



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO



RAINARA MORAES AMARAL

**Uso do DNA *barcode* para investigar medidas de diversidade filogenética
em comunidades de peixes amazônicos no Nordeste do Pará, Brasil**

Belém – PA
2021

RAINARA MORAES AMARAL

Uso do DNA *barcode* para investigar medidas de diversidade filogenética em comunidades de peixes amazônicos no Nordeste do Pará, Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e pesca da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Jonathan Stuart Ready

Belém – PA
2021

RAINARA MORAES AMARAL

Uso do DNA *barcode* para investigar medidas de diversidade filogenética em comunidades de peixes amazônicos no Nordeste do Pará, Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e pesca da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

Data: 28/01/2021

Orientador:

Prof. Dr. Jonathan Stuart Ready
(UFPA – Núcleo de Ecologia Aquática e Pesca da Amazônia)

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Costa Andrade
(UFPA - Núcleo de Ecologia Aquática e Pesca da Amazônia)

Prof. Dr. Fábio Fernandes Roxo
(UNESP – Campus Botucatu)

Prof. Dr. Daniel Cardoso de Carvalho
(PUC - Minas)

Suplentes:

Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales
(UFPA - Núcleo de Ecologia Aquática e Pesca da Amazônia)

Prof. Dr. Bruno Francelino de Melo
(UNESP – Campus Botucatu)

Belém – PA
2019

“A arrogância do homem é pensar que a natureza está sobre
o nosso controle... E não o contrário!”

(Filme: Godzilla, 2014)

AGRADECIMENTOS

Quero primeiramente agradecer ao meu tão bondoso e amado Deus! Ao contrário da maioria dos casos, o conhecimento só me aproximou mais Dele. Ele me deu os ingredientes para chegar até aqui, quão extraordinário é poder contemplar a Fé e a Ciência! Obrigada meu Pai!

Agradeço também aos meus maravilhosos pais, Deni e Renivaldo, tudo é por eles e para eles, todo sacrifício feito por mim prometi nunca ser em vão, não tenho palavras que possam expressar toda minha gratidão. Estendo meu reconhecimento à toda minha família, sem exceção, especialmente ao meu lindo irmão, Renan Amaral, por toda parceria e admiração. Amo a família que tenho, sempre me apoiando em tudo! Muito obrigada! Ainda falando em família, não posso deixar de agradecer a família do meu esposo por todo carinho e, claro, ao meu esposo também, Renan Sabino, por todo companheirismo nessa longa jornada. Amo vocês!

Mas um dos principais responsáveis por essa conquista é meu querido orientador, Jonathan Stuart Ready, confesso que odiei ele no início, rrsrs, mas não poderia ter tido um melhor mentor! Cheguei engatinhando e ele me ajudou a ficar em pé e a dá meus primeiros passos. Obrigada por ter me aceitado e por toda paciência comigo! Posso não demonstrar muito, mas te adoro “prof”!

Agradeço às minhas amadas amigas de longa data, Adriele, Yuli e Vanessa, por estarem comigo desde o início e aos meus incríveis amigos de laboratório, Andressa, Rasna, Cíntia, Carol, Luíz, Alan e, principalmente, Fabrício por ter se tornado quase meu coorientador nas últimas análises, dedicando uma boa parte do seu tempo comigo, sempre paciente e espetacular! Muito obrigada GIBI!!!

Finalmente, agradeço a UFPA e a CAPES pela oportunidade e apoio financeiro. E a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram a alcançar esse objetivo.

Muito, muito obrigada!

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Diversidade ictiológica.....	1
1.2 DNA <i>barcode</i>	3
1.3 Cobertura geográfica	5
1.4 Medidas de diversidade biológica.....	5
1.5 Nordeste do Pará ou Área de endemismo de Belém	6
2. Objetivos	8
2.1 Objetivo geral.....	8
2.2 Objetivos específicos.....	8
3. Material e Métodos	9
3.1 Amostragem	9
3.2 Análise molecular.....	10
3.3 Análise de dados.....	11
3.3.1 Análises genéticas	11
3.3.2 Análises de diversidade	11
4. Resultados	13
4.1 Análises genéticas	13
4.2 Análises de diversidade	17
5. Discussão	19
5.1 Análises genéticas	19
5.2 Análises de diversidade	21
6. Conclusão	23
7. Referências Bibliográficas	24
Anexos	35

