



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE BRAGANÇA
INSTITUTO DE ESTUDOS COSTEIROS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

BRUNA GABRIELE CARDOSO NASCIMENTO

**MARCADORES MITOCONDRIAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DA DIVERSIDADE
DE ANOSTOMIDAE**

**BRAGANÇA – PA
2025**

BRUNA GABRIELE CARDOSO NASCIMENTO

**MARCADORES MITOCONDRIAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DA DIVERSIDADE
DE ANOSTOMIDAE**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, do Instituto de Estudos Costeiros, do *Campus* de Bragança, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau em Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Grazielle Fernanda Evangelista Gomes.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ivana Barbosa Veneza.

**BRAGANÇA - PA
2025**

BRUNA GABRIELE CARDOSO NASCIMENTO

**MARCADORES MITOCONDRIAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DA DIVERSIDADE
DE ANOSTOMIDAE**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, do Instituto de Estudos Costeiros, do *Campus* de Bragança, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau em Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Grazielle Fernanda Evangelista Gomes.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ivana Barbosa Veneza.

Conceito:

Data da aprovação:

Prof^a. Dra. Grazielle Fernanda Evangelista Gomes – Orientadora
Universidade Federal do Pará – *Campus* de Bragança.

Dra. Andressa Jisely Barbosa Ribeiro
Universidade Federal do Pará – *Campus* de Bragança.

Me. Charles Samuel Moraes Ferreira
Universidade Federal do Pará – *Campus* de Bragança.

**BRAGANÇA - PA
2025**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Michele e Bruno. Aos meus avós, Evaneide e Carlos. E a minha querida irmã, Eloísa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me sustentar até aqui com suas infinitas bênçãos e por ser a minha fortaleza e por ter me dado forças em todos os momentos. Sem Ele, nada seria possível.

À minha família, minha base e porto seguro, expresso minha eterna gratidão. Em especial, à minha mãe, Michele, que sempre se dedicou incansavelmente para me proporcionar o melhor, estando ao meu lado nos momentos mais difíceis da minha vida e ao longo da minha formação acadêmica. Aos meus avós, Evaneide e Carlos, que desempenharam um papel fundamental em minha criação, me cuidando com amor, carinho e preocupação, e me oferecendo suporte sempre que necessário. Ao meu pai, pelo apoio incondicional, pelo incentivo aos meus estudos e por ser um verdadeiro guerreiro. À minha irmãzinha Eloisa, a alegria da minha vida, presente de Deus e meu grande amor.

À minha orientadora, Dr^a. Grazielle Fernanda Evangelista Gomes, agradeço pela oportunidade de integrar a equipe do Laboratório de Genética Aplicada (LAGA) como bolsista de iniciação científica, pela orientação, incentivo, paciência e compreensão nos momentos mais desafiadores. À minha coorientadora, Dr^a. Ivana Veneza, sou grata por toda a orientação, paciência e parceria, tanto no âmbito acadêmico quanto pessoal, tornando-se uma verdadeira amiga.

Aos colegas do LAGA, agradeço pela parceria e aprendizado. Em especial, à Josy, que me acolheu desde o início e, com sua paciência e didática, me ensinou os procedimentos laboratoriais e corrigiu todos os meus relatórios. Às minhas queridas amigas Ingrid e Aline, que compartilharam comigo os altos e baixos dessa trajetória. E a todo o grande time do laboratório: Andressa, Suane, Charles, Carla, Ítalo, Paula, Thais, Nicolly, Jorge, Jefferson, Danilo, Ingrid, Brenda, Nathalia, Aldenice e Manu. Gratidão pelos momentos compartilhados.

À minha grande amiga Beatriz, minha parceira em quase todo o curso, desde os trabalhos acadêmicos até a vivência de morar juntas. À minha querida amiga Naila, que é como uma irmã para mim.

A uma pessoa muito especial que entrou na minha vida e com quem compartilho momentos de felicidade e parceria, meu namorado Emanuel, agradeço pelo apoio e companhia nessa jornada.

Por fim, expresso minha gratidão à Universidade Federal do Pará, à Faculdade de Ciências Biológicas e ao Laboratório de Genética Aplicada pela infraestrutura concedida, bem como a todos os professores que contribuíram para a minha formação acadêmica.

*“Não fui eu que ordenei a você?
Seja forte e corajoso! Não se apavore nem
desanime, pois o Senhor, o seu Deus,
estará com você por onde você andar.”*

Josué 1:9.

RESUMO

A família Anostomidae, composta por peixes de água doce neotropicais, destaca-se pela sua diversidade e importância ecológica e econômica nas áreas onde ocorrem. No entanto, trata-se de um grupo controverso quanto à real diversidade registrada, relações filogenéticas complexas e identificação de espécies problemática. Diante disso, este estudo teve como objetivo investigar a eficiência de fragmentos mitocondriais para determinação de espécies de Anostomidae. Para isso, a pesquisa foi conduzida em dez localidades, onde foram amostrados 127 indivíduos, a partir dos quais foram amplificados fragmentos mitocondriais do gene Citocromo Oxidase C, Subunidade I (COI) e Região Controle (RC). Representantes de haplótipos de ambas as regiões genéticas estudadas foram confrontadas em bancos públicos de sequências, além da aplicação da identificação filogenética, baseada na topologia de cladogramas, auxiliada por identificação morfológica. Os resultados demonstraram que o gene COI apresentou limitações na distinção de espécies a partir das comparações em bancos públicos de sequências, o que foi indicado pela alta similaridade genética entre múltiplas espécies, algo corroborado pela Inferência Bayesiana desse fragmento, onde os clados não demonstraram arranjos indistintos a nível de espécie e gênero. Por outro lado, a análise filogenética baseada na RC revelou uma melhor resolução para a discriminação dos gêneros *Leporinus*, *Megaleporinus* e *Schizodon*, assim como para espécies, em conformidade com a identificação morfológica. No entanto, a escassez de sequências da RC em bancos públicos limitou sua aplicabilidade para identificação molecular de Anostomidae. Assim, o uso desse fragmento mitocondrial mostra-se promissor como alternativa, aliado à morfologia, para aprimorar a identificação e delimitação de anostomídeos, e dessa forma, pode contribuir com estudos taxonômicos e filogenéticos do grupo.

Palavras-chave: COI; Região Controle; Identificação Molecular; *Leporinus*; *Megaleporinus*; *Schizodon*.

ABSTRACT

The family Anostomidae, composed of neotropical freshwater fish, stands out for its diversity and ecological and economic importance in the areas where they occur. However, it is a controversial group regarding the actual recorded diversity, complex phylogenetic relationships, and problematic species identification. In light of this, the aim of this study was to investigate the efficiency of mitochondrial fragments for species determination within Anostomidae. To achieve this, the research was conducted at ten locations, where 127 individuals were sampled. Mitochondrial fragments of the Cytochrome Oxidase I gene (COI) and Control Region (CR) were amplified from these samples. Representatives of haplotypes from both genetic regions studied were compared in public sequence databases, along with the application of phylogenetic identification, based on cladogram topology, assisted by morphological identification. The results showed that the COI gene had limitations in distinguishing species based on comparisons in public sequence databases, as indicated by the high genetic similarity among multiple species, which was further supported by Bayesian Inference of this fragment, where the clades did not show distinct arrangements at the species and genus level. On the other hand, the phylogenetic analysis based on the CR revealed better resolution for discriminating the genera *Leporinus*, *Megaleporinus*, and *Schizodon*, as well as species, in agreement with morphological identification. However, the scarcity of CR sequences in public databases limited its applicability for molecular identification of Anostomidae. Thus, the use of this mitochondrial fragment appears promising as an alternative, when combined with morphology, to improve the identification and delimitation of Anostomidae, and, in this way, could contribute to taxonomic and phylogenetic studies of the group.

Keywords: COI; Control Region; Molecular Identification; *Leporinus*; *Megaleporinus*; *Schizodon*.

LISTA DE FIGURAS E TABELA

- Figura 1** – Mandíbulas de diferentes espécies da família Anostomidae, destacando a variação na morfologia e na disposição dos dentes e estruturas ósseas. As barras de escala são de 1 mm. 12
- Figura 2** – Diversidade de Anostomidae exemplificada por algumas de suas espécies. 12
- Figura 3** – Mapa de localização contendo os pontos de coleta..... 23
- Figura 4** – Árvore de Inferência Bayesiana (IB) utilizando o gene COI de espécies de Anostomidae. Os valores sobre os ramos indicam o suporte estatístico em probabilidade a *posteriori*. 29
- Figura 5** – Árvore de Inferência Bayesiana (IB) utilizando a Região Controle de espécies de Anostomidae. Os valores sobre os ramos indicam o suporte estatístico em probabilidade a *posteriori*. 30
- Tabela 1** – Localidades, pontos de coleta e respectivas bacias hidrográficas. N: número de amostras coletadas em cada localidade. 23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. A Família Anostomidae – Piaus e Aracus	11
<i>1.1.1. Taxonomia da Família Anostomidae</i>	15
<i>1.1.2. Importância econômica de Anostomidae</i>	17
1.2. Dados moleculares e aplicações para discriminação e delimitação de espécies	18
1.3. Justificativa	20
1.4. Objetivos	21
<i>1.4.1. Objetivo geral</i>	21
<i>1.4.2. Objetivos específicos</i>	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1. Ética no uso animal e autorização para transporte das amostras	22
2.2. Locais de coleta e amostragem	22
2.3. Isolamento, amplificação e sequenciamento do material genético	24
2.4. Análises computacionais	25
<i>2.4.1. Montagem do banco de dados</i>	25
<i>2.4.2. Identificação molecular e morfológica das espécies</i>	25
3. RESULTADOS	27
3.1. Identificação molecular	27
3.2. Identificação morfológica	31
4. DISCUSSÃO	31
4.1. Identificação de anostomídeos com base em COI é ambígua	32
4.2. Discriminação de espécies de Anostomidae a partir da RC	34
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
APÊNDICE	45

1. INTRODUÇÃO

Os peixes representam o grupo mais numeroso e diversificado entre os vertebrados, com aproximadamente 34.200 espécies descritas, distribuídas em 515 famílias e 85 ordens, abrangendo mais da metade das 55.000 espécies de vertebrados conhecidos (BOTERO *et al.*, 2021). Dessa diversidade, 58% das espécies são marinhas, 41% de água doce, e 1% apresenta migração entre ambientes de água doce e salgada ao longo de suas vidas (BOTERO *et al.*, 2021). Esses dados demonstram a complexidade e a amplitude da diversidade de peixes, que ocupam uma vasta gama de ecossistemas aquáticos, refletindo uma história evolutiva marcada por adaptações e especializações em diferentes nichos ecológicos (BOTERO *et al.*, 2021).

A região Neotropical destaca-se por abrigar a maior diversidade de peixes de água doce no mundo. São reconhecidas mais de 6.200 espécies válidas nesta região (ALBERT; TAGLIACOLLO; DAGOSTA, 2020; BIRINDELLI; SIDLAUSKAS, 2018), das quais aproximadamente 5.160 ocorrem na América do Sul (REIS *et al.*, 2016). No Brasil, essa riqueza ictiofaunística é expressiva, com cerca de 3.672 espécies registradas até o momento (FROESE; PAULY, 2024). Projeções indicam que o número total pode ultrapassar 9.000 espécies, conforme as descobertas taxonômicas evoluem (REIS *et al.*, 2016). Essa diversidade reflete a riqueza de habitats aquáticos da região, que oferece condições ecológicas únicas para a evolução e adaptação das espécies. Entre os ecossistemas mais relevantes da região Neotropical está a Amazônia, que se destaca por sua contribuição significativa à biodiversidade global, inclusive quanto à ictiofauna (ALBERT; TAGLIACOLLO; DAGOSTA, 2020).

A bacia amazônica, além de ser a maior do mundo, com uma extensão superior a 6.000.000 km², desempenha um papel fundamental na hidrologia do planeta, sendo responsável por cerca de 16% do volume global de água doce descarregada (LATRUBESSE *et al.*, 2017; SALATI; VOSE, 1984). Ademais, possui uma grande relevância ecológica, abrigando a maior biodiversidade de água doce do planeta (TISSEUIL *et al.*, 2013). Em termos de ictiofauna, o inventário amazônico é composto por aproximadamente 2.716 espécies válidas, incluídas em 529 gêneros, 60 famílias e 18 ordens (DAGOSTA; DE PINNA, 2019). Estima-se que 1.696 espécies são endêmicas, representando aproximadamente 63% das espécies presentes na bacia (DAGOSTA; DE PINNA, 2019). Esse alto grau de endemismo reforça a importância biológica da região e posiciona a Amazônia como um dos ecossistemas mais complexos e biodiversos do mundo.

