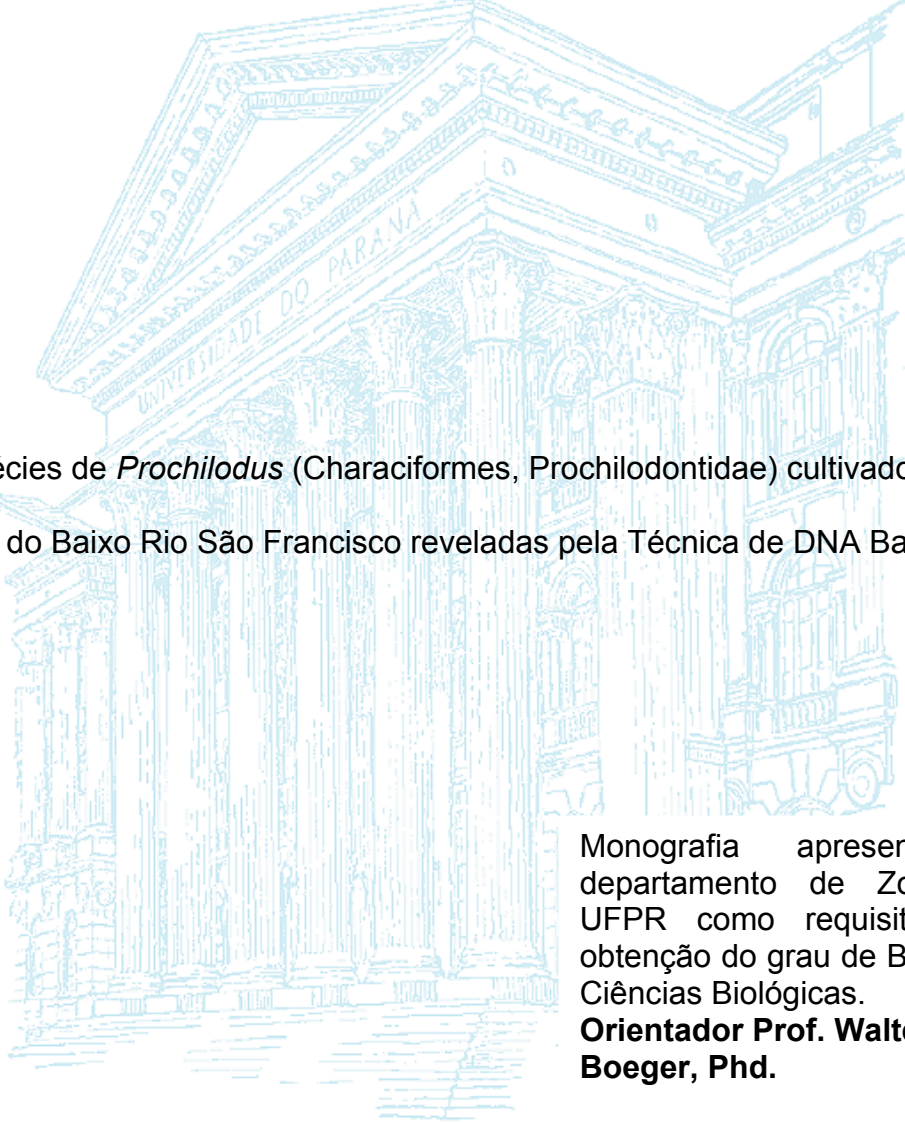


Flávio Miranda Marteleto

Espécies de *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae) cultivados na região do Baixo Rio São Francisco reveladas pela Técnica de DNA Barcode.

CURITIBA  
2008

Flávio Miranda Marteleto



Espécies de *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae) cultivados na região do Baixo Rio São Francisco reveladas pela Técnica de DNA Barcode.

Monografia apresentada ao departamento de Zoologia da UFPR como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientador Prof. Walter A. Boeger, Phd.**

CURITIBA  
2008

## Sumário

1. Introdução.....	4
2. Objetivos .....	7
3. Materiais e métodos.....	8
3.1 Coleta de amostras .....	8
3.2 Protocolos moleculares.....	8
3.3 Análise dos dados.....	9
4. Resultados.....	11
5. Discussão.....	13
6. Tabelas.....	17
7. Figuras.....	19
8. Referências Bibliográficas.....	21

## 1.INTRODUÇÃO

A análise das seqüências de DNA seja diretamente, ou indiretamente pela análise de proteínas, pode ser utilizada para discriminar espécies (Ward et. al., 2005). Um dos primeiros trabalhos a utilizar informação molecular oriunda de um só gene para inferir relações evolutivas entre espécies, data de 1977 (Woese e Fox, 1977; Ward et al. 2005). Para isso, utilizou-se de o gene de RNA ribossomal 18S. Entretanto, genes que evoluem muito devagar, como este, não são propriamente indicados para a separação entre espécies muito próximas porquê não acumulam diferenças significativas para comparação, apesar de serem indispensáveis para análise de relações filogenéticas em um nível taxonômico superior (Woese e Fox, 1977; Woese, 2000; Ward et al. 2005). Para a análise de espécies proximamente relacionadas é aconselhável a utilização de genes que evoluam mais rapidamente do que o que se observa na maioria dos genes pertencentes ao DNA nuclear. Alguns genes que compõem o DNA mitocondrial têm essa característica (Hebert et. al., 2004a).

