/161/_publicacao/161_publicacao03032011024629.pdf

Acessado em 22/10/2015

MORITZ, C; DOWLING, T. E; BROWN, W. M. **Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics.** Ann Rev Ecol Syst. 18: 269-292.1987. 1987.

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

NELSON, J. S.; GRANDE, T. C. & WILSON, M. V. H. **Fishes of the world.** 5 ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2016.

PIORSKI, N. M. **Diversidade Genética e Filogeográfica das Espécies Hoplias malabaricus (Bloch, 1794) e Prochilodus lacustris Steindachner, 1907 no Nordeste do Brasil.** 2010. 152f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Paulo. 2010.

RAWLINGS, T. A; COLLINS, T. M; BIELER, R. **A major mitochondrial gene rearrangement among closely related species.** Mol Biol Evol. 18(8):1604-1609. 2001.

REIS, R. E; KULLANDER, S.O; FERRARIS, J. R. C. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America.** Porto Alegre: Edipucrs. 2003.

RIBEIRO, V. F; GONÇALVES, L. D. P; FURTADO, M. S; FEITOSA, A. C **Degradação do solo no médio curso do rio Munin, município de Chapadinha-MA.** VI Simpósio Nacional de Geomorfologia/Regional Conference on Geomorphology. 2006.

RODRIGUES, J. L. P. **Estudos Regionais do Piauí.** Teresina.2001.

SANTOS, M. J. **A balaiada e a insurreição de escravos no Maranhão.** São Paulo, Ática, 126p.1983.

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

SANTOS, G. M; MÉRONA, B; JURAS, A. A; JÉCU, M. **Peixes do Baixo Rio Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidrelétrica Tucuruí.** Eletronorte, Brasília. 216p. 2004.

SOLÉ-CAVA AM. **Biodiversidade molecular e genética da conservação.** In: Matioli, S.R (Ed.). Biologia molecular e evolução. Ribeirão Preto: Holos, p.171-192. 2001.

SOUSA, J. R. M. **Terras de preto no Maranhão: reflexões sobre o vale do Munim. Outros tempos, São Luis – MA, UEMA,** vol. 4.2007.

SMITH P.J, MCVEAGH SM, STEINKE D. **DNA barcoding for the identification of smoked fish products.** J Fish Biol, v.72, p.464-471, 2008.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M AND KUMAR S. **MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.** Molecular Biology Evolution, 10: 2731-9. 2011.

VARI, R.P. & MALABARBA, L.R. **Neotropical ichthyology: an overview.** In Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Edipucrs, Porto Alegre. 1998.

VINSON, C. C; GOMES, G; SCHANEIDER, H; SAMPAIO, I. **Sciaenidae fish of the Caeté River estuary, Northern Brazil: mitochondrial DNA suggests explosive radiation for the Western Atlantic assemblage.** Genetics and Molecular Biology, 27:174-180, 2004.

WARD, R. D; ZEMLAK, T. S; INNES, B. H; LAST, P. R; HEBERT, P. D. N. **DNA barcoding Australia's fish species.** Phil Trans R Soc B, 359:1847-1857. 2005.

WARD, R. D; HANNER, R; HEBERT, P. D. N. **REVIEW PAPER: The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL.** Journal of Fish Biology, 74, 329 a 356. 2009.

WOLFE, A. D; LISTON, A. **Contributions of PCR-based methods of plant systematics and evolutionary biology.** Molecular systematics of plants. 43-86.1998.

<http://www.nature.com/scitable/content/the-role-of-the-mitochondrial-genome-in-61848>

Acessado em 01/02/2016

YAMAZAKI N, UESHIMA R, TERRETT JA, YOKOBORI S, KAIFU M, SEGAWA R, ET AL. **Evolution of pulmonate gastropod mitochondrial genomes: comparisons of gene organizations of Euhadra, Cepaea and Albinaria and implications of unusual tRNA secondary structures.** Genetics.145(3): 749-758. 1997.

YANJUN SHEN, JINGLIANG KANG, WEITAO CHEN, SHUNPING HE. **DNA barcoding for the identification of common economic aquatic products in Central China and its application for the supervision of the market trade, Food Control**, Volume 61, March 2015, Pages 79-91, ISSN 0956-7135. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515301730>. Acessado em 01/11/2015