RESUMO

Muitos grupos de seres vivos como os peixes são extremamente numerosos e diversificados, nessa perspectiva, a diversidade ictiológica sempre foi muito estudada no meio científico, com atenção especial à fauna neotropical. Porém, os peixes da região são tão numerosos e variados que as diferenças morfológicas podem ser muito sutis e é difícil dominar a identificação de todos os grupos taxonômicos. Dessa forma, a utilização de métodos taxonômicos alternativos complementares ao morfológico, como o DNA *barcode*, tem sido adotado para acelerar e assegurar a discriminação correta das espécies. Os dados de DNA *barcode* também auxiliam na avaliação da diversidade biológica em comunidades e ecossistemas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi produzir um banco referencial de DNA *barcode* para peixes da área de endemismo de Belém e verificar a importância dessa informação genética para medidas de diversidade. Entre 2008 e 2011, mais de 500 amostras de tecido foram coletadas durante coletas ecológicas trimestrais padronizadas em 12 localidades nas cinco principais bacias hidrográficas no nordeste do Pará. Ferramentas analíticas do BOLD foram aplicadas ao conjunto de dados e índices de diversidade taxonômica e filogenética foram gerados para avaliação da diversidade. Nesse primeiro banco referencial de dados de DNA *barcode* para peixes de água doce dessa região as identificações moleculares, em sua maioria, corresponderam às morfológicas, exceto em alguns táxons que apresentaram espécies crípticas. Este é o primeiro estudo que emprega dados de DNA *barcode* para a investigação da diversidade filogenética de peixes da região Amazônica, comparando comunidades de rios menores e maiores ao longo do tempo, destacando a influência da sazonalidade no comportamento dos índices. A ausência de agrupamentos sazonais de eventos amostrais, quando analisamos rios de menor ordem baseado em diversos índices de diversidade, mostra que a sazonalidade de amostragem influencia menos do que as condições abióticas distintas do ambiente. A direção de resposta dos índices taxonômicos é diferente, refletindo a tendência das métricas a responder de forma distinta as abundâncias relativas entre as espécies (maior ou menor equitabilidade), e isso é mais claro na segregação de eventos amostrais de estações do ano quando analisamos rios de maior ordem. Contudo, a porcentagem de explicação conjunta dos índices filogenéticos NTI e NRI têm a maior relevância explicativa ($R^2 = 0.473$) na estruturação das comunidades de peixes de pequenos riachos indicando que as comunidades nestes menores rios apresentam variações nas tendências de *taxonomic clustering*. Também indica que métricas utilizando informação filogenética devem ser consideradas informativas para interpretar mudanças na fauna de peixes nestes sistemas.

Palavras-chave: Identificação genética, sazonalidade, ordens de rios.

ABSTRACT

Many groups of living beings such as fish are extremely numerous and diverse. In this perspective, ichthyological diversity has always been studied in the scientific community, with special attention to neotropical fauna. However, the fish in the region are so numerous and varied that morphological differences can be very subtle and it is difficult to master the identification of all taxonomic groups. Thus, the use of alternative taxonomic methods complementary to morphology, such as DNA barcoding, has been adopted to accelerate and ensure the correct discrimination of species. DNA barcode data also assists in the assessment of biological diversity in communities and ecosystems. Therefore, the objective of this work was to produce a DNA barcode reference library for fish from the endemic area of Belém and to verify the importance of this genetic information for diversity measures. Between 2008 and 2011, more than 500 tissue samples were collected during standardized quarterly ecological collections in 12 locations in the five main hydrographic basins in northeastern Pará. BOLD analytical tools were applied to the data set and taxonomic and phylogenetic diversity indices were generated to assess diversity. In this first reference database of DNA barcode data for freshwater fish in this region, the molecular identifications correspond mostly to the morphological ones, except in some taxa that have cryptic species. This is the first study that uses DNA barcode data to investigate the phylogenetic diversity of fish in the Amazon region, comparing communities of smaller and larger rivers over time, highlighting the influence of seasonality on the behavior of the indices. The absence of seasonal clusters of sampling events, when we analyze rivers of lesser orders based on different diversity indices, shows that the sampling seasonality influences less than the distinct abiotic conditions from each environment. The response direction of the taxonomic indices is different, reflecting the tendency of the metrics to respond differently to the relative abundances between species (greater or less equitability), and this is clearer in the segregation of sampling events of seasons when analyzing higher order rivers where seasonal variation in water levels is more constant. Overall, the combined percentage of explanation of the NTI and NRI phylogenetic indexes has the greatest explanatory relevance ($R^2 = 0.473$) in the structuring of small stream fish communities indicating that communities in these smaller rivers show variations in taxonomic clustering trends. It also indicates that metrics using phylogenetic information should be considered informative to interpret changes in fish fauna in these systems.

Keywords: Genetic identification, seasonality, river orders.