A identificação de espécies por meio do Código de Barras do DNA (DNA Barcode, CBD), é uma ferramenta que tem sido utilizada nos últimos anos como apoio para estudos de taxonomia tradicional, especialmente na detecção de espécies crípticas (Molbo et. al. 2003; Hebert et. al., 2004b,). CBD pode ser utilizado, ainda, em situações nas quais apenas um fragmento ou outro registro do espécime esteja disponível (ex.: fezes, pêlo), ou na identificação de fases larvais as quais, nem o olho treinado do especialista consegue determinar a espécie (Bucklin et. al., 1999; Hebert et. al., 2003,).

Essa técnica consiste na obtenção de uma seqüência curta de DNA de um indivíduo (Hubert, et. al., 2008), sendo uma maneira rápida, relativamente fácil e barata de determinar sua espécie. Isso é possível, graças às inúmeras possibilidades de arranjos que as bases nitrogenadas do DNA (Adenina, Timina, Citosina e Guanina) nos proporcionam, funcionando tal qual um código de barras como aqueles que encontramos nos produtos utilizados diariamente. Cada espécie, sugere o método, possui o seu arranjo específico de seqüências de DNA (Hebert et. al., 2003). As seqüências entre indivíduos da mesma espécie têm, geralmente, menos divergências quando comparadas às seqüências de indivíduos de espécies proximamente relacionadas (Hebert et. al., 2004b).

Para animais, o fragmento mais freqüentemente utilizado é parte do gene que codifica a proteína Citocromo Oxidase subunidade I (COI), com aproximadamente 700 pares de base. Esse fragmento tem se mostrado eficaz em identificar espécies de aves, borboletas, peixes, moscas e muitos outros Grupos de animais (Hebert et. al. 2003; Hubert, et. al., 2008; Ward et. al. 2005; Ivanova et. al., 2007).

Em alguns Grupos de peixes Neotropicais, é difícil entender os processos que originaram sua diferenciação em espécies, devido à reduzida variabilidade morfológica associada. Nestes casos, estudos moleculares têm um papel importante para elucidar estes problemas de identificação, pois são capazes de mostrar a diversidade genética presente dentro destes Grupos (Turner et. al., 2004).

Os Prochilodontidae (Characiformes) constituem cerca de 50 a 60% da biomassa de peixes em muitos rios Neotropicais (Taphorn, 1992). Essa grande abundancia caracteriza esses peixes como um grande recurso pesqueiro nessas

áreas (Welcomme, 1990). As espécies de *Prochilodus*, pertencentes a essa família, são conhecidas vulgarmente como curimatãs, curimatás ou xiras. Essas são espécies de grande interesse comercial na Bacia do rio São Francisco, tanto para pesca como para a piscicultura, devido à sua capacidade de adaptação aos diferentes ambientes aquáticos, facilidade de fecundação artificial, manejo, regime alimentar, entre outros fatores (Fontenelle, 1953).

A natureza migratória das espécies deste gênero, aliado aos fatores acima citados, resulta em sua extensa distribuição geográfica e riqueza das espécies. Das 21 espécies de Prochilodontidae, 13 são pertencentes à *Prochilodus* (Turner et. al., 2004).

Existem registros de introdução de espécies pertencentes a este gênero, e a outros gêneros de peixes, na Bacia do Rio São Francisco provenientes de outras bacias Hidrográficas (IBAMA-2008) com o objetivo de piscicultura. Isso sugere que exista um aumento na possibilidade de hibridização entre espécies e de introgressão com espécies locais. Introgressão é um fenômeno que ocorre quando duas espécies diferentes se reproduzem gerando um híbrido fértil que intercruza com indivíduos de uma, ou ambas espécies parentais causando um fluxo genético de uma espécie para a outra.

Assim, o uso de técnicas rápidas de identificação de espécies é fundamental para permitir uma análise rápida e inequívoca do status dos estoques dos peixes cultivados e envolvidos nos processos de reprodução artificial na região do Baixo São Francisco.