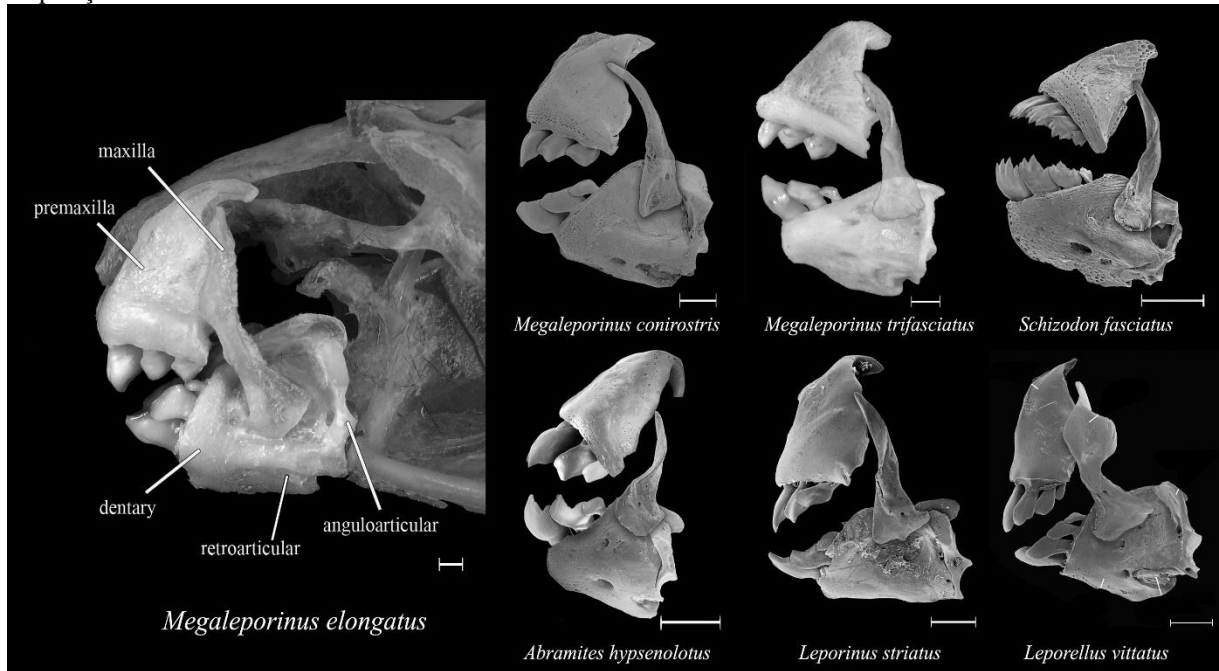
A ordem Characiformes é a mais diversa entre os peixes amazônicos, compreendendo em torno de 1.063 espécies (DAGOSTA; DE PINNA, 2019), com destaque para sua ampla distribuição e predominância nos ambientes neotropicais. Essa ordem é responsável pela maior parte da biomassa de pescado destinada ao consumo humano na Amazônia Central, evidenciando sua relevância para a segurança alimentar das populações locais (BATISTA; ISAAC; VIANA, 2004). Devido à sua expressiva presença nos ecossistemas aquáticos e ao valor comercial associado, as espécies de Characiformes são amplamente exploradas pela pesca, especialmente no contexto da pesca comercial regional (BATISTA; PETRERE, 2003). Essa atividade desempenha um papel econômico significativo nos ecossistemas amazônicos e é praticada em diferentes modalidades, desde a pesca de subsistência e artesanal, predominante entre comunidades ribeirinhas, indígenas e quilombolas, até a pesca industrial, realizada por pescadores profissionais (GANDRA, 2010). Dentro dessa ordem, destaca-se a família Anostomidae, por sua diversidade e importância do ponto de vista ecológico e econômico.

1.1. A Família Anostomidae – Piaus e Aracus

Os membros de Anostomidae são identificáveis devido à presença de três a quatro dentes ensiformes em cada pré-maxilar e dentário (**Figura 1**), característica que os distingue de outros peixes, especialmente dentro da ordem Characiformes (BIRINDELLI; SIDLAUSKAS, 2018; SIDLAUSKAS; BIRINDELLI; VAN DER SLEEN; ALBERT, 2017).

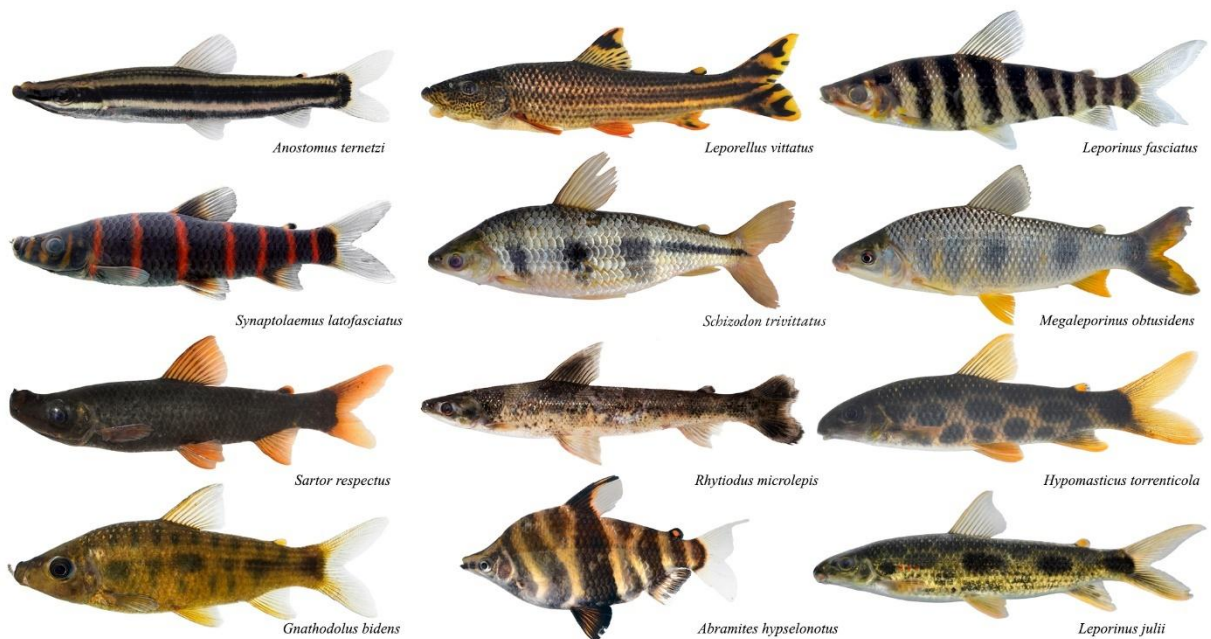
Esta família é reconhecida como a segunda mais rica dentro da ordem Characiformes, com 150 espécies válidas, distribuídas em 16 gêneros (FRICKE; ESCHMEYER; FONG, 2025) (**Figura 2**), e apresenta alta diversidade e endemismo na América do Sul (DAGOSTA; DE PINNA, 2019), com ocorrência em diversas bacias hidrográficas brasileiras (SANTOS, 1982), sendo a maior diversidade observada na bacia amazônica, onde ocorrem em grande número e desempenham papéis ecológicos importantes para a manutenção do equilíbrio ecossistêmico (DOS SANTOS; ZUANON, 2008). Porém, sua representatividade diminui em rios costeiros isolados das Guianas, bem como na bacia do São Francisco e em outros sistemas fluviais do litoral nordestino do Brasil, onde a presença desses peixes é consideravelmente reduzida (REIS; KULLANDER; FERRARIS JR., 2003).

Figura 1 – Mandíbulas de diferentes espécies da família Anostomidae, destacando a variação na morfologia e na disposição dos dentes e estruturas ósseas. As barras de escala são de 1 mm.



Fonte: Ramirez; Birindelli e Galetti Jr. (2017).

Figura 2 – Diversidade de Anostomidae exemplificada por algumas de suas espécies.



Fonte: Sidlauskas *et al.* (2025).

A ocorrência desse grupo pode estar relacionada a fatores como disponibilidade de recursos alimentares, estrutura do ambiente e interações ecológicas com outras espécies, uma vez que habitam uma grande variedade de ambientes aquáticos, como: lagos, corredeiras, margens de grandes rios e pequenos córregos situados em áreas florestais (DOS SANTOS;

ZUANON, 2008), essa capacidade adaptativa do grupo viabiliza sua presença em diferentes condições ecológicas e hidrodinâmicas.

Algumas espécies dos gêneros *Leporinus* Agassiz, 1829, *Schizodon* Agassiz, 1829 e *Megaleporinus* Ramirez, Birindelli & Galetti, 2017 apresentam comportamento migratório associado ao ciclo reprodutivo, de forma que se deslocam anualmente para áreas específicas de desova. Esse fato já foi descrito para populações que habitam sistemas como o Paraná-Paraguai (DE GODOY, 1975) e as bacias do Amazonas e Orinoco (GOULDING, 1981). Por outro lado, a piapara, *Megaleporinus elongatus* (Valenciennes, 1850), por exemplo, forma cardumes e se desloca para regiões de águas mais calmas, como partes médias e inferiores dos rios (REIS; KULLANDER; FERRARIS JR., 2003). A desova dessa espécie ocorre de forma sazonal, geralmente entre dezembro e janeiro, com um pico que pode ser influenciado pela temperatura da água, em torno de 21 a 27°C (SOUSA *et al.*, 2014). Já para *Leporinus friderici* (Bloch 1794), há evidências de que a reprodução pode ocorrer tanto em ambientes lóticos quanto lênticos, o que sugere uma maior flexibilidade em relação ao habitat de desova (BARBIERI; SANTOS, 1988; LOPES; BENEDITO-CECILIO; AGOSTINHO, 2000).

Com relação à alimentação, os anostomídeos possuem hábito onívoro, com tendência para o consumo de matéria vegetal, consumindo principalmente frutos e sementes. No entanto, também se destacam por sua capacidade de adaptação alimentar, demonstrando um comportamento oportunista em relação à dieta. Ou seja, dependendo da disponibilidade de recursos no ambiente, podem incorporar outros itens alimentares, ajustando sua alimentação conforme as condições ecológicas em que estão inseridos (BALASSA; FUGI; HAHN; GALINA, 2004; SANTOS, 1981; 1983).

Por consumirem frutos e sementes, os anostomídeos tornam-se agentes importantes na dispersão de sementes, desempenhando um papel ecológico essencial nos ecossistemas aquáticos neotropicais (BALASSA; FUGI; HAHN; GALINA, 2004; SANTOS, 1981; 1983). Ademais, um componente importante para o grupo são as matas de galeria, vegetações que margeiam os cursos d'água e que exercem influência direta na qualidade do habitat desses peixes, pois além de fornecer alimento, contribuem para a estruturação do ambiente ao introduzir invertebrados aquáticos e restos vegetais, como galhos e troncos, que servem de suporte para o perifíton. A degradação dessa vegetação pode impactar significativamente a disponibilidade dos recursos alimentares para os anostomídeos e, conseqüentemente, a dinâmica ecológica dos ecossistemas aquáticos onde estão inseridos (MELO; RÖPKE, 2004).

Dentre os Anostomidae, o gênero *Leporinus* destaca-se como o mais diverso, contando com aproximadamente 90 espécies válidas, distribuídas amplamente por todas as principais

bacias hidrográficas da América do Sul (BIRINDELLI; BRITSKI, 2013; BURNS; FRABLE; SIDLAUSKAS, 2014; FRICKE; ESCHMEYER; FONG, 2025; SIDLAUSKAS; BIRINDELLI; VAN DER SLEEN; ALBERT, 2017). Essa riqueza de espécies está associada a uma grande diversidade morfológica, principalmente em características como a forma do focinho, a posição da boca e a estrutura dentária (SIDLAUSKAS; VARI, 2008). Uma das principais características de *Leporinus* é a presença de uma boca terminal ou subterminal, além da dentição composta por quatro dentes no dentário e três ou quatro no pré-maxilar, todos unicúspides e incisiformes (SIDLAUSKAS; BIRINDELLI; VAN DER SLEEN; ALBERT, 2017).

O segundo gênero mais diverso é *Schizodon*, reunindo 15 espécies válidas (GARAVELLO, JULIO CESAR; BRITSKI, HERALDO A, 2003; GARAVELLO; BRITSKI, 2019; SIDLAUSKAS; GARAVELLO; JELLEN, 2007). É amplamente distribuído na América do Sul, ocorrendo em diversas bacias hidrográficas que drenam para o leste da Cordilheira dos Andes, incluindo os sistemas do Amazonas, Orinoco, Paraná, Paraguai, Uruguai, São Francisco, Tocantins, além de bacias costeiras no nordeste do Brasil e drenagens das Guianas. No entanto, essas espécies estão ausentes das bacias litorâneas isoladas do sudeste brasileiro (GARAVELLO, J. C.; BRITSKI, H. A., 2003; SIDLAUSKAS; VARI, 2012). O gênero apresenta uma notável variação na coloração corporal, sendo possível reconhecer dois grandes padrões: um deles é caracterizado pela presença de barras verticais escuras nos flancos, que podem estar associadas a uma faixa longitudinal ou uma mácula na base do pedúnculo caudal; já o segundo padrão engloba espécies sem essas barras verticais, mas que exibem uma faixa lateral, às vezes pouco perceptível, que pode disfarçar a mácula no pedúnculo caudal (GARAVELLO, 1994). Além dessas características externas, *Schizodon* é reconhecido por distintos caracteres diagnósticos descritos por Myers (1942) e por sinapomorfias osteológicas detalhadas por Sidlauskas e Vari (2008).

Megaleporinus é o terceiro gênero mais rico em número de espécies (FROESE; PAULY, 2024) e possui um conjunto específico de características morfológicas que o separa de outros membros da família Anostomidae, particularmente de *Leporinus*. Os representantes deste gênero apresentam um corpo alongado e relativamente robusto, com um padrão de coloração característico que inclui marcas escuras distribuídas ao longo dos flancos. A dentição é um dos principais traços diagnósticos, composta por três dentes ensiformes no pré-maxilar e quatro no dentário, todos relativamente grandes e especializados na captura e trituração de alimentos. Além disso, a estrutura craniana e osteológica desses peixes revela diferenças sutis,

mas significativas, em relação aos demais gêneros, o que reforça sua posição filogenética distinta dentro da família (RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR, 2017).

A diversidade dentro da família Anostomidae observada na sua ampla distribuição geográfica e nas características morfológicas distintas entre os gêneros, não se reflete na nomenclatura popular atribuída a essas espécies. Os anostomídeos são comumente conhecidos no Brasil por dois principais nomes populares, são eles "piauí" e "aracu", sendo essas designações utilizadas para diversas espécies. "Piauí" é atribuída, por exemplo, a *Megaleporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837), *Megaleporinus elongatus* (Valenciennes, 1850), *Leporinus melanopleura* Günther, 1864, *Leporinus bahiensis* Steindachner, 1875, *Leporinus striatus* Kner, 1858 e *Leporinus lacustris* Amaral Campos, 1945 (FROESE; PAULY, 2024).

Além disso, algumas espécies são referidas tanto como "piauí" quanto como "aracu", como *Leporinus friderici* (Bloch, 1794), *Hypomasticus megalepis* (Günther, 1863), *Megaleporinus trifasciatus* (Steindachner, 1876) e *Leporinus agassizii* Steindachner, 1876. No contexto da produção aquícola, o termo "piauí" aparece de forma ainda mais abrangente, incluindo também variações como "piapara", "piauíçu" e "piava", sem uma distinção clara dos nomes científicos correspondentes (IBGE, 2023).