1. Introdução

A vida na terra é muito diversa e vários são os obstáculos para se mensurar toda essa riqueza de espécies. Estima-se que existam entre 8,7 a 20 milhões de espécies de plantas, animais e fungos, e que desse total apenas 1,8 milhões já foram formalmente descritas até o momento (Pennisi, 2019). Ainda deve ser considerada que muitas podem ainda estar erroneamente identificadas (Grella *et al.*, 2015; Yang & Rannala, 2017), o que pode afetar vários fatores como por exemplo a real noção sobre a biodiversidade (Bickford *et al.*, 2007), o planejamento de conservação da fauna existente (Knebelberger *et al.*, 2015) e a modelagem de distribuição de espécies (Costa *et al.*, 2015).

As iniciativas de proteção à biodiversidade necessitam de uma série de informações sobre as formas de vida existentes a fim de entender o papel desempenhado pelos organismos e sua interação com o meio (Mace, 2004; Bickford *et al.*, 2007). De fato, sabe-se o quão importante é fazer o reconhecimento dessa biodiversidade quando se fala em preservação, uma vez que a frequência dos impactos antropogênicos dificulta a identificação de toda a riqueza que ainda existe (Bunce *et al.*, 2008; Vačkář *et al.*, 2012; Elahi *et al.*, 2015).

Muitos grupos de seres vivos como os peixes são extremamente numerosos e diversificados (Brosse *et al.*, 2013), apresentando várias formas e configurações que dificultam a identificação e conseqüentemente podem causar complicações taxonômicas (Dettai *et al.*, 2011; Hanisch *et al.*, 2017), essas variações vão desde o tamanho e formato do corpo a padrões de coloração e características de nadadeiras, as vezes sendo diferenças tão sutis ao ponto de não serem o suficientemente informativas para uma fácil discriminação (Xu *et al.*, 2021), o que exige um árduo trabalho de especialistas que já são muito escassos no mercado (Keat-Chuan *et al.*, 2017). Além disso, a degradação do seu habitat natural, bem como, a sobre pesca e as mudanças climáticas ameaçam essa biodiversidade que, por sua vez, pode nunca ser verdadeiramente registrada.

1.1 Diversidade ictiológica

A diversidade ictiológica sempre foi muito estudada no meio científico (Levêque *et al.*, 2007;), com atenção especial à fauna neotropical (De Pinna, 2005; Lasso *et al.*, 2016). Mesmo assim, ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas a respeito do conhecimento desta ictiofauna, pois além de constituírem um grupo numeroso e variado, dentro de cada grupo as diferenças morfológicas podem ser muito sutis e, portanto, torna-se difícil dominar a

identificação de todos os grupos taxonômicos e ainda identificar de forma padronizada e regularizada milhares de espécimes para estudos ecológicos (Kumar *et al.*, 2011). Além disso, a taxonomia baseada em caracteres morfológicos muitas vezes não é informativa suficiente para identificação de peixes em certos estágios de desenvolvimento, bem como no reconhecimento a partir de fragmentos ou partes do corpo dos indivíduos (Ward *et al.*, 2009).

Estima-se que cerca de 35.588 espécies válidas de peixes já tenham sido registradas, com uma parcela significativa pertencente ao ecossistema de água doce (Fricke *et al.*, 2020), sendo a região tropical o local de maior parte dessa riqueza (Albert *et al.*, 2011). Os maiores representantes de peixes de água doce neotropicais pertencem à classe dos Actinopterygii, que inclui importantes ordens como: Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Cichliformes; dominado por certas famílias: Characidae, Loricariidae e Cichlidae, (Malabarba e Malabarba, 2020).

De acordo com trabalhos anteriores, a riqueza na Amazônia compreendia principalmente as ordens Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes e Perciformes (Mendoza *et al.*, 2005; Brejão *et al.*, 2013; Garavello e Oliveira, 2014; Silva-Oliveira *et al.*, 2016; Dagosta e Pinna, 2017). Entretanto, após análises moleculares recentes alguns grupos anteriormente pertencentes aos Perciformes passaram a compor a ordem dos Cichliformes (Betancur-R *et al.*, 2017), logo, pode-se considerar as ordens Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes e Cichliformes, como as mais comuns na Amazônia (Figura 1).