O presente projeto, portanto, tem como objetivo principal a identificação das linhagens (espécies) de *Prochilodus* cultivadas nessa região do Baixo Rio São Francisco, em Sergipe.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo principal**

Identificar as linhagens (espécies) de *Prochilodus* cultivadas na região do Baixo Rio São Francisco.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Amplificar e obter seqüências do gene da subunidade 1 da Oxidase do Citocromo (COI) para os indivíduos de espécies de *Prochilodus* capturados na calha do rio São Francisco e em piscicultura na região;
- Agrupar os indivíduos por espécie através de análises filogenéticas das seqüências;
- Estabelecer conhecimento básico sobre marcadores moleculares capazes de desempenhar o papel de DNA Barcodes para as espécies detectadas.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Coleta das amostras**

As amostras de Curimatá (*Prochilodus* spp.) foram coletadas na região do Baixo Rio São Francisco, como especificado na Tabela I. As amostras de tecido coletadas (arcos branquiais) foram preservadas em tampão EDTA/DMSO (SEUTIN et. al. 1991).

#### **Procedimentos moleculares**

O DNA foi extraído dos tecidos coletados, através de Kit de extração IPrep™ Chargeswitch®, com o auxílio do robô de extração automatizada (IPrep™ Purification instrument, Invitrogen™), conforme especificações do fabricante. O produto da extração foi em seguida amplificado com o auxílio dos primers FF1d e FF2d (IVANOVA et. al., 2007; Tabela II), para obtenção da região do gene codificador da subunidade I da proteína Oxidase do Citocromo (COI), através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Mullis & Faloona, 1987), em termocicladores Eppendorf™ (Personal Thermocycler). Em cada 25 µl de reação, os volumes dos reagentes e suas respectivas concentrações iniciais foram: Primer1: 1 µl a 50 pmol, Primer2: 1 µl a 50 pmol, Taq polimerase: 0,5 µl a 5 U/ul, Buffer: 2,5 µl a 10x, dNTP: 0,4µl a 100mM, Cloreto de magnésio MgCl<sub>2</sub>: 1,5 µl a 50 mM

Os primers FF1d e FF2d, utilizados para a PCR geram seqüências entre 600 a 700 pares de bases. Cada ciclo de reação tem as seguintes temperaturas:



Desnaturação inicial 94°C por 5 minutos, Denaturação 94°C por 45 segundos, Anelamento 68°C por 45 segundos, Extensão 72°C por 1 minuto, Extensão final 72°C por 5 min, por fim a temperatura de armazenamento foi de 4°C

Após a realização de eletroforese em gel de agarose 1,5% o qual foi corado em brometo de etídio, o produto de PCR foi visualizado e documentado em equipamento com luz ultra-violeta (Vilber Lourmat®). Em seguida as amostras foram purificadas com o auxílio do Kit Montage – Life Science Kits (Millipore™) e utilizadas para realização de reações de seqüenciamento com o kit Big Dye v3 (Applied Biosystems®). Por fim, as amostras resultantes são seqüenciadas em um seqüenciador automático ABI3130, sendo essas seqüências utilizadas nas análises.

### **3.3. Análise dos dados genéticos**

A definição das unidades evolutivas de *Prochilodus spp.* existentes na região estudada foi baseada na reconstrução do relacionamento filogenético dos animais coletados. Todas as seqüências obtidas foram alinhadas manualmente ou com auxílio do programa Clustal W (Thompson et. al., 1994). As regiões com alinhamento ambíguo foram omitidas das análises. O alinhamento foi analisado utilizando o método de análise filogenética inferência Bayesiana, utilizando os softwares Paup\* (Swofford 2000) e MrBayes (Ronquist e Huelsenbeck 2003) através do portal online Cipress (<http://www.phylo.org/portal/Home.do>), respectivamente. JModeltest (Posada e Krandall, 1998) foi utilizado para determinar o modelo inicial para a reconstrução da filogenia.

Os dados do alinhamento geraram grupos distintos de seqüências que demonstraram conter mais semelhanças entre si do que entre as outras formando três agrupamentos distintos (Figura 1) os quais foram comparados pelas distâncias

pareadas, dentro de cada conjunto e entre eles, utilizando o Software MEGA 4 (Tamura et. al, 2007). Este procedimento gerou matrizes de distância genética, com as quais foram montados histogramas de frequência (Figura 1I), no programa Excel (Microsoft™).

#### 4. RESULTADOS

Foram obtidas 103 seqüências de indivíduos provenientes de sete localidades diferentes (Tabela I). Destes, 69 foram oriundos de cultivos de peixe e 34 foram capturados na natureza. Alguns indivíduos amostrados, coletados em estações de cultivo, foram identificados pelos produtores, utilizando-se critérios morfológico e leigo. Os indivíduos foram classificados como Curimatã-preta, Curimatã-pacu e Curimatã - piau (Tabela III). A primeira letra P (Parental) no código utilizado nessa tabela refere-se ao peixe do qual o indivíduo é filho. A segunda letra P e o G referem-se ao tamanho do indivíduo: P=indivíduos pequenos e G=indivíduos grandes.