Por outro lado, o nome "aracu" é empregado para um conjunto diverso de espécies, incluindo *Schizodon fasciatus* Spix & Agassiz, 1829, *Schizodon vittatus* (Valenciennes, 1850), *Leporinus fasciatus* (Bloch, 1794), *Rhytiodus argenteofuscus* Kner, 1858 e *Rhytiodus microlepis* Kner, 1858, dentre outras espécies (SANTOS; FERREIRA; ZUANON, 2009; VENEZA *et al.*, 2023). Essa questão da categorização de nomenclaturas populares incluindo um conjunto de espécies pode mascarar a riqueza do grupo, levando a desafios na identificação precisa das espécies, o que impacta o diagnóstico da real biodiversidade presente em Anostomidae, a precisão das estatísticas pesqueiras e aquícolas, e ainda a gestão dos estoques naturais. No setor da pesca, por exemplo, as estatísticas costumam categorizar as espécies do gênero *Schizodon* sob o nome "aracu", enquanto *Leporinus* são agrupados como "piauí" (MPA, 2013).

1.1.1. Taxonomia da Família Anostomidae

A família Anostomidae tem sido alvo de inúmeras investigações taxonômicas e filogenéticas ao longo das últimas décadas, principalmente devido às dificuldades em delimitar com precisão as relações evolutivas dentro do grupo. Estudos pioneiros, como o de Sidlauskas e Vari (2008), demonstraram que características morfológicas tradicionalmente utilizadas para

classificar os anostomídeos, como a forma da boca e a estrutura dos dentes, eram altamente homoplásticas, resultando em classificações equivocadas. Diante disso, os autores reforçaram a necessidade de revisões taxonômicas baseadas em abordagens integrativas, combinando dados morfológicos e moleculares para uma delimitação mais precisa das espécies.

Apesar de muitos estudos já terem sido feitos sobre os anostomídeos, ainda há muito a ser descoberto sobre a taxonomia e a filogenia dessa família, uma vez que as relações entre os gêneros e a definição de algumas espécies ainda são incertas. O gênero *Leporinus*, por exemplo, não é um grupo monofilético (RAMIREZ *et al.*, 2016), mas algumas de suas espécies formam clados bem definidos, como o grupo *L. fasciatus* (Bloch, 1794), que inclui *L. altipinnis* Borodin, 1929, *L. bleheri* Géry, 1999, *L. desmotes* Fowler, 1914, *L. enyae* Burns, Chatfield, Birindelli & Sidlauskas, 2017, *L. fasciatus*, *L. jatuncochi* Ovchynnyk, 1971, *L. pearsoni* Fowler, 1940, *L. tigrinus* Borodin, 1929, *L. villasboasorum* Burns, Chatfield, Birindelli & Sidlauskas, 2017 e *L. y-ophorus* Eigenmann, 1922 (BURNS; CHATFIELD; BIRINDELLI; SIDLAUSKAS, 2017; SIDLAUSKAS; VARI, 2008). Esse grupo pode ser diferenciado de outros *Leporinus* pela presença de nove raios ramificados na nadadeira pélvica e de barras verticais escuras no corpo dos indivíduos adultos.

Nos anos seguintes, pesquisas de Britski; Birindelli e Garavello (2012) contribuíram significativamente para a taxonomia do grupo, com a descrição de *Leporinus piavussu* [= *Megaleporinus piavussu* (Britski, Birindelli & Garavello, 2012)], além da redescricao de *Leporinus elongatus* [= *Megaleporinus elongatus* (Valenciennes, 1850)] e *Leporinus obtusidens* [= *Megaleporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837)], espécies da bacia do alto rio Paraná. Pouco tempo depois, Birindelli; Britski e Garavello (2013) publicaram um estudo descrevendo novas espécies de *Leporinus* em bacias do leste do Brasil, ao mesmo tempo em que redescreveram *Leporinus melanopleura* Günther, 1864, esclarecendo aspectos de sua morfologia e distribuição geográfica. Essas investigações reforçaram a complexidade taxonômica do gênero *Leporinus*, levantando questionamentos sobre sua classificação tradicional.

Ramirez; Birindelli e Galetti jr (2017) deram um passo fundamental na sistemática da família ao propor a criação do gênero *Megaleporinus*. A nova designação foi sustentada por análises integrando dados citogenéticos, moleculares e morfológicos, evidenciando diferenças evolutivas significativas entre os grupos. O reconhecimento desse gênero é relativamente recente e realoca 16 linhagens anteriormente atribuídas aos gêneros *Leporinus* e *Hypomasticus* Borodin, 1929. Dessa forma, dez espécies nominais passaram a integrar *Megaleporinus*, tornando necessário o refinamento das classificações taxonômicas existentes. Além disso, pesquisas mais recentes apontam para a existência de uma biodiversidade ainda não

completamente descrita dentro do gênero, evidenciando a necessidade de novos estudos que possam esclarecer a diversidade oculta e os possíveis complexos de espécies presentes no grupo (AVELINO; BRITSKI; FORESTI; OLIVEIRA, 2015; RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR, 2017).

Já para o gênero *Schizodon*, estudos baseados em análises filogenéticas moleculares recentes permitiram a reorganização das espécies em dois grandes grupos monofiléticos: o clado Amazonas e o clado La Plata (RAMIREZ *et al.*, 2020). Essa classificação se baseia principalmente em padrões de coloração, além de dados genéticos que confirmam a relação evolutiva entre as espécies pertencentes a cada um dos agrupamentos (RAMIREZ *et al.*, 2020).

Nos anos mais recentes, Birindelli; Britski e Ramirez (2020) descreveram *Megaleporinus gaiero* Birindelli, Britski & Ramirez, 2020, uma nova espécie da bacia do rio de Contas, no leste do Brasil, destacando a importância da conservação dessas populações. Além disso, Sidlauskas *et al.* (2022) publicaram um estudo enfatizando a necessidade de integrar dados morfológicos e moleculares na taxonomia da família, reforçando que a identificação baseada apenas em características externas pode ser limitada.

A organização taxonômica da família Anostomidae, incluindo o gênero *Megaleporinus*, reflete desafios que vão além da simples catalogação de espécies. Apesar do interesse de inúmeros pesquisadores e dos avanços recentes em estudos sistemáticos, a taxonomia e a filogenia dos gêneros atualmente reconhecidos permanecem desafiadoras (SIDLAUSKAS *et al.*, 2021).

Fica evidente que a classificação desse grupo ainda está em constante revisão, o que reforça a necessidade de novas pesquisas que combinem diferentes fontes de dados para refinar a delimitação taxonômica das espécies.

1.1.2. Importância econômica de Anostomidae

A pesca artesanal possui grande relevância tanto econômica quanto cultural, sendo essencial para a subsistência das comunidades locais, contribuindo para a segurança alimentar e auxiliando na redução da pobreza (GAMARRA *et al.*, 2023). Dentro da família Anostomidae, as espécies de maior porte e abundância formam grandes cardumes, desempenhando um papel significativo na pesca comercial, esportiva e de subsistência, além de estarem frequentemente presentes em mercados e feiras (BATISTA; PETRERE, 2003).

A grande variedade dentro de Anostomidae reflete-se também em sua importância econômica, com muitas de suas espécies amplamente exploradas, tanto na pesca extrativista quanto na aquicultura (BATISTA; PETRERE, 2003).

No Brasil, a pesca extrativista tem sido uma atividade de destaque na captura de espécies da família Anostomidae, com o piau (*Leporinus* spp.) e o aracu (*Schizodon* spp.) apresentando volumes significativos de produção. Dados nacionais indicaram que, em 2011, a captura de aracu alcançou 5.211,3 toneladas, enquanto a do piau foi de 5.544,4 toneladas (MPA, 2013). Ao mesmo tempo, a aquicultura tem se consolidado como uma alternativa sustentável para o fornecimento dessas espécies, com destaque para o cultivo do piau, que registrou uma produção de 4.309,3 toneladas no mesmo período (MPA, 2013). Esse crescimento da aquicultura pode ser observado nos dados mais recentes sobre a produção de peixes da família Anostomidae no Brasil. Segundo o IBGE (2023), a criação de piau, piapara, piauçu e piava totalizou 3.186.455 kg, movimentando um valor de R\$ 38,6 milhões. Esses números evidenciam a relevância econômica dessas espécies, tanto para a pesca quanto para a aquicultura, reforçando sua importância no cenário produtivo nacional.

A região Norte tem se destacado nesse contexto, sendo responsável por cerca de 876.174 kg da produção total, o que corresponde a um montante de R\$ 12,1 milhões. Dentro dessa região, o estado do Pará apresenta uma produção de peixes expressiva, alcançando 219.730 kg e gerando R\$ 3,3 milhões em valor de mercado. Esse desempenho ressalta a importância dos anostomídeos na atividade aquícola do estado e sua contribuição para a economia regional (IBGE, 2023).

Além disso, os dados indicam um crescimento significativo da aquicultura dessas espécies no Pará ao longo dos últimos anos. Entre 2013 e 2022, a produção aumentou 264%, enquanto o valor econômico gerado por essa atividade teve um crescimento ainda mais expressivo, de 753% (FAPESPA, 2023). Esses dados demonstram a expansão do cultivo de peixes da família Anostomidae e a valorização comercial dessa produção, reforçando seu papel na economia pesqueira e aquícola estadual.

1.2. Dados moleculares e aplicações para discriminação e delimitação de espécies

A crescente utilização de dados moleculares tem desempenhado um papel fundamental na taxonomia e na identificação de espécies dentro da família Anostomidae. Estudos recentes demonstram como as análises genéticas permitem a identificação de linhagens crípticas e a revisão da classificação de grupos taxonômicos historicamente problemáticos, que são difíceis

de distinguir com base apenas em características morfológicas (NASCIMENTO; BIRINDELLI; FRAGA; BARROS, 2024; RAMIREZ *et al.*, 2016; RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR, 2017; SIDLAUSKAS *et al.*, 2021).

O uso de dados mitocondriais, especialmente as sequências do gene COI (Citocromo C Oxidase Subunidade I), tem sido útil para a delimitação de espécies, uma vez que apresenta informação gênica mais conservada com uma taxa de evolução moderada, sendo um excelente marcador molecular para análises dessa natureza (SARI; DURAN; SEN; BARDAKCI, 2015). Essa região é eficaz na distinção entre grupos com variação morfológica limitada, como observado em *Leporinus*, onde diferentes linhagens morfológicamente semelhantes foram identificadas como distintas por meio dessa abordagem (RAMIREZ *et al.*, 2016).

Dada a eficiência do COI para a discriminação de diversos animais, incluindo peixes (NASCIMENTO; BIRINDELLI; FRAGA; BARROS, 2024; OLIVEIRA *et al.*, 2024; RAMIREZ *et al.*, 2017), com base nesse gene um sistema de bioidentificação foi proposto por Hebert; Cywinska; Ball e Dewaard (2003), os quais postularam que uma fração de DNA mitocondrial, com cerca de 650 pares de base (pb) a partir da extremidade 5' do gene COI, poderia ser usado como DNA *barcode*. Isso ocorre porque as mudanças nucleotídicas intra e interespecíficas desta porção ocorrem em taxas diferentes, funcionando como um código universal para identificar a maioria das espécies do reino animal.

A utilização do gene COI como DNA *barcode* confirmou ser uma abordagem eficaz e robusta na identificação de espécies animais, inclusive para peixes marinhos (LUTZ *et al.*, 2023; SANTANA *et al.*, 2023) e dulcícolas (DE FREITAS *et al.*, 2024; PEREIRA; HANNER; FORESTI; OLIVEIRA, 2013), uma vez que as diferenças genéticas entre indivíduos da mesma espécie são significativamente menores quando comparadas às diferenças entre espécies distintas, criando um intervalo que minimiza sobreposições e permite uma classificação confiável, mesmo em grupos taxonômicos amplos (HEBERT; CYWINSKA; BALL; DEWAARD, 2003). Além disso, o avanço dessa metodologia foi potencializado pela criação do *Barcode of Life Data Systems* (BOLD), um repositório global que armazena e organiza sequências de DNA *barcode*, facilitando comparações e identificações taxonômicas (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007).

No entanto, a precisão da identificação molecular depende de um banco de dados de referência confiável e completo, pois o uso inconsistente de marcadores genéticos e depósitos equivocados podem impedir a correta identificação com base em sequências de DNA (CHANG; SHAO; LIN; CHIU *et al.*, 2017).

O gene COI também apresenta limitações na identificação de certos grupos de peixes, não apenas no nível populacional, visto que pode ser insuficiente para informar precisamente a variação genética dentro de uma mesma espécie (MORITZ; CICERO, 2004; RUBINOFF, 2006), mas também na discriminação entre espécies distintas. Em alguns casos, como no gênero *Thunnus*, o código de barras de DNA mostrou-se pouco eficaz para diferenciar as espécies, uma vez que a região COI é altamente conservada dentro desse grupo, reduzindo seu poder discriminatório (DÍAZ-ARCE *et al.*, 2016). Dessa forma, é fundamental considerar outras regiões do DNA que possuam diferentes níveis de polimorfismo para aprimorar a identificação e a delimitação das espécies (ARDURA; PLANES; GARCIA-VAZQUEZ, 2013).

Outro fragmento de DNA mitocondrial, a Região Controle (RC), tem se mostrado uma ferramenta valiosa para análises populacionais, devido à sua elevada taxa de mutação, que a torna uma alternativa adequada para investigação da variabilidade genética. Essa característica está relacionada ao fato de a RC ser uma região não codificante, permitindo o acúmulo de mutações sem comprometer funções essenciais. Embora existam restrições decorrentes do padrão de herança mitocondrial, esse marcador tem sido amplamente utilizado em estudos populacionais da ictiofauna, permitindo a identificação de padrões de estrutura genética e conectividade entre populações (BROWN, 2008; DOS SANTOS FREITAS; DA SILVA; SAMPAIO; SCHNEIDER, 2017; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008; SILVA *et al.*, 2018).

Apesar da RC ser tradicionalmente utilizada para estudos de genética de populações, essa região vem se mostrando útil para outras aplicações. Em grupos taxonômicos complexos e com diversificação recente, como algumas espécies de peixes, a utilização de segmentos da RC, que evoluem mais rapidamente, pode ser mais eficaz para a identificação de espécies (GATT; FERGUSON; LISKAUSKAS, 2000). Estudos demonstram que a análise dessa região tem sido aplicada com sucesso na discriminação de espécies de peixes, fornecendo informações valiosas para a taxonomia e conservação desses organismos (EVANGELISTA-GOMES *et al.*, 2020; RAMIREZ, 2015).