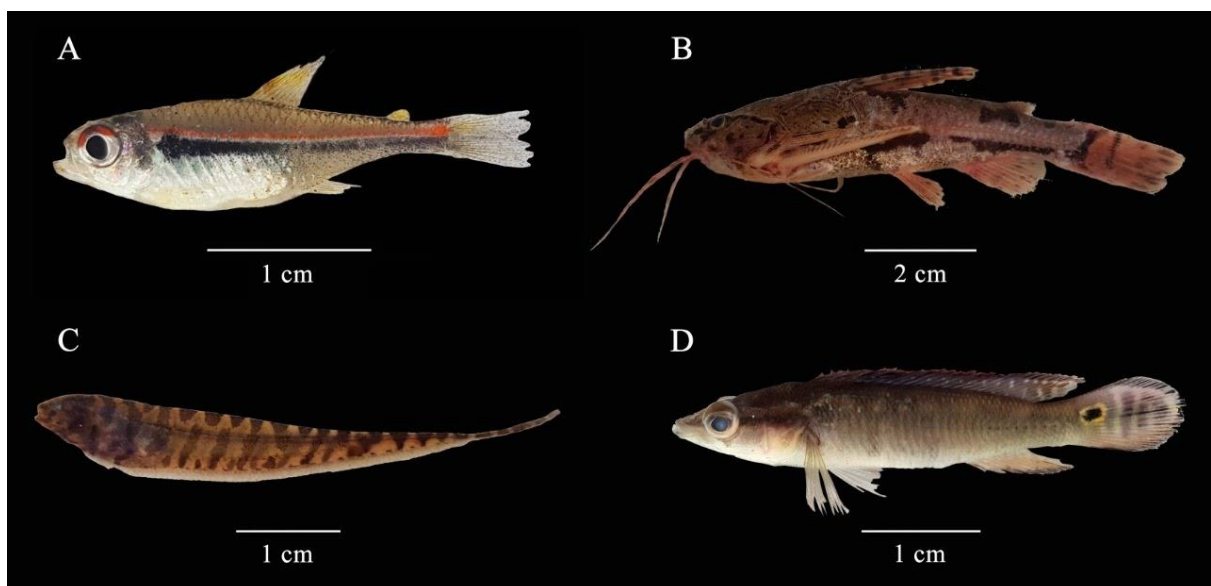


Figura 1 - Exemplares das ordens (A) Characiformes; (B) Siluriformes; (C) Gymnotiformes e (D) Cichliformes.

Considerando as crescentes ameaças à biodiversidade causadas pelos impactos ambientais, a necessidade de proteger a vida aquática torna indispensável o trabalho taxonômico, ao mesmo tempo em que desperta a preocupação da falta de agilidade e precisão nesse processo de identificação (De Carvalho *et al.*, 2007). Além da importância ecológica, os peixes também são de grande valor econômico como fonte de alimento, ornamentação e recreação. Dessa forma, claramente é preciso a utilização de métodos taxonômicos alternativos complementares ao morfológico tradicional, como o DNA *barcode*, a fim de acelerar e assegurar a discriminação correta desse grupo tão numeroso e diversificado (Costa & Carvalho, 2007).

1.2 DNA *barcode*

O DNA *barcode* é um meio de discriminação molecular de espécies ou linhagens, em sua maioria, a partir de uma sequência curta padronizada do gene citocromo c oxidase subunidade I (COI) do DNA mitocondrial (Hebert *et al.*, 2003) (Figura 2), outros marcadores também podem ser utilizados como complemento ao COI (Sanchez *et al.*, 2016;) ou, dependendo das características do grupo a ser identificado, como principal marcador (Vences *et al.*, 2005; Schoch *et al.*, 2012). Nas plantas, por exemplo, o uso de outros marcadores frequentemente tem tido mais sucesso do que o COI (Kress *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2015; Gill *et al.*, 2019).

O DNA *barcode* tem demonstrado ser capaz de identificar espécies em diversos grupos taxonômicos. Além disso, partes de organismos ou material degradado que não podem ser reconhecidos por meios tradicionais podem ser identificados usando DNA *barcode* como na detecção de fraudes em produtos comerciais de peixes (Cutarelli *et al.*, 2014; Veneza *et al.*, 2018), na identificação da flora tropical para conservação (Shapcott *et al.*, 2015), na verificação correta da fauna de espécies bioindicadoras (Morinière *et al.*, 2017) ou para confirmar a presença de espécies invasoras (Armstrong & Ball, 2005). Até mesmo na análise da dieta de várias espécies animais, inclusive para herbívoros como mamíferos, aves, insetos e moluscos (Valentini *et al.*, 2009).

Outra ferramenta importante para a aplicação dos dados do DNA *barcode* é o *metabarcode* que permite pesquisas e monitoramento das tendências e interações da

biodiversidade (Valentini *et al.*, 2016), essa ferramenta precisa de um banco referencial para que se possa comparar as sequências produzidas e determinar quais espécies estão representadas na amostragem. Desse modo, a necessidade da criação de bancos de dados de DNA *barcode* para os organismos é ecologicamente imprescindível. Em geral, 5 a 10 indivíduos de cada espécie foram utilizados para desenvolver os dados de referência nos sistemas BOLD (Hajibabaei *et al.*, 2007), mas a cobertura geográfica dessas amostras pode ser frequentemente limitada e a chance de identificar espécies distintas pode variar consideravelmente, dependendo do grau de divergência intraespecífica e interpopulacional.