As seqüências foram editadas e regiões com alinhamento ambíguo foram removidas (usualmente as extremidades). O alinhamento final continha 490 pares de base (pb) em cada um dos 103 fragmentos. Nenhuma inserção ou deleção (indel) foi necessária. Em seguida foi criada uma matriz de similaridade entre as seqüências que demonstrou que os 103 indivíduos apresentavam apenas 25 haplótipos diferentes. Com estes haplótipos foram realizadas as análises filogenéticas utilizando o modelo selecionado pelo programa Jmodeltest para a análise de inferência Bayesiana: TPM3 +G.

A Figura 1 mostra o gráfico com as probabilidades posteriores de todas as árvores geradas pelo programa Mr. Bayes (Ronquist e Huelsenbeck 2003), no portal Cipress, amostradas a cada 1000 árvores geradas. Burnin foi definido como 6000 árvores (baseado no gráfico). Em seguida as demais árvores restantes foram

utilizadas para o cálculo dos valores de probabilidade posterior de cada ramo no programa Paup (Swofford 2000).

A árvore de consenso de maioria, não enraizada, gerada por Inferência Bayesiana, com cada um dos haplótipos amostrados é apresentada na Figura 2. Só estão mostrados os índices de suportes de ramo (probabilidade posterior) iguais ou superiores a 50. Os números de indivíduos que compartilham um mesmo haplótipo são apresentados no cladograma.

Foram atribuídos os seguintes nomes aos clados de haplótipos formados na análise: Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3. Os indivíduos pertencentes a cada Grupo estão indicados na Tabela 4. Os clados representados pelos haplótipos, agrupados no Grupo 3 e Grupo 1 + Grupo 2 apresentam suporte de 100% de probabilidade posterior, o que mostra que este é um agrupamento bem resolvido (Figura 2). Cinquenta e cinco seqüências de indivíduos deste agrupamento foram rigorosamente idênticas e, sozinhas, formam um clado. Destes, 43 são provenientes de cultivo e 12 capturados no ambiente.

Na Figura 3, são apresentados os histogramas com as distâncias genéticas pareadas entre os indivíduos que apresentam os diferentes haplótipos. O Histograma 1 (Figura 3) apresenta as distâncias pareadas entre indivíduos com as três diferentes linhagens de espécies de *Prochilodus*. Os histogramas 2, 3 e 4 apresentam as distâncias pareadas dentro de cada uma das linhagens. E os histogramas 5, 6 e 7 apresentam as distâncias pareadas entre pares de clados. Vinte e três haplótipos formadores da linhagem 3 tiveram distâncias genéticas de no máximo 0,017 entre si e diferiram em até 0,048 dos haplótipos pertencentes ao Grupo 1 e 0,036 dos haplótipos pertencentes ao Grupo 2.

Os Grupos 1 e 2 possuem dentro de cada um deles haplótipos rigorosamente idênticos, e diferem entre si em apenas 0,006, uma distância bastante inferior à maior distância observada dentro do Grupo 3.

## 5. DISCUSSÃO

Todos os indivíduos do Grupo 1 possuem o mesmo haplótipo sem nenhuma divergência entre eles e são oriundos de estações de cultivo. A baixa variedade de haplótipos encontrados neste grupo pode estar ligada à introdução de novos haplótipos provenientes de outras bacias em estações de produção de peixes. Nestes cultivos é comum a introdução de reprodutores com características desejáveis à criação, tais como ganho de peso e tamanho. Poucos reprodutores são utilizados nesse processo com conseqüente redução no número de haplótipos (variabilidade) pelo aumento da probabilidade de ocorrência de endocruzamentos nos viveiros de cultivo (Moreira et. al, 2007), fixando este haplótipo que, eventualmente, pode ser liberado em ambientes naturais, decorrente do manejo incorreto dos indivíduos cultivados.

Os indivíduos que formam o Grupo 2 são oriundos de Delmiro Gouveia um município a montante no curso do Rio São Francisco em relação aos demais indivíduos analisados, sendo separados destes pela barragem de Xingó. Os haplótipos encontrados neste grupo também são idênticos, embora pouco amostrados, somente 4 indivíduos, seus haplótipos são muito mais parecidos com os dos indivíduos do Grupo 1 (Figura 3-7) do que os do Grupo 3 (Figura 3-5). Os indivíduos do Grupo 3 têm uma variedade haplotípica substancialmente maior quando comparado aos dois outros agrupamentos, 23, e é formado por indivíduos tanto de cultivo quanto capturados na natureza, que são os responsáveis pelo aumento da diversidade nos haplótipos deste grupo.