1.3. Justificativa

A discriminação precisa das espécies é fundamental para o entendimento da biodiversidade e quando se trata de peixes, a discriminação e correta identificação é indispensável para a gestão eficaz dos recursos pesqueiros e aquícolas.

No caso da família Anostomidae, um grupo de peixes de grande importância econômica e ecológica, equívocos na identificação das espécies podem contribuir para a superexploração, para a dificuldade em promover estratégias eficazes de manejo e, conseqüentemente, para a deficiência na implementação de políticas de conservação adequadas. A falha em reconhecer corretamente as espécies dentro deste grupo pode, ainda, levar a erros na estimativa de seus impactos ecológicos e na compreensão das relações evolutivas entre as espécies.

A utilização de dados moleculares, particularmente marcadores mitocondriais, como o gene COI e a Região Controle, tem sido uma ferramenta aplicável para auxiliar essas questões. Estes marcadores, que apresentam alta taxa de variação em relação à maioria das regiões nucleares, permitem a identificação mais acertada, particularmente em grupos taxonômicos complexos e com alta diversidade, como é o caso da família Anostomidae.

A COI tem sido amplamente utilizado como referência para a identificação de espécies em estudos de biodiversidade, enquanto a Região Controle, com sua taxa de mutação mais elevada, tem se mostrado uma excelente opção para discriminar grupos de espécies com diversificação mais recente. Esses dados moleculares podem contribuir para a resolução de ambigüidades que persistem nas classificações tradicionais, muitas vezes baseadas apenas em morfologia, o que é especialmente relevante em grupos com grande plasticidade morfológica.

Dada a grande diversidade e a complexidade taxonômica da família Anostomidae, a necessidade de estudos taxonômicos que integrem esses marcadores genéticos se torna ainda mais evidente. A aplicação desses métodos pode lançar luz sobre a identificação de espécies próximas e torná-la mais precisa.

Diante desse contexto, no presente estudo pretendeu-se aplicar fragmentos da COI e da RC para investigar a identidade genética de espécies de Anostomidae.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo geral

- Investigar a eficiência de fragmentos mitocondriais para determinação de espécies de Anostomidae.

1.4.2. Objetivos específicos

- Aplicar a ferramenta de DNA *barcode* na identificação de espécies de Anostomidae;

- Avaliar o potencial discriminatório da Região Controle do DNA mitocondrial para espécies de Anostomidae.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Ética no uso animal e autorização para transporte das amostras

As atividades de coleta e transporte dos indivíduos seguiram rigorosamente as normativas éticas e legais aplicáveis à pesquisa científica com animais. As amostras foram coletadas e transportadas com autorizações do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), registradas no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob os números 90994-1 e 85008-1.

Seguindo a captura, a eutanásia de exemplares coletados foi realizada por sobredosagem do anestésico eugenol, conforme recomendado pela RESOLUÇÃO NORMATIVA N° 37, DE 15 DE FEVEREIRO DE 2018 do Ministério da Ciência, Tecnologia.

Além disso, os dados genéticos estão registrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código AEDDBE1.

No caso das amostras obtidas em pisciculturas ou feiras de comercialização de pescado, a partir de indivíduos já mortos, estas foram coletadas por meio de parcerias estabelecidas com piscicultores, pescadores e peixeiros locais. Essas parcerias permitiram a obtenção de amostras de peixes capturados para subsistência ou venda, dispensando licenças específicas.

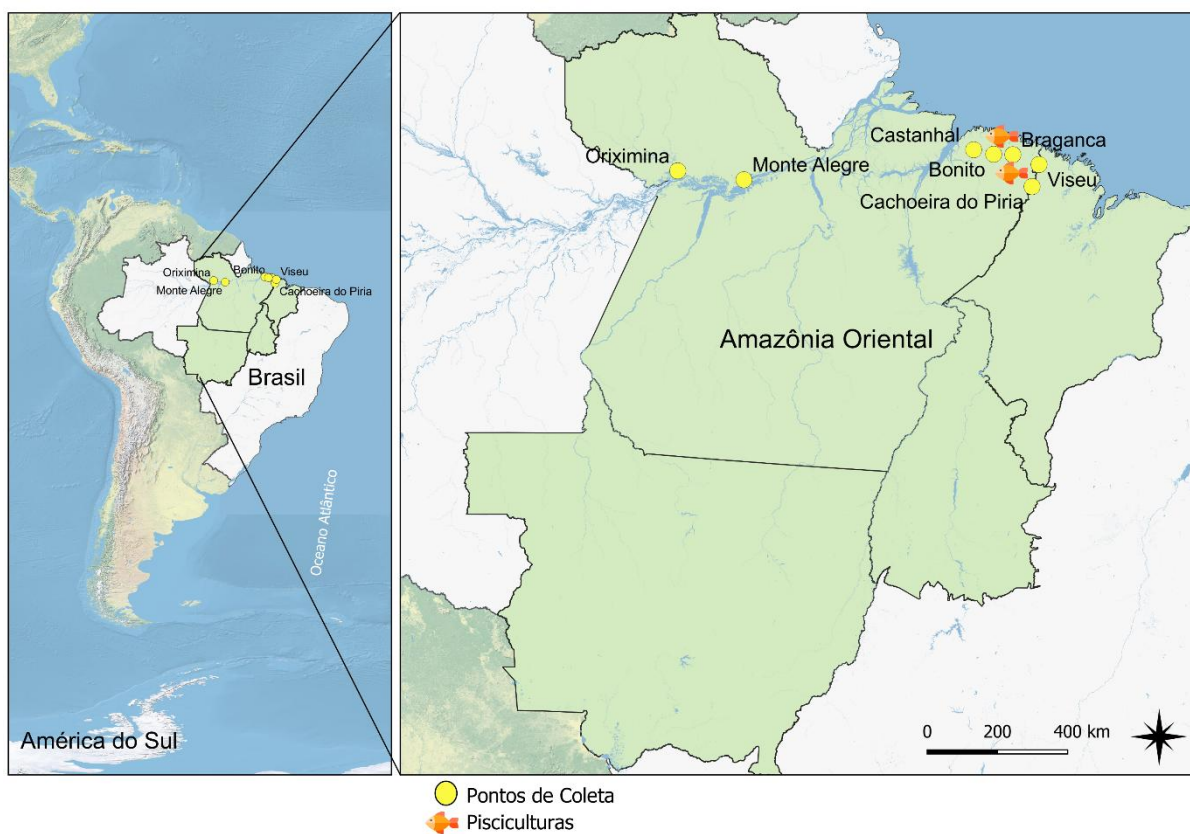
2.2. Locais de coleta e amostragem

As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas em dez localidades distintas, abrangendo indivíduos de população natural e de cultivo, oriundos de diferentes bacias hidrográficas, incluindo as dos rios Caeté, Guamá, Capim, Amazonas, Trombetas e Gurupi (**Tabela 1; Figura 3**).

Tabela 1 – Localidades, pontos de coleta e respectivas bacias hidrográficas. **N:** número de amostras coletadas em cada localidade.

Localidade	Ponto de Coleta	Hidrografia	N
Bragança	Piscicultura Deus Proverá		2
Bragança	Piscicultura Dois Irmãos		2
Castanhal	Piscicultura Estrela Dalva		2
Bonito	Piscicultura Menino Deus		4
Bragança	Feira Livre de Bragança	Rio Caeté	7
Monte Alegre	Mercado Municipal	Rio Amazonas	15
Mocajuba		Rio Caeté	25
Oriximiná	Mercado Municipal	Rio Trombetas	8
São Domingos do Araguaia	Itamoari	Rio Gurupi	61
São Domingos do Araguaia	São José do Gurupi	Rio Gurupi	11

Figura 3 – Mapa de localização contendo os pontos de coleta.



Autor: Charles Ferreira.

Para a obtenção das amostras, foram empregados diversos métodos de captura, de acordo com a característica de cada ambiente. Nas pisciculturas, as coletas foram realizadas por meio de despescas com o auxílio de redes de arrasto nos tanques. Nas coletas realizadas

diretamente nos rios, como no Rio Gurupi, por exemplo, foram utilizados três tipos diferentes de rede de espera, com malhas de um cm, cinco cm e 10 cm entre nós apostos, 100 m de comprimento total e 50 malhas de altura. Em lugares específicos, como pequenas croas e na margem do rio, foram utilizadas tarrafas. Também foram utilizadas redes de arrasto com comprimento de 50 m, dois cm entre nós opostos de malha e um m de altura.

Para as amostras provenientes do Rio Caeté, Rio Amazonas e Rio Trombetas, contamos com a parceria de pescadores e/ou peixeiros locais, o que viabilizou a obtenção das amostras a partir de exemplares que estavam sendo comercializados em feiras e mercados de pescado.

As amostras foram retiradas da nadadeira caudal ou do músculo dorsal dos exemplares, foram armazenadas em microtubos do tipo *ependorf*, devidamente identificados com códigos de tombamento, preservadas em etanol 70% e congeladas em freezer a -20°C, para posteriores procedimentos laboratoriais.

Os indivíduos foram fotografados e alguns exemplares foram fixados com Formol 10% e preservados em etanol 70%, como exemplares testemunho depositados na Coleção Zoológica/Pescado (CZP), no Laboratório de Genética Aplicada, Instituto de Estudos Costeiros, Universidade Federal do Pará, *Campus* de Bragança.

2.3. Isolamento, amplificação e sequenciamento do material genético

O DNA genômico total das amostras foi extraído do tecido biológico utilizando os protocolos com Kit Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA), de acordo com as recomendações do fabricante, e precipitação por NaCl, adaptado de Aljanabi e Martinez (1997). O DNA genômico total obtido foi quantificado (ng/μL) no espectrofotômetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2.000.

Este DNA isolado e quantificado foi utilizado como molde para a realização da amplificação das regiões alvo, através de Reações em Cadeia da Polimerase (PCR), preparadas em um volume final de 15μL, contendo: 2,2μL de DNTP (1,25mM), 1,4μL de tampão buffer (10x), 0,6μL de MgCl₂ (50mM), 0,6μL de cada iniciador (50ng/μL), aproximadamente 100ng de DNA total, 0,1μL da enzima Taq DNA polimerase (5U/μL) e água purificada para completar o volume final da reação.

A região *barcode* do gene COI foi amplificada utilizando os iniciadores FishF1 (5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3') e FishR1 (5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3') e as condições de amplificação adaptadas de

WARD *et al.* (2005): desnaturação inicial a 94° C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos com desnaturação a 94° C durante 45 segundos, hibridização a 59° C durante 30 segundos, extensão a 72° C por 1 minuto e uma extensão final a 72° C durante 10 minutos.

Para a Região Controle, os iniciadores utilizados foram DloopA (5'-TTCCACCTCTAACTCCCAAAGCTAG-3') e DloopG (5'-CGTCGGATCCCATCTTCAGTGTTATGCTT-3') descritos por Lee; Conroy; Howell e Kocher (1995), sob as condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos com desnaturação a 94°C durante 30 segundos, hibridização a 57° C durante 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos; seguidos por uma extensão final a 72° C durante 7 minutos.

Após as PCRs, as amostras positivas foram purificadas com polietileno glicol (PEG 8000), seguindo o protocolo descrito por (PAITHANKAR; PRASAD, 1991), em seguida foram sequenciadas pelo método didesoxiterminal (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), com os reagentes do *Kit Big Dye (ABI PrismTMDye Terminator Cycle Sequencing Reading Reaction – Thermo Fisher)*. Os produtos precipitados foram então submetidos à eletroforese no sequenciador automático de capilar ABI 3500 (*Thermo Fisher*).

2.4. Análises computacionais

2.4.1. Montagem do banco de dados

Foi montado um banco de sequências para cada fragmento mitocondrial alvo, nos quais as sequências obtidas foram avaliadas e editadas no programa BIOEDIT (HALL, 1999), e então submetidas ao alinhamento múltiplo de forma automática através do aplicativo CLUSTAL W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) implementado no BIOEDIT. Novamente, foram efetuadas correções em posições das sequências em que existiam erros ou dúvidas relacionadas ao tipo de nucleotídeo existente. Para o banco de sequências de COI, verificou-se a ausência de inserções, deleções e stop códons.

2.4.2. Identificação molecular e morfológica das espécies

Para o processo de identificação dos espécimes, primeiramente foi gerada uma lista de haplótipos a partir do banco total de sequências de cada fragmento alvo, no programa DNAsp v6 (ROZAS *et al.*, 2017). A partir da lista de haplótipos, foi elaborada um banco reduzido de

sequências para cada fragmento estudado, representando todos os haplótipos presentes entre os indivíduos amostrados.

Uma sequência representante de cada haplótipo dos fragmentos de COI e RC foi comparada aos bancos públicos de sequências disponíveis na biblioteca de referência do *GenBank* (NCBI - *National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), a partir da aplicação da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), no campo “*nucleotide blast*” (ALTSCHUL *et al.*, 1990); para COI utilizou-se também o BOLD (*Barcode of Life Data Systems* v4- <http://www.boldsystems.org/>) (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007), campo *Barcode ID*. A identificação foi realizada considerando as sequências com maior valor de similaridade ($\geq 98\%$).

Além da comparação com as sequências disponíveis nas bibliotecas públicas de referência, foi verificada a discriminação das espécies a partir de análise filogenética, baseada na topologia da árvore. Para isso, sequências disponíveis no NCBI/BOLD mais similares às sequências geradas nesse estudo foram adicionadas aos bancos reduzidos, em conjunto com sequências representantes dos haplótipos. Também foram incluídas sequências de *Semaprochilodus insignis* (Jardine, 1841) e *Prochilodus nigricans* Spix & Agassiz, 1829, como grupo externo.

Para COI, construiu-se uma árvore de Agrupamento de Vizinhos (NJ), utilizando o programa MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018) com modelo evolucionário de Kimura2-Parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980). A significância dos agrupamentos das árvores foi estimada pela análise de *Bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985), gerada a partir de 1000 pseudorréplicas.