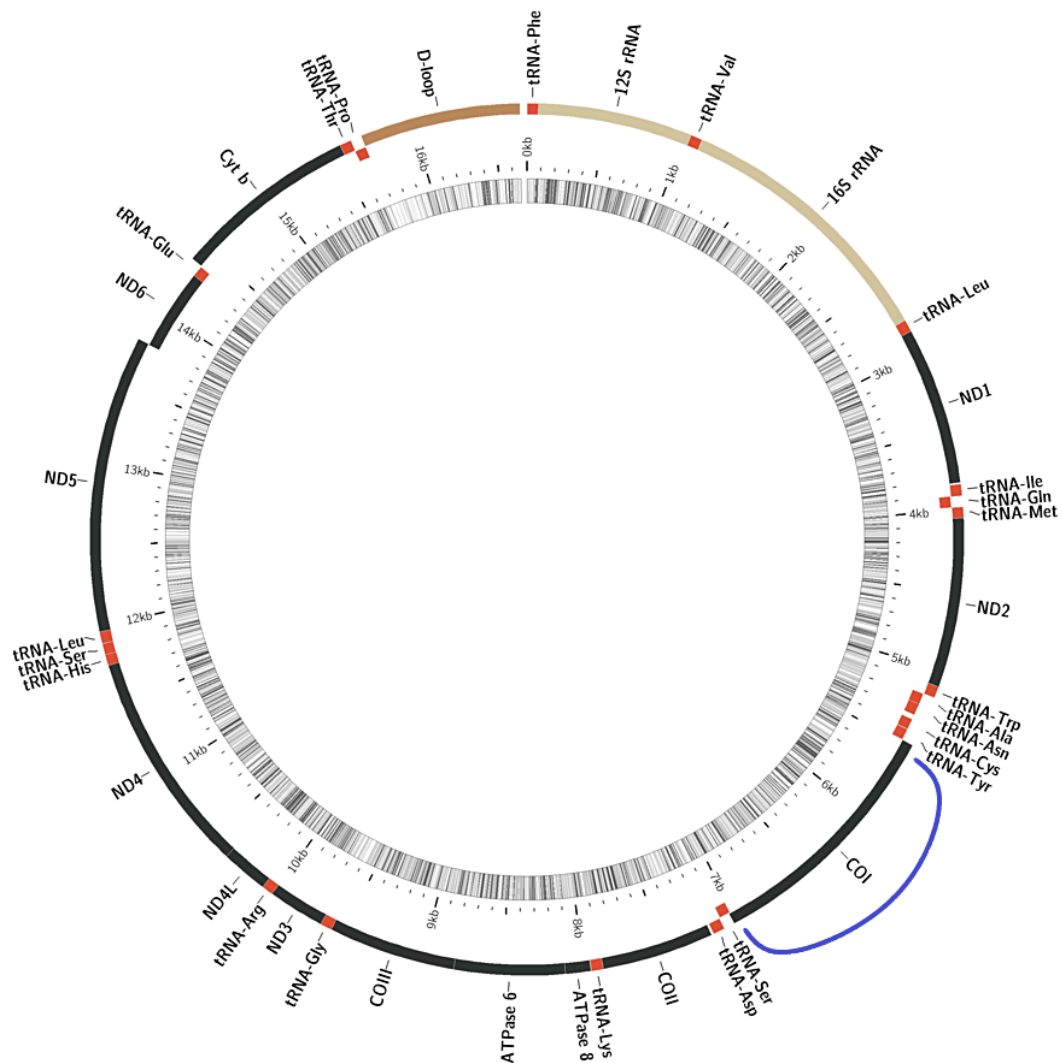


Figura 2 - Genoma mitocondrial de *Myloplus rubripinnis* (Characiformes: Serrasalminidae) destacando o gene citocromo c oxidase subunidade I (Modificado de Iwasaki *et al.*, 2013).

1.3 Cobertura geográfica

O tamanho da cobertura geográfica da amostragem pode ser importante devido aos mecanismos de isolamento envolvidos na diversificação dos diferentes grupos taxonômicos. Por exemplo, borboletas mostraram pouca divergência genética em amplas distribuições européias (Huemer *et al.*, 2014), enquanto a divergência alopátrica pode ser mais facilmente identificada em peixes por conta do isolamento geográfico entre as ilhas de habitats (Weigt *et al.*, 2012).