Nenhuma das espécies que tiveram identificação por leigos como Curimatã-piau, Curimatã-pacu e Curimatã-preta formaram um Grupo natural nas análises

realizadas (Tabela IV). A maioria das 28 seqüências obtidas destes espécimes agruparam-se dentro do Grupo 3, no clado formado por 55 indivíduos. As amostras P2G2, P2G7, P2G13 foram identificadas como Curimatã-preta e P1G10 como Curimatã-pacu. Elas foram incluídas no Grupo 3. Por fim as amostras P2G3 (Curimatã-preta), P2P11 e P2P12 (Curimatã-piau) e P11 P3 (Curimatã - pacu), foram incluídas no Grupo 1 de haplótipos.

Essa diferença entre a classificação feita pelas unidades de cultivo e a caracterização molecular pode indicar que exista realmente uma semelhança morfológica muito grande entre as duas linhagens de haplótipos observadas. Entretanto, o resultado sugere que os caracteres usados por leigos para diferenciação das espécies sejam insuficientes para detectar diferenças específicas ou ainda que possa ter ocorrido hibridização entre as duas espécies/linhagens detectadas. Nesse último caso, características morfológicas não seriam capazes de, isoladamente, detectar linhagens do DNA mitocondrial o qual é de contribuição materna quase que exclusivamente. É certo que os dados COI não são suficientes para afirmar com segurança sobre a ocorrência de hibridização e introgressão entre as espécies, mas trazem à tona essa possibilidade.

A introdução de espécies exóticas em uma região é, muitas vezes, responsável pela hibridização entre espécies, seguidas de introgressão (Rhymer e Simberloff, 1996). Os genes da espécie invasora podem ser introduzidos na espécie nativa por retro-cruzamento do híbrido com o parental nativo, que pode causar dentre outras coisas a extinção desta espécie (Rhymer e Simberloff, 1996), pela produção de genótipos mais adaptados permitindo a expansão da forma introgridida para um novo habitat (Arnold, 1992). A extensão do fenômeno de introgressão em qualquer localidade pode acontecer dentro de infinitas

possibilidades, desde apenas um loci (DNA Mitocondrial), até o ponto em que diferentes populações podem ser identificadas como entidades taxonômicas distintas. (Dowling & Secor, 1997). O processo de introgressão pode ocorrer de forma natural no ambiente e se discute sobre seu papel evolucionário no surgimento de novas espécies (Arnold, 1992; Rhymer e Simberloff, 1996). Se a hibridização natural tiver sido um processo evolutivo generalizado seria possível detectar as consequências genéticas em espécies contemporâneas. Os taxa com origem por hibridização possuiriam uma combinação de marcadores genéticos que são diagnósticos para dois ou mais taxa (Arnold, 1992).

Com base nos resultados obtidos pela análise das seqüências é possível postular a existência de duas espécies diferentes de *Prochilodus* no Baixo Rio São Francisco. Os indivíduos dos Grupos 1 e 2 representam uma espécie putativa, e o outro agrupamento formado pelos indivíduos do Grupo 3, representam a segunda espécie



## 6.TABELAS

Tabela I. Amostras analisadas.

<b>Indivíduos amplificados</b>	<b>Origem</b>	<b>Local de Coleta</b>
018, 019, 020, 02001, 002, 005, 05051, 052, 053, 05056, 057, 058, 05060, 061, 065, 06067, 068, 069, 07071, 072, 074, 07077, 078,	Cultivo Cultivo	Lagoa Tigre, município de Pacatuba – SE
023, 024, 025, 02011, 012, 013, 01068, 132.	Selvager Cultivo Selvager	Lagoa Ouricuri, município de Pacatuba – SE Afluente do Rio São Francisco, município de Pacatuba – SE Município de Própria – SE município de Própria – SE
006, 007, 010, 08124, 125, 126.	Selvager	Lagoa Lagamar, município de Própria – SE
028, 029, 030, 03121, 122, 123.	Cultivo	Estação de piscicultura Betume, município Neópolis – SE
036, 037, 038, 03134, 136, 137, 13139.	Selvager	Mercado de Peixes, povoado de São Brás – A
040, 041, 045, 04047, 049.	Selvager	Porto - Município de Piaçabuçu – AL
141, 142, 143, 14145, 146.	Selvager	Município de Delmiro Gouveia – AL
28*	Cultivo	Estações de cultivo – SE
<b>Total de indivíduos amostrados</b>		<b>103</b>

\* Os indivíduos de alevinagem têm um código especial, não inteiramente numérico, fornecido pelos produtores. Detalhados na Tabela III.

Tabela II. Seqüência de nucleotídeos dos primers utilizados.

<b>Nome do Primer</b>	<b>Seqüência de nucleotídeos</b>
FF1d	CACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA
FF2d	TTCTCCACCAACCACAARGAYATYGG

Tabela III. Indivíduos amostrados nas estações de cultivo e suas respectivas classificações.