Além da NJ para COI, também foram construídas árvores de Inferência Bayesiana (IB), para isso cada conjunto de dados foi convertido em um arquivo .xml usando o BEAUti v. 1.8.4 (DRUMMOND; SUCHARD; XIE; RAMBAUT, 2012), que foi executado no BEAST v. 1.8.4 (DRUMMOND; SUCHARD; XIE; RAMBAUT, 2012), com base nos modelos evolutivos HKI+I+G, previamente selecionado para COI e HKY+G, indicado para RC, pelo JMODELTEST v2.1.10 (DARRIBA; TABOADA; DOALLO; POSADA, 2012; GUINDON; GASCUEL, 2003), de acordo com o *Bayesian information criterion* (BIC). Para ambos os fragmentos foram usados relógio estrito e processo de especiação de Yule. A probabilidade posterior foi estimada com base em 5.10^7 de gerações, com amostragem de árvores a cada 10.000 gerações e *burn-in* de 10%. Os arquivos .log foram avaliados no Tracer v1.7.2 (RAMBAUT *et al.*, 2018), onde verificou-se a convergência das cadeias, que foi considerada adequada ao apresentar valores > 200 ESS (*Effective Sample Size*). Em seguida, as árvores foram sumarizadas no TreeAnnotator v.1.8.4 (DRUMMOND; SUCHARD; XIE; RAMBAUT,

2012), visualizadas no FigTree (RAMBAUT, 2018) e editadas no *software* Inkscape (<https://inkscape.org/>).

Para a identificação morfológica, foi utilizado chaves dicotômicas de identificação (OHARA; LIMA; SALVADOR; ANDRADE, 2017; RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR, 2017; SANTOS, 1980; SANTOS; JEGÚ, 1996). Esse método permitiu a distinção dos espécimes por meio de características como o formato da boca, a morfologia dentária, o número de escamas na linha lateral e os padrões de coloração no corpo.

3. RESULTADOS

3.1. Identificação molecular

Foram obtidos 744 pares de base (pb) de 127 espécimes para o fragmento da Região Controle, a partir do qual foi montado o banco reduzido representando os 56 haplótipos recuperados. Para isso, foram inseridos os haplótipos únicos e para aqueles que eram compartilhados por mais indivíduos, foram selecionados até três, totalizando 96 sequências. Para COI, o fragmento analisado tem comprimento de 614 pb de 120 espécimes, sendo o banco reduzido composto de 27 indivíduos representantes de todos os 17 haplótipos encontrados.

Para identificar as espécies presentes no banco, uma sequência de cada haplótipo foi comparada aos bancos públicos. A análise das sequências com base no gene COI revelou alta similaridade entre diferentes espécies, tanto no NCBI quanto no BOLD, dificultando a identificação precisa dos espécimes.

Os indivíduos ANOGU30, ANOGU31, ANOGU32 (haplótipo 4); ANOGU17; ANOGU23, ANOGU76 (haplótipo 5); ANOGU112 (haplótipo 6), ANOGU117 (haplótipo 7), apresentaram similaridade acima de 98% com as sequências de *Leporinus piau* Fowler, 1941 (OP782375), *Leporinus venerei* Britski & Birindelli, 2008 (OP782385, KF569001, OP782388), *Leporinus trimaculatus* Garavello & Santos, 1992 (KF568999), *Leporinus* cf. *parae* Eigenmann, 1907 (MK677847), *L. friderici* (OR732991) e *L. cf. friderici* (MF664243) (**Tabela suplementar 1**).

Já os haplótipos representados pelos indivíduos ANOCT128, ANOCT01, ANOCT03, ANOCT137, ANOGU101 e ANOGU88, apresentaram similaridade acima de 98% com as sequências de *L. cf. friderici*, *L. piau*, *L. friderici*, *Leporinus* sp., *L. gossei* e *L. lacustris* (**Tabela suplementar 1**).

Essa incongruência também ocorreu para os haplótipos que incluíram ANOFE68, ANOFE69 e ANOFE70, identificados como *S. fasciatus* e *Schizodon dissimilis* (Garman, 1890) com 100% de similaridade em ambos os bancos públicos. Essa problemática foi recorrente ao longo das análises (**Tabela suplementar 1**).

Para RC, as sequências disponíveis no GenBank mais próximas às geradas no estudo, possuíam em torno de 88,95% a 94,24% de similaridade com as espécies *Hypomasticus* cf. *pachycheilus* (Britski, 1976), *Leporinus maculatus* Müller & Troschel, 1844, *Leporinus desmotes* Fowler, 1914 e *Leporinus affinis* Günther, 1864, o que inviabilizou as identificações com base nesse fragmento, uma vez que não há depósitos de sequências nos bancos públicos da região alvo suficientes para as espécies da família Anostomidae.

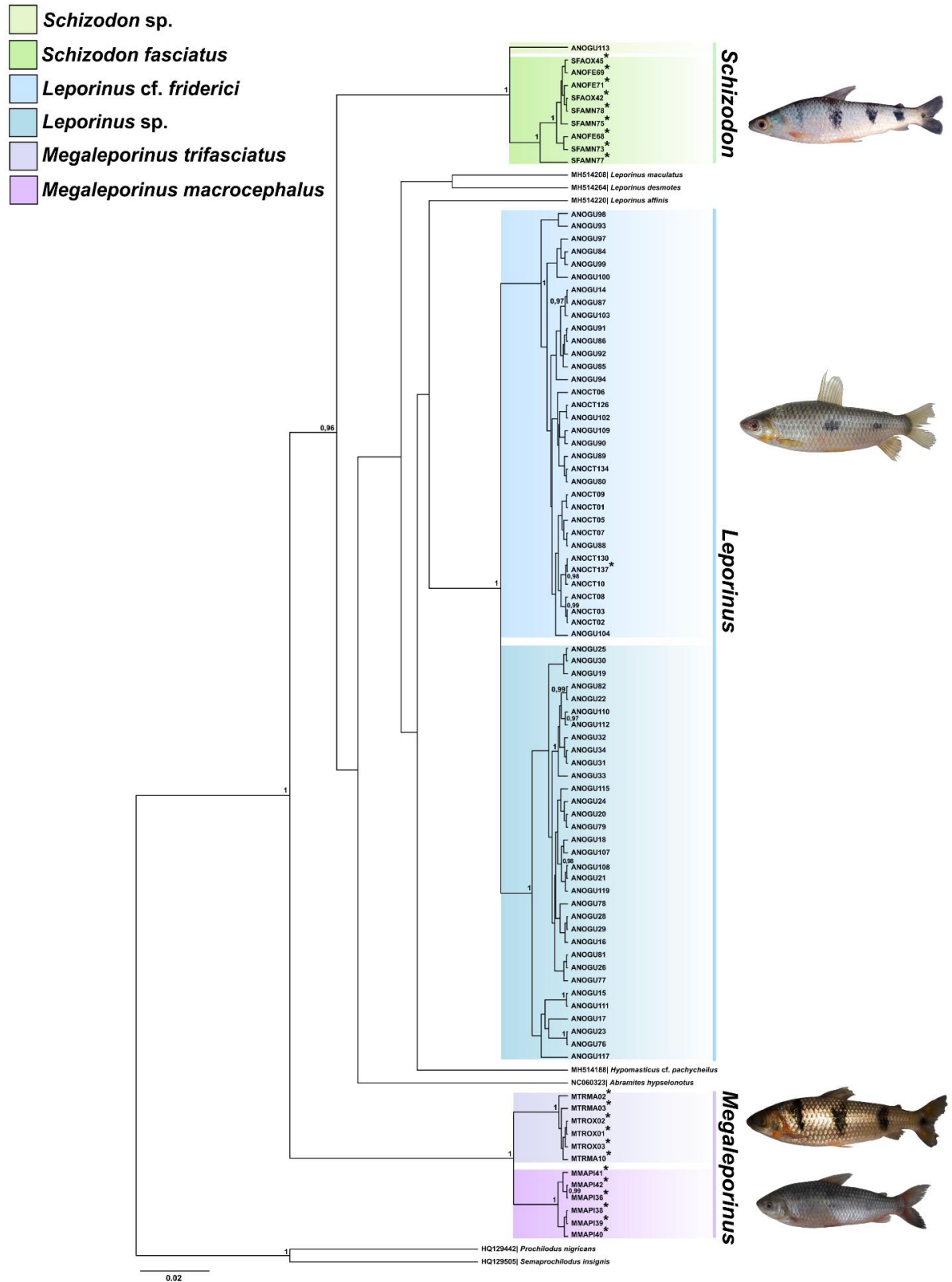
As topologias da IB e NJ de COI coincidiram e optamos por representar apenas a primeira. Ambas demonstraram baixa resolução para discriminação das espécies e até mesmo de gêneros. Apenas *Megaleporinus macrocephalus* (Garavello & Britski, 1988) pôde ser diferenciada das demais espécies, ocupando a posição de grupo irmão de *Abramites hypselonotus* (Günther, 1868), enquanto os indivíduos de *M. trifasciatus* (Steindachner, 1876) agruparam com diversas espécies de *Schizodon* (**Figura 4**).

As amostras do gênero *Leporinus* formaram dois clados que agruparam com sequências de diferentes espécies (*L. veneri*, *L. trimaculatus*, *L. cf. parae*, *L. friderici*, *L. cf. friderici*, *L. piau* e *L. lacustres*). As sequências referentes a *L. friderici* e *L. cf. friderici* estiveram presentes em ambos os clados (**Figura 4**).

Por outro lado, para RC, a IB revelou melhor resolução, com a discriminação de três clados principais, indicando os gêneros entre os indivíduos amostrados, *Leporinus*, *Megaleporinus* e *Schizodon* (**Figura 5**), em conformidade com a identificação morfológica.

O clado de *Leporinus* é o mais diverso, subdividido em múltiplos agrupamentos. Outro clado corresponde ao gênero *Schizodon*, e é aparentemente constituído por duas espécies, uma delas identificada como *S. fasciatus* e outra, representada pelo indivíduo ANOGU113, cuja identificação não pôde ser confirmada. *Megaleporinus* também é representado por um clado com duas espécies, *M. macrocephalus* e *M. trifasciatus* (**Figura 5**).

Figura 5 – Árvore de Inferência Bayesiana (IB) utilizando a Região Controle de espécies de Anostomidae. Os valores sobre os ramos indicam o suporte estatístico em probabilidade a *posteriori*. *: Identificado morfologicamente.



3.2. Identificação morfológica

Após a aplicação da chave de identificação foi possível determinar quatro espécies. A amostra ANOCT137 foi classificada como *L. friderici*. Os espécimes ANOFE68, ANOFE69 e ANOFE70 foram identificados como *S. fasciatus*, formando um *cluster* distinto na IB com a Região Controle (**Figura 5**). Já os indivíduos identificados como *M. trifasciatus* e *M. macrocephalus* formaram clados reciprocamente monofiléticos. Para os clados não identificados, não há indivíduos testemunho depositados, o que inviabilizou a aplicação de chaves morfológicas.

4. DISCUSSÃO

A família Anostomidae é uma das mais diversas e taxonomicamente dinâmicas entre os peixes de água doce neotropicais. À medida que apresenta uma grande diversidade de espécies, também existem dificuldades em estabelecer relações claras entre elas (SIDLAUSKAS *et al.*, 2022). Esse desafio ocorre principalmente porque a taxonomia desse grupo tem sido historicamente baseada em características morfológicas relacionadas à dieta (SIDLAUSKAS *et al.*, 2022). No entanto, essas características são altamente homoplásticas, dificultando a delimitação precisa dos táxons.

As características externas usadas para definir os gêneros, como a forma da boca e a morfologia dos dentes, são suscetíveis à convergência evolutiva, ou seja, podem evoluir independentemente em diferentes linhagens, levando a classificações equivocadas (SIDLAUSKAS *et al.*, 2022). Um exemplo desse problema foi evidenciado por Kolmann *et al.* (2021), que demonstraram que diversos gêneros de serrasalmídeos, tradicionalmente agrupados com base na estrutura dos dentes, na verdade não compartilham um ancestral comum direto. Além disso, muitos estudos documentaram a convergência dessas características em grupos de peixes não relacionados, como ciclídeos (HULSEY *et al.*, 2008; RÜBER; ADAMS, 2001), ciprinídeos (QI *et al.*, 2012) e teraponídeos (DAVIS; BETANCUR-R, 2017).

Dessa forma, embora chaves de identificação baseadas na morfologia sejam úteis para a distinção de espécies, elas apresentam algumas limitações. Em muitos casos, apenas características morfológicas não são suficientes para uma identificação precisa, sendo necessário o uso de ferramentas moleculares para complementar a análise. Esse enfoque integrativo, combinando dados morfológicos e genéticos, tem se mostrado essencial para a taxonomia de grupos complexos, como os anostomídeos (SIDLAUSKAS *et al.*, 2021).

Estudos filogenéticos baseados em dados moleculares (RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI JR, 2017) e morfológicos (SIDLAUSKAS; VARI, 2008) revelaram vários casos de convergência entre os anostomídeos. Ramirez; Birindelli e Galetti Jr (2017) relataram, por exemplo, que *Megaleporinus garmani* (Borodin, 1929) e *Megaleporinus reinhardti* (Lütken, 1875) são espécies proximamente relacionadas, mas possuem estruturas bucais distintas. Por outro lado, *Hypomasticus mormyrops* (Steindachner, 1875) e *Hypomasticus pachycheilus* (Britski, 1976) apresentam morfologias bucais semelhantes, apesar de estarem distantes filogeneticamente. Além disso, Sidlauskas e Vari (2008) também discutiram que a orientação da boca evoluiu de forma convergente em *Schizodon nasutus* Kner, 1858 e *Hypomasticus* Borodin, 1929, reforçando que características morfológicas isoladas podem ser inadequadas para inferir relações evolutivas dentro da família Anostomidae.

Dentro desse contexto, a utilização de fragmentos de DNA para auxiliar a discriminação e identificação de anostomídeos é providencial, e por isso nesse trabalho testamos a eficiência do gene COI e da Região Controle mitocondrial para essa finalidade.