Mesmo que a extensa distribuição geográfica de determinados táxons nem sempre signifique uma condição necessária para a existência de padrões crípticos (Ahrens *et al.* 2013) algumas observações concluem sobre a importância de uma ampla amostragem para a detecção de espécies crípticas (Wu *et al.*, 2018). Portanto, deve-se pensar no sistema onde o estudo está acontecendo. Para peixes de água doce, as bacias hidrográficas representam ambientes isolados uns dos outros. Assim, a amostragem oriunda de diferentes bacias numa região é um fator importante, uma vez que se acredita que o padrão de diferenças genéticas entre espécies simpátricas é menor que o de espécies alopátricas (Lukhtanov *et al.*, 2009).

1.4 Medidas de diversidade biológica.

Os dados de DNA *barcode* também têm auxiliado na avaliação da diversidade biológica e suas implicações através de métodos que utilizam informações genéticas para medir essa diversidade em comunidades e ecossistemas (Aust *et al.*, 2015; Bononi *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2020). Muitas pesquisas ecológicas, principalmente as preliminares, que focaram em estimar a biodiversidade, levavam em consideração apenas a riqueza de espécies (contagem do número de espécies que ocorrem em um determinado local), medida essa que sempre deixou a desejar no meio científico quanto a quantidade de informação que estaria sendo perdida, pois nesse caso, uma espécie rara teria o mesmo peso que uma espécie comum (Cianciaruso *et al.*, 2009).

Por isso outros elementos começaram a ser considerados na hora de fazer essas estimativas como por exemplo a contribuição relativa de cada espécie na comunidade, a partir de então foram surgindo diversos índices para se medir a diversidade, dentre eles os mais conhecidos são os de Shannon-Wiener (Shannon, 1948) e o de Simpson (Simpson, 1949), que são os considerados índices tradicionais de diversidade, de maneira geral, esses índices combinam o número total de espécies e a quantidade de indivíduos por espécie presentes (Allen

et al., 2009). Enquanto Simpson realça o componente de uniformidade (Nagendra, 2002), Shannon-Wiener combina tanto a riqueza quanto a uniformidade (Pavoine e Bonsall, 2011).

Ainda assim o descontentamento com essas abordagens deu espaço para o surgimento de índices informativamente mais robustos, surgindo assim os índices de diversidade filogenética como o PD (*phylogenetic diversity*) que corresponde à soma do comprimento dos ramos de uma árvore para saber as diferenças filogenética entre as espécies de uma dada comunidade (Faith, 1992); o MPD (*mean pairwise distance*) e MNTD (*mean nearest neighbor distance*) que consideram apenas a topologia da árvore, uma vez que, para se obter uma medida de diversidade, relativamente confiável, através do comprimento dos ramos seria essencial sequenciar mais de um gene (Webb, 2000); o NRI (*net relatedness index*) e o NTI (*nearest taxon index*) que são versões padronizadas do MPD e MNTD, respectivamente e comparam as medidas observadas com modelos nulos de comunidade (Webb, 2000).

Dentre outros índices que passaram a promover informações evolutivas acerca dos indivíduos da comunidade, substituindo a unidade básica anteriormente analisada “espécies” por “características de espécies” (Faith *et al.*, 2009). E para fins de conservação, a informação filogenética poderia ser um melhor indicador do que as abordagens com dados de riqueza de espécies apenas (Schweiger *et al.*, 2008).

Essa forma de abordagem não só ampliou as medidas de diversidade como também permitiu inferir quais possíveis processos atuaram no surgimento e/ou manutenção de uma comunidade (Webb, 2002). Mais índices vêm sendo criados ou remodelados no decorrer do tempo, como os índices de diversidade funcionais que levam em consideração outros contextos, consequentemente fornecendo novas informações, no entanto eles não serão tratados aqui.

1.5 Nordeste do Pará ou Área de endemismo de Belém

Essa região por estar localizada na bacia Amazônica concentra muitas espécies de peixes de água doce com uma variedade de habitats indiscutivelmente complexos (Barletta *et al.*, 2010). Representa as bacias Amazônicas ao leste do Rio Tocantins como as do Caeté, Guamá/Capim, Maracanã/Jeju, Marapanim, Quatipuru, entre outras.

Mesmo que fosse mais coerente determinar o limite de uma área de trabalho aquático considerando o FEOW - Ecoregion: Amazonas Estuary & Coastal Drainages (**Ecoregion ID:** 323, <https://feow.org/ecoregions/interactive-map>), essa delimitação, em geral, representa

bacias e rios maiores e a fauna dos igarapés pode não ser tão similar entre igarapés nestas áreas. Uma área muito extensa como essa do FEOW pode ter faunas distintas de igarapés como as da Ilha de Marajó e outras drenagens devido a complexos processos históricos da formação da delta do Rio Amazonas. Por isso a presente área de estudo corresponde melhor ao limite terrestre da área de endemismo de Belém (Figura 3).