<b>Classificação Morfológica</b>	<b>Indivíduos coletados</b>
Classificados como Curimatã - preta.	P2G1, P2G2, P2G3, P2G4, P2G5, P2G6, P2G7, P2G8, P2G10, P2G11, P2G12, P2G13, P3G1, P10G9, P10G10.
Classificados como Curimatã - pacu.	P2P2, P2P3, P2P5, P2P6, P2P7, P2P8, P2P9, P2P11, P2P1
Classificados como Curimatã - Piau.	P11P3, P1P9, P1P10.

Tabela IV. Grupos de indivíduos visualizados no cladograma.

<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3</b>
001, 019, 020, 021, 030, 051, 068, 072, P2G3, P2P11, P2P12, P11P3	141, 142, 143, 144	002, 005, 006, 007, 011, 012, 013, 014, 023, 024, 025, 026, 036, 037, 038, 039, 041, 045, 046, 047, 049, 050, 052, 053, 056, 057, 058, 059, 060, 061, 065, 066, 068, 069, 070, 071, 074, 075, 077, 078, 081, 082, 083, 084, 085, 086, 087, 088, 089, 090, 091, 092, 093, 094, 095, 096, 097, 098, 099, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 134, 136, 137, 138, 139, 145, 146. P2G1, P2G2, P2G4, P2G5, P2G6, P2G7, P2G8, P2G9, P2G10, P2G11, P2G12, P2G13, P3G1, P10G9, P10G10, P2P2, P2P3, P2P5, P2P6, P2P7, P2P8, P2P9, P1P9, P1P10.

## 7.FIGURAS

Figura 1 . Gráfico com as probabilidades posteriores das árvores amostradas pelo programa Mr. Bayes. As seis primeiras árvores foram descartadas.

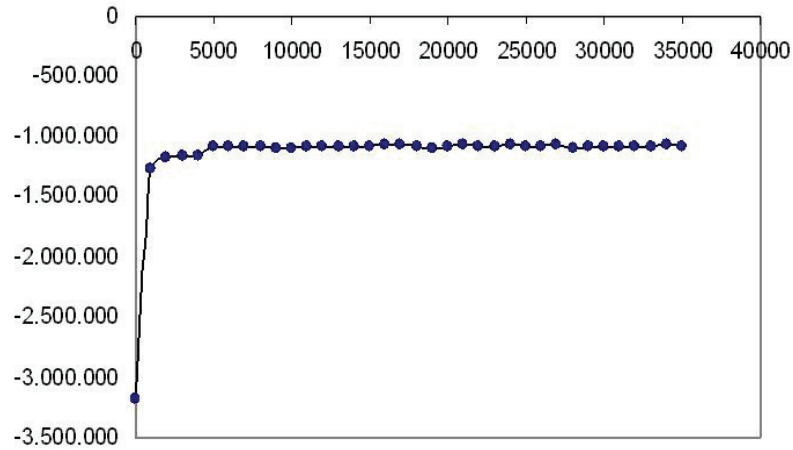


Figura 2. Árvore de Inferência Bayeasiana. Valores de probabilidade posterior maior que 50 são apresentados abaixo de cada ramo.