4.1. Identificação de anostomídeos com base em COI é ambígua

Ao analisar as sequências do gene COI em bancos de dados públicos, verificou-se que alguns haplótipos apresentaram incongruências nas identificações tanto no NCBI quanto no BOLD, impossibilitando a atribuição a nível de espécie com segurança. Os indivíduos ANOCT01, ANOCT03, ANOCT137 (haplótipo 1), por exemplo, foram associados a quatro espécies distintas no NCBI, sendo que duas delas (*L. piau* e *L. cf. friderici*) apresentaram 100% de similaridade. No BOLD, observou-se um padrão semelhante, com a associação a quatro espécies distintas, das quais *L. cf. friderici* e *L. sp.* também atingiram 100% de similaridade, indicando que a diferenciação molecular entre essas espécies pode ser desafiadora com base apenas nesse fragmento.

Resultados semelhantes foram encontrados para os haplótipos 2, 3, 4, 5, 6 e 7, evidenciando a complexidade na separação e identificação confiável das espécies de *Leporinus*. Estudos recentes também apontam essa problemática, destacando que a distinção entre *L. piau* e *L. friderici* é dificultada tanto pela grande semelhança morfológica entre as espécies, quanto pelo fato de *L. friderici* estar sendo cada vez mais reconhecido como um complexo de espécies (NASCIMENTO *et al.*, 2023; NASCIMENTO; BIRINDELLI; FRAGA; BARROS, 2024; RAMIREZ *et al.*, 2016; SIDLAUSKAS; VARI, 2012; SILVA-SANTOS; RAMIREZ; GALETTI JR; FREITAS, 2018)

Essa dificuldade taxonômica foi agravada pela descrição original de Fowler (1941), que utilizou um espécime-tipo do rio Salgado, na bacia do Jaguaribe, mas incluiu um parátipo proveniente do rio Jatobá, na bacia do São Francisco, possivelmente identificado de maneira equivocada, o que levou à identificação da maioria dos espécimes de *Leporinus* do São Francisco como *L. piau* (DE CARVALHO *et al.*, 2011; GARAVELLO, J. C.; BRITSKI, H. A., 2003).

Essas problemáticas repercutem em outras espécies de *Leporinus*. Silva-Santos *et al.* (2018) identificaram um cenário complexo em *L. cf. friderici*, em que os indivíduos coletados como *L. friderici* nas bacias do Escudo Brasileiro divergem da espécie-tipo *L. friderici*. Além disso, foi observado a existência de mais dois clados denominados *L. cf. friderici sensu stricto* e um clado sem nome, que inclui espécies crípticas ainda não descritas e atualmente designadas como *L. cf. friderici*.

Posteriormente, Nascimento *et al.* (2023) recuperaram um cenário semelhante a Silva-Santos *et al.* (2018). Contudo, identificaram dentro do clado sem nome, a existência de quatro subclados onde, com base na morfologia, foi identificado que um deles referia-se a *L. veneri*. Apesar deste achado, não podemos deixar de considerar os dados de Silva-Santos *et al.* (2018), que afirmam que os indivíduos de *L. veneri* se enquadram morfologicamente na descrição de *L. cf. friderici* (clado sem nome).

As incongruências na identificação também foram observadas nos haplótipos que retornaram tanto como *S. fasciatus* quanto como *Schizodon dissimilis* (Garman, 1890), uma vez que ambas as espécies apresentaram 100% de similaridade nos bancos de dados BOLD e NCBI, refletindo essa ambiguidade na topologia da árvore filogenética (**Figura 4**). Essa imprecisão na identificação pode estar relacionada à similaridade morfológica entre as espécies, conforme discutido por Garavello e Britski (2019), que destacaram a dificuldade na distinção entre espécies do gênero *Schizodon* apenas com base na coloração e na morfologia externa. Os autores redescreveram *S. dissimilis* e reforçaram que sua diferenciação em relação a congêneres, como *S. fasciatus*, requer uma análise detalhada de múltiplos caracteres morfológicos.

Além disso, os indivíduos identificados como *M. trifasciatus* foram agrupados com *S. fasciatus*. Esse resultado pode indicar um processo de diversificação recente, formando um grupo intimamente relacionado, possivelmente composto por espécies crípticas, o que evidencia incertezas taxonômicas frequentes (RAMIREZ *et al.*, 2017). Dessa forma, a resolução do gene COI mostrou-se limitada, até mesmo para a discriminação entre gêneros, visto que a topologia da árvore de IB revelou uma relação mais próxima entre *M. macrocephalus* e *A. hypselonotus* do que entre *M. macrocephalus* e *M. trifasciatus*.

A ineficiência do gene COI na discriminação de espécies de peixes já foi observada em diferentes grupos, como no gênero *Thunnus*, no qual essa região mitocondrial é altamente conservada e devido a isso reduziu seu poder discriminatório, dificultando a distinção entre espécies (DÍAZ-ARCE *et al.*, 2016). Devido a esse tipo de limitação do gene COI para determinados grupos de peixes, estudos como o de Evangelista-Gomes *et al.* (2020), reportam a RC como um *barcode* alternativo eficaz para a discriminação de espécies.

Portanto, nossos resultados indicam que o uso do marcador COI não é suficiente para separar e identificar de forma precisa espécies de anostomídeos, e isso pode influenciar inferências filogenéticas, gerando inconsistências.

4.2.Discriminação de espécies de Anostomidae a partir da RC

A análise da RC foi capaz de discriminar claramente espécies incluídas na filogenia, indicando que esse marcador possui potencial de ser um novo *barcode* para Anostomidae, o que já vem sendo observado em estudos para outros peixes. Evangelista-Gomes *et al.* (2020) destacaram a eficácia da RC na discriminação de espécies de Lutjanidae, enquanto Ramirez (2015) demonstrou que a região *D-loop* foi mais eficiente do que o gene COI na identificação de espécies da família Scombridae, especialmente no gênero *Thunnus*. Da mesma forma, Terencio (2009) analisou a variabilidade genética de *Nannostomus eques* na bacia do rio Negro e identificou duas unidades evolutivas distintas com base na RC, sugerindo que essa região pode ser útil na identificação de espécies crípticas.

Determinadas inconsistências observadas na discriminação de espécies a partir da COI foram resolvidas na topologia da IB com a Região Controle, por exemplo, com relação aos exemplares de *M. trifasciatus* e *S. fasciatus*, em que ao utilizar o gene COI, ambas as espécies, mesmo pertencendo a gêneros distintos, foram agrupadas no mesmo clado, indicando que esse marcador não foi eficiente para separá-las, enquanto que com a utilização da RC foi possível separar espécies e os gêneros *Schizodon*, *Leporinus* e *Megaleporinus*.

A separação observada na árvore filogenética baseada na RC está em conformidade com a diferenciação morfológica entre *M. trifasciatus* e *S. fasciatus*, em que essas espécies se distinguem por: I) Padrão de coloração corporal: *M. trifasciatus* exibe três faixas transversais escuras ao longo do corpo, enquanto *S. fasciatus* apresenta quatro faixas transversais escuras (GARAVELLO *et al.*, 2021); II) Forma da boca: *M. trifasciatus* possui uma boca subterminal ou inferior, adaptada para se alimentar no fundo, ao passo que *S. fasciatus* apresenta uma boca terminal, adequada para alimentação em níveis mais elevados na coluna d'água (GARAVELLO

et al., 2021) e III) Morfologia dos dentes: *M. trifasciatus* tem dentes tricúspides, enquanto *S. fasciatus* possui dentes bicúspides (GARAVELLO *et al.*, 2021).

A RC é tradicionalmente utilizada para avaliar a variabilidade genética e estrutura de populações de peixes, incluindo os Anostomídeos (MARTINS; WASKO; OLIVEIRA e FORESTI (2003). O uso desse fragmento mitocondrial em estudos de genética de populações se dá por características intrínsecas. Sua elevada taxa de mutação, aliada à ausência de pressões seletivas, contribui para sua alta variabilidade genética, tornando-a um marcador altamente polimórfico. Essa variabilidade é observada tanto em sua porção hipervariável, amplamente documentada na literatura (GARBER, 2001; GARBER; TRINGALI; STUCK, 2004; GOMES; SAMPAIO; SCHNEIDER, 2012), quanto em regiões tradicionalmente consideradas menos variáveis.

No entanto, devido a essa elevada taxa mutacional e alta variação da RC, essa região pode ser uma ferramenta eficaz para diferenciar espécies com divergência recente. No caso dos Anostomídeos, há indícios de que esse grupo tenha passado por eventos de diversificação recente, o que pode dificultar a distinção entre espécies com base em outros marcadores moleculares. Esse cenário é reforçado pelo estudo de Silva-Santos *et al.* (2018), que sugere que algumas dessas espécies formam um grupo intimamente relacionado, possivelmente composto por espécies crípticas, evidenciando incertezas taxonômicas frequentes (RAMIREZ *et al.*, 2017). Dessa forma, sugerimos que a utilização desse marcador pode oferecer uma resolução aprimorada na identificação de espécies de Anostomidae.

Alguns estudos já suportam o uso da RC mitocondrial para a discriminação inequívoca de espécies muito semelhantes geneticamente devido à diversificação recente. No estudo conduzido por Evangelista-Gomes *et al.* (2020), a RC demonstrou ser uma ferramenta eficiente para distinção de espécies de Lutjanidae, possibilitando a separação das espécies em clados monofiléticos nas análises filogenéticas conduzidas por diferentes métodos. Além disso, um *Barcode gap* expressivo foi identificado para todas as espécies analisadas, reforçando a utilidade desse marcador na delimitação taxonômica.

Apesar da árvore IB construída a partir da RC se mostrar eficiente na discriminação de espécies de Anostomidae, a identificação molecular com base nesse fragmento tornou-se inviável devido à ausência de depósitos de sequências dessa região nos bancos públicos para muitas espécies da família.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para avançar na resolução das questões taxonômicas e filogenéticas dentro da família Anostomidae, é essencial ampliar os estudos que integrem dados morfológicos e moleculares. A correta discriminação e identificação das espécies é um aspecto fundamental, pois imprecisões nesse processo resultam em classificações taxonômicas equivocadas e na perpetuação de incertezas filogenéticas.

Neste contexto, a utilização de marcadores moleculares tem se mostrado uma ferramenta valiosa, e a RC surge como uma alternativa promissora para a delimitação de espécies com divergência recente. No entanto, a escassez de sequências dessa região nos bancos de dados públicos limita a eficácia das análises comparativas, reforçando a necessidade de ampliar o número de sequências disponíveis para espécies de Anostomidae corretamente identificadas.

A ampliação do uso desse marcador pode contribuir significativamente para a construção de uma taxonomia mais robusta e precisa, promovendo um melhor entendimento das relações evolutivas dentro desse grupo. Dessa forma, o avanço das pesquisas na área poderá proporcionar maior clareza na identificação das espécies, reduzindo imprecisões filogenéticas e permitindo um arranjo mais confiável das linhagens dentro da família Anostomidae.

Para isso, é necessário que sejam desenvolvidos estudos que incluam maior amostragem, abrangendo diferentes regiões geográficas, para análise das distâncias genéticas intra e interespecíficas, assim como entre e dentro dos gêneros, para avaliar os limites internos e entre táxons, no sentido de determinar o efetivo poder discriminatório e filogenético da RC para Anostomidae.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, J. S.; TAGLIACOLLO, V. A.; DAGOSTA, F. Diversification of Neotropical freshwater fishes. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 51, n. 1, p. 27-53, 2020.

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic acids research**, 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ARDURA, A.; PLANES, S.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Applications of DNA barcoding to fish landings: authentication and diversity assessment. **ZooKeys**, n. 365, p. 49, 2013.

- AVELINO, G. S.; BRITSKI, H. A.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Molecular identification of *Leporinus* from the south portion of South America. **DNA Barcodes**, 3, n. 1, p. 98-109, 2015.
- BALASSA, G. C.; FUGI, R.; HAHN, N. S.; GALINA, A. B. Dieta de espécies de Anostomidae (Teleostei, Characiformes) na área de influência do reservatório de Manso, Mato Grosso, Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**, 94, p. 77-82, 2004.
- BARBIERI, G.; SANTOS, E. P. D. Análise comparativa do crescimento e de aspectos reprodutivos da piava, *Leporinus friderici* (Bloch, 1794)(Osteichthyes, Anostomidae) da represa do Lobo e do rio Moji-Guaçu, Estado de São Paulo. **Ciência e Cultura**, 40, n. 7, p. 693-697, 1988.
- BATISTA, V. D. S.; ISAAC, V. J.; VIANA, J. P. Exploração e manejo dos recursos pesqueiros da Amazônia. **A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira**, p. 63-151, 2004.
- BATISTA, V. D. S.; PETRERE, M. Characterization of the commercial fish production landed at Manaus, Amazonas State, Brazil. **Acta Amazonica**, 33, n. 1, p. 53-66, 2003.
- BIRINDELLI, J.; BRITSKI, H. Two new species of *Leporinus* (Characiformes: Anostomidae) from the Brazilian Amazon, and redescription of *Leporinus striatus* Kner 1858. **Journal of fish Biology**, 83, n. 5, p. 1128-1160, 2013.
- BIRINDELLI, J. L.; BRITSKI, H. A.; GARAVELLO, J. C. Two new species of *Leporinus* Agassiz (Characiformes: Anostomidae) from eastern basins of Brazil, and redescription of *L. melanopleura* Günther. **Neotropical Ichthyology**, 11, n. 1, p. 9-23, 2013.
- BIRINDELLI, J. L.; BRITSKI, H. A.; RAMIREZ, J. L. A new endangered species of *Megaleporinus* (Characiformes: Anostomidae) from the Rio de Contas basin, eastern Brazil. **Journal of Fish Biology**, 96, n. 6, p. 1349-1359, 2020.
- BIRINDELLI, J. L.; SIDLAUSKAS, B. L. Preface: How far has Neotropical Ichthyology progressed in twenty years? **Neotropical Ichthyology**, 16, n. 03, p. e180128, 2018.
- BOTERO, J. B.; LOURENÇO, R. C. G.; RODRIGUES-FILHO, C. A. S.; RAMOS, T. P. A. *et al.* **Lista de Peixes Continentais do Ceará**. Fortaleza, 2021. Disponível em: <https://www.sema.ce.gov.br/fauna-do-ceara/peixes/>. Acesso em: 16 Jan. 2025.
- BRITSKI, H. A.; BIRINDELLI, J. L. O.; GARAVELLO, J. C. A new species of *Leporinus* Agassiz, 1829 from the upper Rio Paraná basin (Characiformes, Anostomidae) with redescription of *L. elongatus* Valenciennes, 1850 and *L. obtusidens* (Valenciennes, 1837). **Papéis Avulsos de Zoologia**, 52, p. 441-475, 2012.
- BROWN, K. Fish mitochondrial genomics: sequence, inheritance and functional variation. **Journal of fish biology**, 72, n. 2, p. 355-374, 2008.
- BURNS, M. D.; CHATFIELD, M.; BIRINDELLI, J. L.; SIDLAUSKAS, B. L. Systematic assessment of the *Leporinus desmotes* species complex, with a description of two new species. **Neotropical Ichthyology**, 15, p. e160166, 2017.
- BURNS, M. D.; FRABLE, B. W.; SIDLAUSKAS, B. L. A New Species of *Leporinus* (Characiformes: Anostomidae), from the Orinoco Basin, Venezuela. **Copeia**, 2014, n. 2, p. 206-214, 2014.