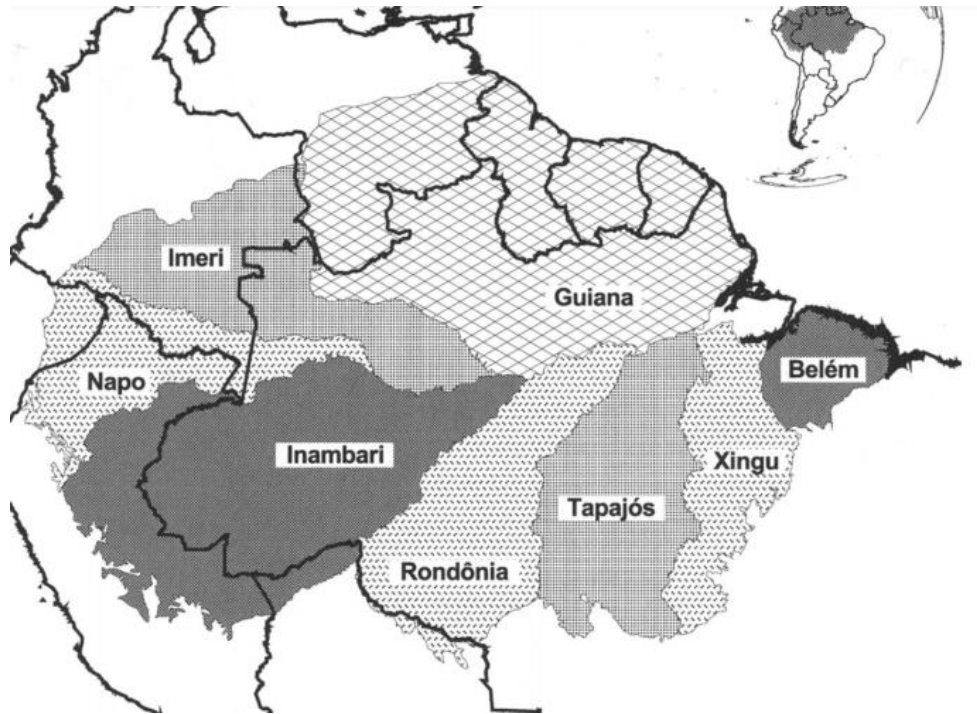


Figura 3 - Áreas de endemismo na Amazônia de acordo com os limites para vertebrados terrestres (Da Silva *et al.*, 2005).

Apesar de atualizações recentes sobre o número de espécies de peixes descritos na Bacia Amazônica (Valsecchi *et al.*, 2017), o próprio tamanho considerável dessa fauna, bem como a dificuldade de acesso a pontos de amostragem ainda limitam o reconhecimento completo dessa ictiofauna (Albert *et al.*, 2011), por isso provavelmente muitas espécies ainda podem não terem sido descritas ou até mesmo erroneamente identificadas.

Diante disso, levando-se em consideração os problemas associados a carência de informações sobre a ictiofauna da área de endemismo de Belém, bem como a falta de um padrão de amostragem que reflita a verdadeira realidade da biodiversidade estudada é de suma importância criar um conjunto de dados referentes a diversidade local e analisar o perfil da cobertura geográfica em termos de modelo amostral e junto com isso fornecer dados de

estrutura filogenética a fim de ajudar a descrever o padrão de diversidade nessa região mega diversa.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Produzir um banco referencial de DNA *barcode* para peixes amazônicos da área de endemismo de Belém e com isso verificar a importância da informação genética para medidas de diversidade em rios/igarapés de 1-2 e 3-4 ordens na região.

2.2 Objetivos específicos

- Aumentar a cobertura espacial coletando e sequenciando amostras representando cada morfoespécie conhecida da região para determinar possíveis novas linhagens crípticas alopátricas;
- Avaliar o número de possíveis linhagens crípticas encontradas em relação a cobertura de espécies por bacia hidrográfica;
- Verificar como índices filogenéticos e taxonômicos respondem ao contexto estrutural das comunidades nos períodos seco e chuvoso.