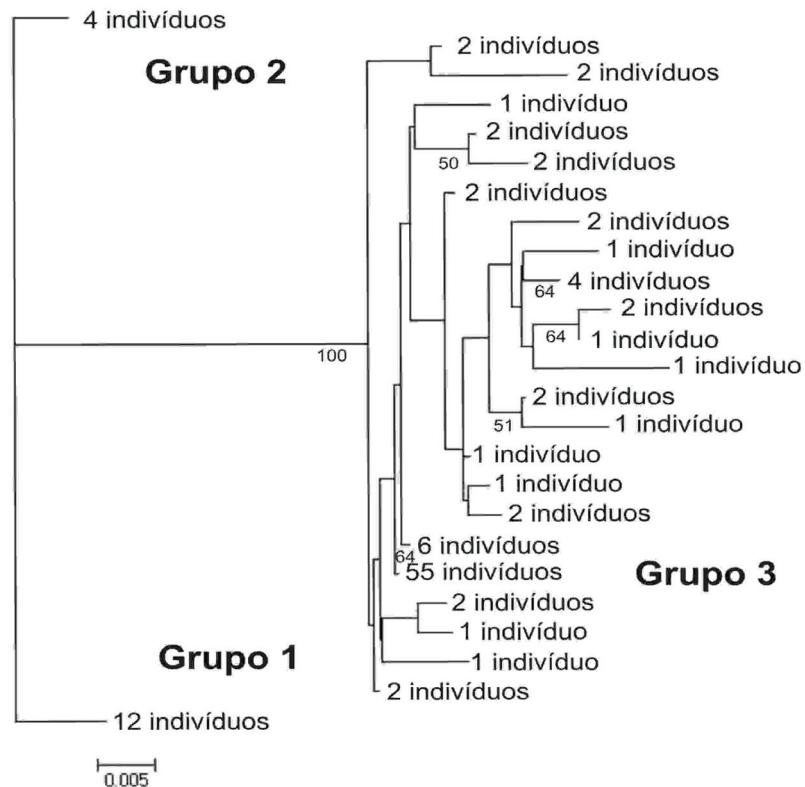
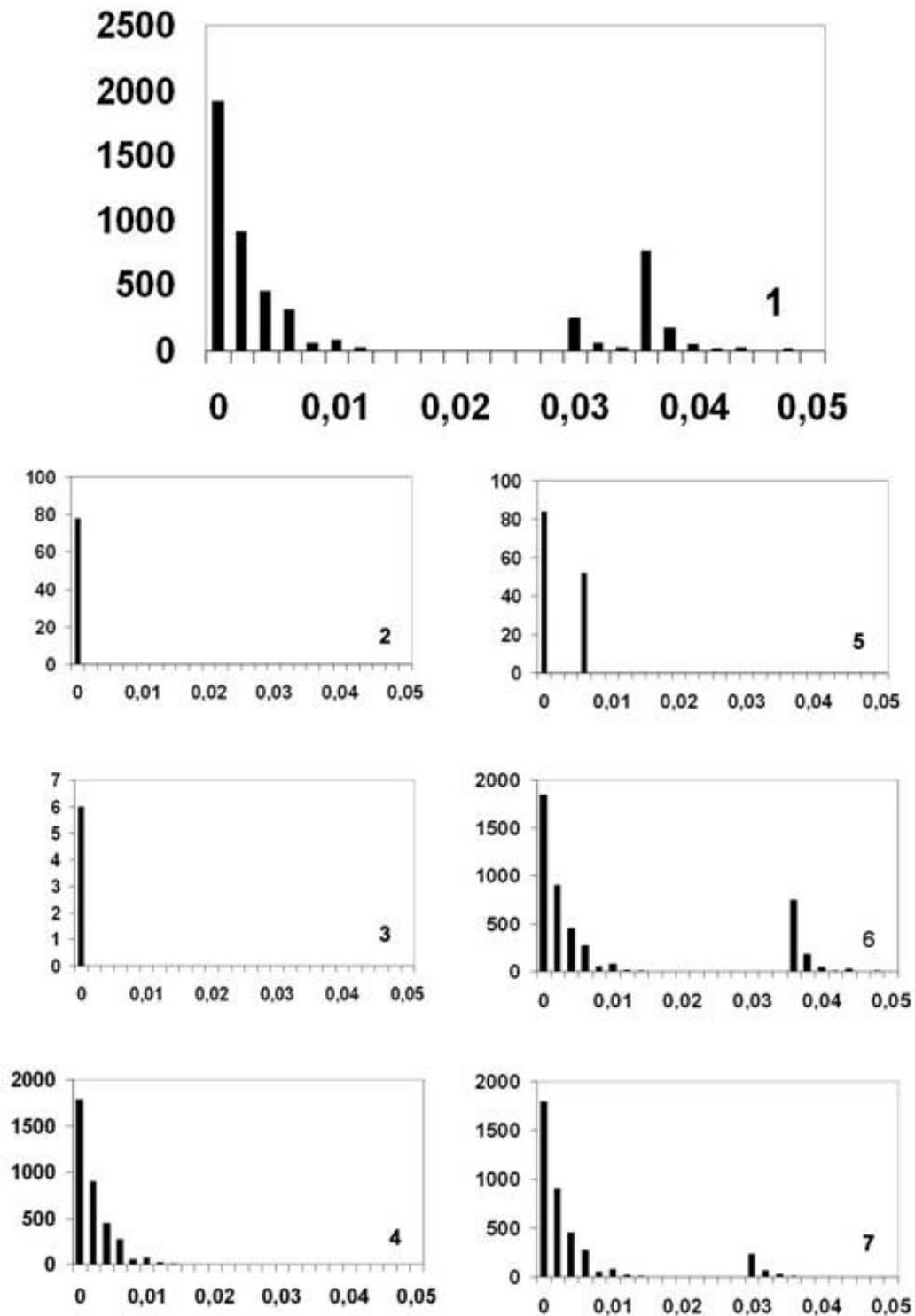


Figura 3. Gráficos com as distâncias genéticas pareadas entre os indivíduos amostrados: 1- Distâncias entre todos os haplótipos; 2- Distâncias dentro do Grupo 1; 3- Distâncias dentro do Grupo 2; 4- Distâncias dentro do Grupo 3; 5- Distâncias entre os Grupos 1 e 2; 6- Distâncias entre os Grupos 1 e 3; 7- Distâncias entre os Grupos 2 e 3.