CHANG, C. H.; SHAO, K. T.; LIN, H. Y.; CHIU, Y. C. *et al.* DNA barcodes of the native ray-finned fishes in Taiwan. **Molecular Ecology Resources**, 17, n. 4, p. 796-805, 2017.

DAGOSTA, F. C.; DE PINNA, M. The fishes of the Amazon: distribution and biogeographical patterns, with a comprehensive list of species. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 2019, n. 431, p. 1-163, 2019.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, 9, n. 8, p. 772-772, 2012.

DAVIS, A. M.; BETANCUR-R, R. Widespread ecomorphological convergence in multiple fish families spanning the marine–freshwater interface. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 284, n. 1854, p. 20170565, 2017.

DE CARVALHO, D. C.; OLIVEIRA, D. A.; POMPEU, P. S.; LEAL, C. G. *et al.* Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. **Mitochondrial Dna**, 22, n. sup1, p. 80-86, 2011.

DE FREITAS, E. A.; DOS SANTOS, D. B.; MORAES FERREIRA, C. S.; SILVA-OLIVEIRA, C. *et al.* Integrative use of DNA barcode and morphology reveal high level of diversity in the ornamental fish on the lower Amazon basin. **PloS one**, 19, n. 12, p. e0316455, 2024.

DE GODOY, M. Peixes do Brasil, subordem Characoidei, bacia do Rio Mogi Guassu-v. 1-4. 1975.

DÍAZ-ARCE, N.; ARRIZABALAGA, H.; MURUA, H.; IRIGOIEN, X.; RODRÍGUEZ-EZPELETA, N. RAD-seq derived genome-wide nuclear markers resolve the phylogeny of tunas. **Molecular phylogenetics and evolution**, 102, p. 202-207, 2016.

DOS SANTOS FREITAS, A.; DA SILVA, R.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H. The mitochondrial control region reveals genetic structure in southern kingcroaker populations on the coast of the Southwestern Atlantic. **Fisheries Research**, 191, p. 87-94, 2017.

DOS SANTOS, G. M.; ZUANON, J. *Leporinus amazonicus*, a new anostomid species from the Amazon lowlands, Brazil (Osteichthyes: Characiformes). **Zootaxa**, 1815, n. 1, p. 35–42-35–42, 2008.

DRUMMOND, A. J.; SUCHARD, M. A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular biology and evolution**, 29, n. 8, p. 1969-1973, 2012.

EVANGELISTA-GOMES, G.; OLIVEIRA, J.; MIRANDA, J.; LUTZ, Í. *et al.* Variation and divergence between Snappers (Lutjaninae–Perciformes) of the western south Atlantic: mitochondrial control region for diagnosis of fishing pressure or new barcode for fish. **Research, Society and Development**, 9, n. 9, p. e977998320, 2020.

FAPESPA. **Nota Técnica Pesca Paraense 2023**. Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas. 2023.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **evolution**, 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FOWLER, H. W. A collection of fresh-water fishes obtained in eastern Brazil by Dr. Rodolpho von Ihering. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, 93, p. 123-336, 1941.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. Fundamentos de genética da conservação. **Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto**, p. 12-50, 2008.

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. **Eschmeyer's catalog of fishes: genera/species by family/subfamily**. 2025. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Acesso em: 31 jan. 2025.

FROESE, R.; PAULY, D. E. **FishBase**. 2024. Disponível em: www.fishbase.org. Acesso em: 25 jan. 2025.

GAMARRA, N.; COSTA, A.; FERREIRA, M.; DIELE-VIEGAS, L. *et al.* The contribution of fishing to human well-being in Brazilian coastal communities. **Marine Policy**, 150, p. 105521, 2023.

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

GARAVELLO, J. Descrição de uma nova espécie do gênero *Schizodon* Agassiz da bacia do Rio Uruguai, Brasil (Ostariophysi, Anostomidae). **Comunicacoes do Museu de Ciencias e Tecnologia da PUCRS. Serie Zoologia**, 7, 1994.

GARAVELLO, J. C.; BRITSKI, H. A. Family Anostomidae (Headstanders). *In*: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O. e FERRARIS JR., C. J. (Ed.). **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 71-84.

GARAVELLO, J. C.; BRITSKI, H. A. Redescription of *Schizodon dissimilis* and appraisal of the dark barred species of the genus (Characiformes: Anostomidae). **Neotropical Ichthyology**, 17, p. e180035, 2019.

GARAVELLO, J. C.; RAMIREZ, J. L.; OLIVEIRA, A. K. D.; BRITSKI, H. A. *et al.* Integrative taxonomy reveals a new species of Neotropical headstanding fish in genus *Schizodon* (Characiformes: Anostomidae). **Neotropical Ichthyology**, 19, n. 04, p. e210016, 2021.

GARBER, A. F. Utilization of a hypervariable region as a molecular marker for red snapper, *Lutjanus campechanus*, stock enhancement. **M. Sc. thesis. University of Southern Mississippi, Hattiesburg**, 2001.

GARBER, A. F.; TRINGALI, M. D.; STUCK, K. C. Population structure and variation in red snapper (*Lutjanus campechanus*) from the Gulf of Mexico and Atlantic coast of Florida as determined from mitochondrial DNA control region sequence. **Marine Biotechnology**, 6, p. 175-185, 2004.

GATT, M. H.; FERGUSON, M. M.; LISKAUSKAS, A. P. Comparison of control region sequencing and fragment RFLP analysis for resolving mitochondrial DNA variation and phylogenetic relationships among Great Lakes walleyes. **Transactions of the American Fisheries Society**, 129, n. 6, p. 1288-1299, 2000.

GOMES, G.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H. Population Structure of *Lutjanus purpureus* (Lutjanidae-Perciformes) on the Brazilian coast: further existence evidence of a single species of red snapper in the western Atlantic. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 84, p. 979-999, 2012.

GOULDING, M. **Man and Fisheries on an Amazonian Frontier**. The Hague: W. Junk Publishers, 1981.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic biology**, 52, n. 5, p. 696-704, 2003.

HALL, T. A., 1999, **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. Oxford. 95-98.

HEBERT, P. D.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

HULSEY, C. D.; ROBERTS, R. J.; LIN, A. S.; GULDBERG, R.; STREELMAN, J. T. Convergence in a mechanically complex phenotype: detecting structural adaptations for crushing in cichlid fish. **Evolution**, 62, n. 7, p. 1587-1599, 2008.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal, 2023**. 2023. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>. Acesso em: 08 fev. 2025.

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

KOLMANN, M.; HUGHES, L.; HERNANDEZ, L.; ARCILA, D. *et al.* Phylogenomics of piranhas and pacus (Serrasalminidae) uncovers how dietary convergence and parallelism obfuscate traditional morphological taxonomy. **Systematic Biology**, 70, n. 3, p. 576-592, 2021.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.

LATRUBESSE, E. M.; ARIMA, E. Y.; DUNNE, T.; PARK, E. *et al.* Damming the rivers of the Amazon basin. **Nature**, 546, n. 7658, p. 363-369, 2017.

LEE, W.-J.; CONROY, J.; HOWELL, W. H.; KOCHER, T. D. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. **Journal of molecular evolution**, 41, p. 54-66, 1995.

LOPES, C. D. A.; BENEDITO-CECILIO, E.; AGOSTINHO, A. The reproductive strategy of *Leporinus friderici* (Characiformes, Anostomidae) in the Paraná river basin: the effect of reservoirs. **Revista Brasileira de Biologia**, 60, p. 255-266, 2000.

LUTZ, Í.; MARTINS, T.; ARAÚJO, F.; FERREIRA, C. *et al.* Molecular characterization of juvenile fish from the Amazon estuary using DNA barcoding approach. **Plos one**, 18, n. 9, p. e0292232, 2023.

MARTINS, C.; WASKO, A. P.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. **Genetics and Molecular Biology**, 26, p. 33-38, 2003.

MELO, C. E. D.; RÖPKE, C. P. Alimentação e distribuição de piau (Pisces, Anostomidae) na planície do Bananal, Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 21, p. 51-56, 2004.

MORITZ, C.; CICERO, C. DNA barcoding: promise and pitfalls. **PLoS biology**, 2, n. 10, p. e354, 2004.

MPA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011**. 2013. Disponível em:<https://bit.ly/47vAuZA>. Acesso em:08 fev. 2025.

MYERS, G. S. Studies on South American fresh-water fishes. I. **Stanford Ichthyological Bulletin**, 2, n. 4, p. 89-114, 1942.

NASCIMENTO, M. H. S.; ARAGÃO, D. G.; SILVA, J. L. N.; LIMA, R. C. *et al.* The DNA barcode reveals cryptic diversity and a new record for the genus *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae) in the hydrographic basins of central northern Brazil. **PeerJ**, 11, p. e15184, 2023.

NASCIMENTO, M. H. S.; BIRINDELLI, J. L. O.; FRAGA, E.; BARROS, M. C. Exploring hidden diversity: Molecular insights into the *Leporinus* species of the rivers of the Brazilian states of Maranhão and Piauí. **Journal of Fish Biology**, 2024.

OHARA, W.; LIMA, F.; SALVADOR, G.; ANDRADE, M. Peixes do rio Teles Pires: diversidade e guia de identificação. **Gráfica Amazonas e Editora Ltda–EPP, Aparecida de Goiânia**, 2017.

OLIVEIRA, R. C.; SILVA, J. L.; SILVA, A. C.; SOUSA, P. R. *et al.* DNA barcode reveals a new lineage of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) in the basins of the Western Northeast Atlantic Region, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 96, n. 4, p. e20240161, 2024.

PAITHANKAR, K.; PRASAD, K. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. **Nucleic acids research**, 19, n. 6, p. 1346, 1991.

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

QI, D.; CHAO, Y.; GUO, S.; ZHAO, L. *et al.* Convergent, parallel and correlated evolution of trophic morphologies in the subfamily schizothoracinae from the Qinghai-Tibetan plateau. **PLoS One**, 7, n. 3, p. e34070, 2012.

RAMBAUT, A. **FigTree: a graphical viewer of phylogenetic trees**. Versão 1.4.4. Edinburgh, UK: Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, 2018.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J.; XIE, D.; BAELE, G.; SUCHARD, M. A. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic biology**, 67, n. 5, p. 901-904, 2018.

RAMIREZ, J.; CARVALHO-COSTA, L.; VENERE, P.; CARVALHO, D. *et al.* Testing monophyly of the freshwater fish *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae) through molecular analysis. **Journal of Fish Biology**, 88, n. 3, p. 1204-1214, 2016.

RAMIREZ, J. L.; BIRINDELLI, J. L.; CARVALHO, D. C.; AFFONSO, P. R. *et al.* Revealing hidden diversity of the underestimated neotropical ichthyofauna: DNA barcoding in the recently described genus *Megaleporinus* (Characiformes: Anostomidae). **Frontiers in Genetics**, 8, p. 149, 2017.

RAMIREZ, J. L.; BIRINDELLI, J. L.; GALETTI JR, P. M. A new genus of Anostomidae (Ostariophysi: Characiformes): diversity, phylogeny and biogeography based on cytogenetic, molecular and morphological data. **Molecular phylogenetics and evolution**, 107, p. 308-323, 2017.

RAMIREZ, J. L.; SANTOS, C. A.; MACHADO, C. B.; OLIVEIRA, A. K. *et al.* Molecular phylogeny and species delimitation of the genus *Schizodon* (Characiformes, Anostomidae). **Molecular phylogenetics and evolution**, 153, p. 106959, 2020.

RAMIREZ, Z. R. S. Análise da composição e distribuição geográfica dos atuns da costa brasileira (Perciformes: Scombridae: Thunnini). 2015.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). **Molecular ecology notes**, 7, n. 3, p. 355-364, 2007.

REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M. *et al.* Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, 89, n. 1, p. 12-47, 2016.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR., C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Edipucrs, 2003. 8574303615.

ROZAS, J.; FERRER-MATA, A.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; GUIRAO-RICO, S. *et al.* DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. **Molecular biology and evolution**, 34, n. 12, p. 3299-3302, 2017.

RÜBER, L.; ADAMS, D. Evolutionary convergence of body shape and trophic morphology in cichlids from Lake Tanganyika. **Journal of Evolutionary Biology**, 14, n. 2, p. 325-332, 2001.

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

SALATI, E.; VOSE, P. B. Amazon basin: a system in equilibrium. **Science**, 225, n. 4658, p. 129-138, 1984.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTA BRÍGIDA, N.; LUTZ, Í.; MARTINS, T.; SANTANA, P. *et al.* Authentication of sushi and sashimi products from northeastern Pará, coastal Amazon, by DNA barcoding reveals commercial frauds and potential threats to human health and environment. **Food Control**, 166, p. 110724, 2024.

SANTANA, P.; MARTINS, T.; LUTZ, Í.; MIRANDA, J. *et al.* DNA barcode reveals occurrence of threatened species and hidden diversity on Teleost fish trade in the Coastal Amazon. **Scientific reports**, 13, n. 1, p. 19749, 2023.

SANTOS, G. M. D. Aspectos de sistemática e morfologia de *Schizodon fasciatus* Agassiz, 1829, *Rhytiodus microlepis* Kner, 1859 e *Rhytiodus argenteofuscus* Kner, 1829 (Osteichthyes, Characoidei, Anostomidae) do lago Janauacá-Amazonas (). **Acta Amazonica**, 10, n. 3, p. 635-649, 1980.