## 8. Referências Bibliográficas

ARNOLD, M.L. Natural hybridization as an evolutionary process. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** n.23, p.237-261, 1992.

BUCKLIN, A.; GUARNIERI, M.; HILL, R.S.; BENTLEY, A.M.; KAARTVEDT, S. Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive, species-specific PCR. **Hidrobiologia.** n. 401, p. 239-254, 1999.

DOWLING, T.E.; SECOR, C.L. The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** n.28, p.593-619, 1997.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; de WAARD, J.R.; Biological identification through DNA barcode. **Proc. Of the Royal Soc. Of London.** Ser. B, Biological sciences, n.279, p. 313-322, 2003.

HEBERT, P.D.N.; STOECKLE, M.Y.; ZEMLAK, T.S., FRANCIS, C.M. Identification of birds through DNA barcodes. **PloS Biol.** v.2, i.10, e.312, 2004.

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

HUBERT, N.; HANNER, R.; HOLM, E.; MANDRAK, N.E.; TAYLOR, E.; BURRIDGE, M.; WATKINSON, D.; DUMONT, P.; CURRY, A.; BENTZEN, P.; ZHANG, J.; APRIL, J.; BERNATCHEZ, L. Identifying canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PloS One* [www.plosone.org](http://www.plosone.org). v. 3, i.6, e2490, 2008.

IVANOVA, N.V.; ZEMLAK, T.S.; HANNER, R.H.; HEBERT, P.D.N. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. **Molecular Ecology Notes.** n. 7, p. 544-548, 2007.

MAIA, E.L. ; OLIVEIRA, C.C.S. de; SANTIAGO, A.P.; CUNHA, F.E.A.; HOLANDA, F.C.A.F.; SOUSA, J.A. Chemical composition and lipids classes of the freshwater fish "Curimatã comum", *Prochilodus cearensis*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** , Campinas, v. 19, n. 3, 1999.

MOLBO, D.; MACHADO, C.A.; SEVENSTER, J.G.; KELLER, L.; HERRE, E.A. Cryptic species of fig-pollinating wasps: Implications for the evolution of the fig-wasps mutualism, sex allocation, and precision of adaptation. **PNAS.** v. 100, n. 10, p. 5867-2872, 2003.

MOREIRA, A.A.; HILSDORF, A.W.S.; da SILVA, J.V.; de SOUZA, V.R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesq. agropec. bras., Brasília,** v.42, n.4, p.521-526, 2007.

MOYER, G.R.; WINEMILLER, K.O.; McPHEE, M.V.; TURNER, T.F., Historical demography, selection, and coalescence of mitochondrial and nuclear genes of *Prochilodus* species of Northern South America. **Evolution**. v. 3, n. 59, p.599-610, 2005.

MULLIS K. B.; FALOONA F. A., Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.** n.55, p. 335-350. 1987.

POSADA, D. Jmodeltest: Phylogenetic model averaging. **Mol. Biol. Evol.** N.25, v.7, p.1253–1256, 2008

RHYMER, J.M.; SIMBERLOFF, D. Extinction by hibridization and introgression. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** n. 27, p. 83–109, 1996.

RONQUIST, F.; KUELSENBEC, J. P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics.** n.19, p.1572-1574. 2003.

SEUTIN, G.; WHITE, B. N.; BOAG, P. T. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analysis. **Canadian J. Zool.** n. 69, p. 82-90., 1991.

SWOFFORD, D. L.; PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. **Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.** 2000.

TAPHORN, D.C.; The characiforme fishes of the Apure River drainage, Venezuela. **BioLlania. Edición especial** n. 4, p. 516-533, 1992.

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**, submitted, June 1994.

TURNER, T.F.; McPHEE, M.V., CAMPBELL, P.; WINEMILLER, K.O. Phylogeography and interspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers in North South America. **J. of Fish Bio.** n. 64, p. 186-201, 2004.

WARD, R.D.; ZEMLAK T.S.; INNES, B.H.; LAST, P.R.; HERBERT, P.D.N. DNA barcoding Australia's fish species. **Phil. Trans. R. Soc. B.** published online n360, p. 1847–1857, 2005.

WELCOMME, R.L.; Status of fisheries in south American Rivers. **Interciencia.** n.15, p.337-345, 1990.

WOESE, C.R.; FOX, G.E. Phylogenetic structure of the prokariotic domain: The primary kingdoms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** V.64, n.11, p.5088-5090, 1977.

WOESE, C.R. Interpreting the universal phylogenetic tree. **PNAS.** v.97, n.15, p.8392-8396, 2000.