SANTOS, G. M. D. Estudos de alimentação e hábitos alimentares de *Schizodon fasciatus* Agassiz, 1829, *Rhytiodus microlepis* Kner, 1859 e *Rhytiodus argenteofuscus* Kner, 1859, do lago Janauacá-AM.(Osteichthyes, Characoidei, Anostomidae). **Acta Amazonica**, 11, n. 2, p. 267-285, 1981.

SANTOS, G. M. D. Caracterização, Hábitos Alimentares E Reprodutivos De Quatro Espécies De "Aracus" E Considerações Ecológicas Sobre O Grupo No Lago Janauacá-AM.(Osteichthyes, Characoidei, Anostomidae). **Acta Amazonica**, 12, n. 4, p. 713-739, 1982.

SANTOS, G. M. D. Caracterização e hábitos alimentares e reprodutivos de quatro espécies de aracus e considerações sobre o grupo no Lago Janauacá, Am. **Volume 12, Número 4, Pags. 713-739**, 1983.

SANTOS, G. M. D.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S. **Peixes comerciais de Manaus**. editora INPA, 2009. 8521100493.

SANTOS, G. M. D.; JEGÚ, M. Inventário Taxonômico Dos Anostomídeos (Pisces, Anostomidae) Da Bacia Do Rio Uatumã-Am, Brasil, Com Descrição De Duas Espécies Novas. **Acta Amazonica**, 26, n. 3, p. 151-184, 1996.

SARI, A.; DURAN, M.; SEN, A.; BARDAKCI, F. Investigation of Chironomidae (Diptera) relationships using mitochondrial COI gene. **Biochemical Systematics and Ecology**, 59, p. 229–238, 2015.

SIDLAUSKAS, B.; BIRINDELLI, J.; VAN DER SLEEN, P.; ALBERT, J. Family Anostomidae—toothed headstanders. **Field Guide to the Fishes of the Amazon, Orinoco & Guianas**. P. van der Sleen and JS Albert (eds.). Princeton University Press, Princeton, New Jersey, p. 82-89, 2017.

SIDLAUSKAS, B. L.; ASSEGA, F. M.; MELO, B. F.; OLIVEIRA, C.; BIRINDELLI, J. L. Total evidence phylogenetic analysis reveals polyphyly of Anostomoides and uncovers an unexpectedly ancient genus of Anostomidae fishes (Characiformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 194, n. 2, p. 626-669, 2022.

SIDLAUSKAS, B. L.; ASSEGA, F. M.; MELO, B. F.; OLIVEIRA, C.; BIRINDELLI, J. L. O. Total evidence phylogenetic analysis reveals polyphyly of Anostomoides and uncovers an unexpectedly ancient genus of Anostomidae fishes (Characiformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 194, n. 2, p. 626-669, 2021.

SIDLAUSKAS, B. L.; GARAVELLO, J. C.; JELLEN, J. A new *Schizodon* (Characiformes: Anostomidae) from the Río Orinoco system, with a redescription of *S. isognathus* from the Rio Paraguay system. **Copeia**, 2007, n. 3, p. 711-725, 2007.

SIDLAUSKAS, B. L.; MELO, B. F.; BIRINDELLI, J. L.; BURNS, M. D. *et al.* Molecular phylogenetics, a new classification, and a new genus of the Neotropical fish family Anostomidae (Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, 23, p. e240076, 2025.

SIDLAUSKAS, B. L.; VARI, R. P. Phylogenetic relationships within the South American fish family Anostomidae (teleostei, ostariophysii, Characiformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 154, n. 1, p. 70-210, 2008.

SIDLAUSKAS, B. L.; VARI, R. P. Diversity and distribution of anostomoid fishes (Teleostei: Characiformes) throughout the Guianas. **Cybium**, 2012.

SILVA-SANTOS, R.; RAMIREZ, J. L.; GALETTI JR, P. M.; FREITAS, P. D. Molecular evidences of a hidden complex scenario in *Leporinus cf. friderici*. **Frontiers in Genetics**, 9, p. 47, 2018.

SILVA, D.; MARTINS, K.; OLIVEIRA, J.; DA SILVA, R. *et al.* Genetic differentiation in populations of lane snapper (*Lutjanus synagris*–Lutjanidae) from Western Atlantic as revealed by multilocus analysis. **Fisheries Research**, 198, p. 138-149, 2018.

SOUSA, E. Z.; JESUS, L. W.; MEIRELES, W. A.; BORELLA, M. I. *et al.* O desenvolvimento embrionário da Piapara, *Leporinus elongatus* (Pisces, Anostomidae), utilizando técnicas de histologia, microscopia eletrônica de varredura e imunológicas empregando marcadores ósseos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 34, n. Suppl 1, p. 92-98, 2014.

TERENCIO, M. L. Estimativa da variabilidade genética da região controle do DNA mitocondrial de *Nannostomus eques* (Characiformes, Lebiasinidae) da bacia do rio Negro. 2009.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. 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, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TISSEUIL, C.; CORNU, J. F.; BEAUCHARD, O.; BROSSE, S. *et al.* Global diversity patterns and cross-taxa convergence in freshwater systems. **Journal of Animal Ecology**, 82, n. 2, p. 365-376, 2013.

VENEZA, I. B.; FREITAS, E. A. D.; FERREIRA, C. S. M.; BENTES, D. M. C.; SILVA, J. V. D. Guia de peixes comercializados em Monte Alegre. : Atena 2023.

WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST, P. R.; HEBERT, P. D. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 360, n. 1462, p. 1847-1857, 2005.

APÊNDICE

Tabela suplementar 1. Resultado da identificação genética, utilizando o gene COI. H: Haplótipo. N: Número de sequências. %: Similaridade com as sequências de bancos públicos. ID: Identificação. *: Sequências privadas.

H	N	Amostra	ID Molecular		ID Morfológica		
			NCBI		BOLD		
			Similaridade (%)	Nº de acesso	Similaridade (%)	Nº de acesso	
1	47	ANOCT137	<i>L. piau</i> (100)	OP782360	<i>L. cf. friderici</i> (100)*	<i>L. friderici</i>	
			<i>L. cf. friderici</i> (100)	MF664228	<i>L. sp.</i> (100)*		
			<i>L. friderici</i> (99,30)	OR732990	<i>L. gossei</i> (99,35)*		
			<i>L. lacustris</i> (98,24)	JN988996	<i>L. friderici</i> (99,35)		TZGAA109-06
			<i>L. piau</i> (99,84)	OP782360	<i>L. cf. friderici</i> (99,84)*		
2	2	ANOGU88	<i>L. cf. friderici</i> (99,84)	MF664228	<i>L. sp.</i> (99,84)*		
			<i>L. friderici</i> (99,30)	OR732990	<i>L. gossei</i> (99,35)*		
			<i>Leporinus lacustris</i> (98,24)	JN988996	<i>L. friderici</i> (99,35)		TZGAA109-06
					<i>L. cf. friderici</i> (99,84)*		
			<i>L. piau</i> (99,84)	OP782360	<i>L. sp.</i> (99,84)*		
3	1	ANOCT128	<i>L. cf. friderici</i> (99,84)	MF664228	<i>L. gossei</i> (99,19)*		
			<i>L. friderici</i> (99,13)	OR732990	<i>L. friderici</i> (99,19)		TZGAA109-06
			<i>L. lacustris</i> (98,08)	JN988996	<i>L. trimaculatus</i> (98,87)*		
					<i>L. piau</i> (98,71)		ITAPE354-15
			<i>L. piau</i> (99,68)	OP782375	<i>L. piau</i> (99,67)		ITAPE342-15
4	40	ANOGU30	<i>L. cf. friderici</i> (99,52)	MF664243	<i>L. friderici</i> (99,67)*		

Tabela Suplementar 1 (Continuação). Resultado da identificação genética, utilizando o gene COI. H: Haplótipo. N: Número de sequências. %: Similaridade com as sequências de bancos públicos. ID: Identificação. *: Sequências privadas.

H	N	Amostra	ID Molecular		ID Morfológica	
			NCBI		BOLD	
			Similaridade (%)	Nº de acesso	Similaridade (%)	Nº de acesso
4	40	ANOGU30	<i>L. friderici</i> (99,48)	OR732991		
			<i>L. venerei</i> (99,32)	OP782388	<i>L. sp.</i> (99,51)*	
			<i>L. cf. parae</i> (99,03)	MF677847	<i>L. cf. parae</i> (99,03)*	
			<i>L. trimaculatus</i> (99,03)	KF568999		
			<i>L. piau</i> (100)	OP782375	<i>L. piau</i> (100)	ITAPE342-15
5	3	ANOGU76	<i>L. cf. friderici</i> (99,52)	MF664243	<i>L. friderici</i> (100)*	
			<i>L. venerei</i> (99,35)	OP782385	<i>L. sp.</i> (99,51)*	
			<i>L. friderici</i> (99,30)	OR732991	<i>L. venerei</i> (99,19)*	
			<i>L. cf. parae</i> (99,03)	MF677847	<i>L. cf. parae</i> (99,03)*	
			<i>L. trimaculatus</i> (99,03)	KF568999		
6	1	ANOGU112	<i>L. piau</i> (99,51)	OP782375		
			<i>L. cf. friderici</i> (99,36)	MF664243	<i>L. piau</i> (99,51)	ITAPE342-15
			<i>L. friderici</i> (99,30)	OR732991	<i>L. friderici</i> (99,5)*	
			<i>L. venerei</i> (99,16)	OP782388	<i>L. sp.</i> (99,35)*	
			<i>L. cf. parae</i> (98,87)	MF677847	<i>L. cf. parae</i> (98,87)*	
			<i>L. trimaculatus</i> (98,87)	KF568999		

Tabela Suplementar 1 (Continuação). Resultado da identificação genética, utilizando o gene COI. H: Haplótipo. N: Número de sequências. %: Similaridade com as sequências de bancos públicos. ID: Identificação. *: Sequências privadas.

H	N	Amostra	ID Molecular		ID Morfológica	
			NCBI		BOLD	
			Similaridade (%)	Nº de acesso	Similaridade (%)	Nº de acesso
			<i>L. piau</i> (99,67)	OP782375		
			<i>L. cf. friderici</i> (99,52)	MF664243	<i>L. piau</i> (99,67)	ITAPE342-15
7	1	ANOGU117	<i>L. venerei</i> (99,32)	OP782388	<i>L. friderici</i> (99,67)*	
			<i>L. friderici</i> (99,30)	OR732991	<i>L. sp.</i> (99,51)*	
			<i>L. cf. parae</i> (99,03)	MF677847	<i>L. cf. parae</i> (99,03)*	
			<i>L. trimaculatus</i> (99,03)	KF568999		
			<i>S. fasciatus</i> (100)	MK506869	<i>S. fasciatus</i> (100)	ANOS242-14
8	26	ANOFE68	<i>S. dissimilis</i> (100)	MK530995	<i>S. dissimilis</i> (100)	GBMND24462-21
			<i>S. vittatus</i> (98,55)	MK506877	<i>S. vittatus</i> (98,54)	ANOS354-18
			<i>S. borellii</i> (98,26)	JN813010		
			<i>S. fasciatus</i> (99,84)	MK506869	<i>S. fasciatus</i> (99,84)	ANOS242-14
			<i>S. dissimilis</i> (99,84)	MK530995	<i>S. dissimilis</i> (99,84)	GBMND24462-21
9	3	ANOOX64	<i>S. vittatus</i> (98,39)	MK506877	<i>S. vittatus</i> (98,38)	ANOS354-18
			<i>S. borellii</i> (98,07)	JN813010		
			<i>S. fasciatus</i> (99,41)	OM453711	<i>S. fasciatus</i> (99,15)	ANOS218-14
10	1	MTRMA05	<i>S. dissimilis</i> (98,86)	MK530995	<i>S. dissimilis</i> (98,68)	GBMND24462-21

M. trifasciatus

Tabela Suplementar 1 (Continuação). Resultado da identificação genética, utilizando o gene COI. H: Haplótipo. N: Número de seqüências. %: Similaridade com as seqüências de bancos públicos. ID: Identificação. *: Seqüências privadas.

H	N	Amostra	ID Molecular		ID Morfológica		
			NCBI		BOLD		
			Similaridade (%)	Nº de acesso	Similaridade (%)	Nº de acesso	
11	1	SFAMN73	<i>S. fasciatus</i> (99,84)	MK506869	<i>S. fasciatus</i> (100)*		
			<i>S. dissimilis</i> (99,67)	MK530992	<i>S. dissimilis</i> (99,84)*		
			<i>S. vittatus</i> (98,37)	MK506877	<i>S. vittatus</i> (98,34)	ANOS354-18	
			<i>S. borellii</i> (98,07)	JN813010			
			<i>S. fasciatus</i> (100)	MK506852	<i>S. fasciatus</i> (100)	ANOS038-14	
12	1	SFAMN77	<i>S. dissimilis</i> (99,67)	MK530995	<i>S. dissimilis</i> (99,67)*		
			<i>S. vittatus</i> (98,31)	MK506863	<i>S. vittatus</i> (98,18)	ANOS354-18	
			<i>S. borellii</i> (98,07)	JN813010			
			<i>S. fasciatus</i> (99,84)	MK506869	<i>S. dissimilis</i> (99,84)	GBMND24462-21	
13	1	SFAMN78	<i>S. dissimilis</i> (99,67)	MK530992	<i>S. fasciatus</i> (99,83)	ANOS242-14	
			<i>S. vittatus</i> (98,37)	MK506877	<i>S. vittatus</i> (98,34)	ANOS354-18	
			<i>S. borellii</i> (98,07)	JN813010			
14	1	ANOGU113	<i>S. vittatus</i> (100)	OR733160	<i>S. vittatus</i> (100)	TOCAN059-23	
15	2	ANOPI36	<i>M. macrocephalus</i> (100)	KX925474	<i>M. macrocephalus</i> (100)	ANOS106-14	<i>M. macrocephalus</i>
16	1	ANOPI40	<i>M. macrocephalus</i> (100)	KX925474	<i>M. macrocephalus</i> (100)	ANOS106-14	<i>M. macrocephalus</i>
17	1	ANOPI43	<i>M. macrocephalus</i> (100)	KX925474	<i>M. macrocephalus</i> (100)	ANOS106-14	<i>M. macrocephalus</i>