3. Material e Métodos

3.1 Amostragem

Mais de 500 amostras de tecido foram coletadas entre 2008 e 2011 como parte da amostragem ecológica em andamento de 12 localidades nas cinco principais bacias hidrográficas (Guamá) no nordeste do estado do Pará (Figura 4). As coletas foram feitas com uma rede de arrasto pequena de malha fina a cada 3 meses sob licenças de coleta SISBIO 12773-1 e 13248-1 do ICMBio e com aprovação ética (CEUA. 68-2015 pelo Comitê de Ética no Uso dos Animais da Universidade Federal do Pará). Durante cada evento de amostragem, até 3 indivíduos de cada peixe morfológicamente distinto foram sacrificados, fotografados e uma amostra de tecido removida antes da fixação dos espécimes voucher em formalina. O voucher e a amostra de tecido de cada espécime foram registrados com o mesmo código exclusivo. A identificação morfológica foi feita usando literatura taxonômica específica e com a ajuda de vários ictiólogos brasileiros (Douglas Bastos, Ricardo Britzke, Janice Cunha, Guilherme Dutra, Andre Ferreira Netto, Ilana Fichberg, Flávio Lima, Luis Malabarba, Claudio Oliveira, Henrique Varella, Wolmar Wosiacki, Claudio Zawadski) usando imagens compartilhadas ou durante visitas ou congressos.

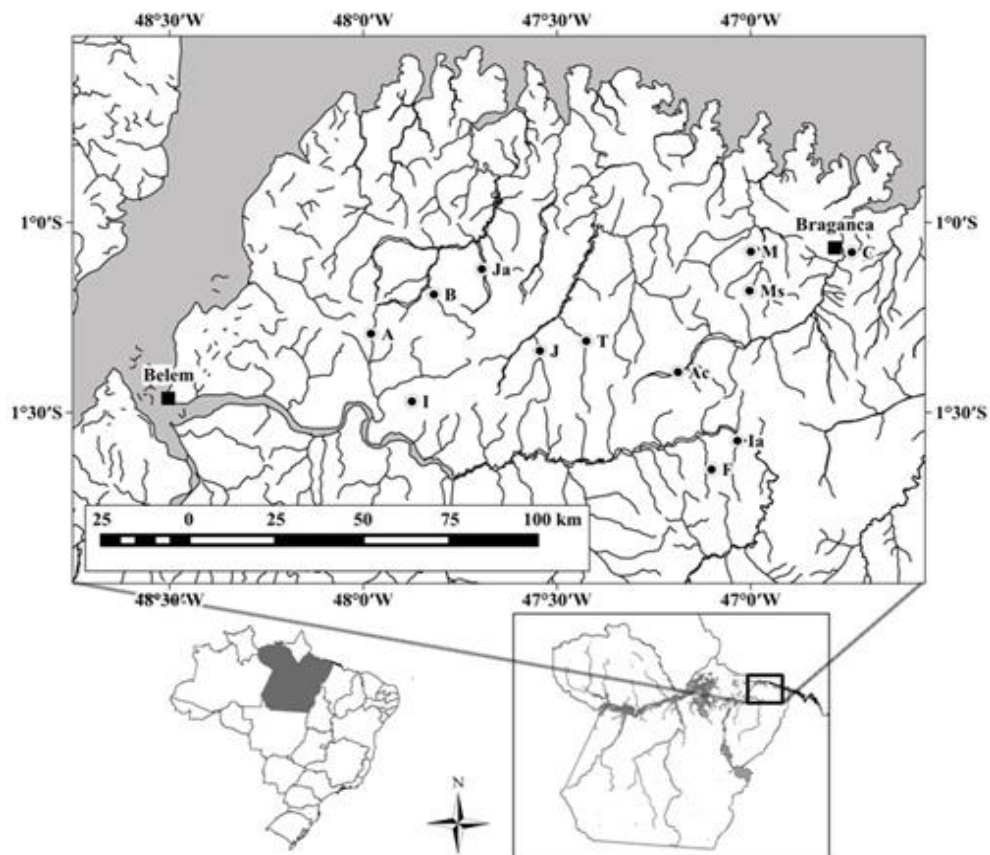


Figura 4 - Região de amostragem. Os conjuntos de letras (A, I, Ia, F), (B, Ja), (J, T), (Ac, C) e (M, Ms) representam os pontos de coleta nas bacias do Guamá, Marapanim, Jeju/Maracanã, Caeté e Quatipuru, respectivamente.

Da coleção maior de tecido, 400 amostras foram selecionadas para sequenciamento, a fim de maximizar a probabilidade de identificação de espécies crípticas alopátricas em toda a gama e maximizar as informações para incorporação de índices de diversidade filogenética em análises ecológicas. Foi considerado também a variação observada nos parâmetros ambientais entre os locais de amostra (por exemplo, tentando, sempre que possível, sequenciar o mesmo morfotipo de locais com pH ou condutividade mais altos e mais baixos, com valores notavelmente mais altos para esses parâmetros para locais na bacia de drenagem do Maracanã). A seleção das amostras incluiu também informações obtidas durante as fases de reavaliação da identificação com base em análises preliminares das sequências produzidas, revisão morfológica detalhada e novas descrições morfológicas feitas no decorrer do projeto.

3.2 Análise molecular

O DNA foi extraído usando um protocolo CTAB (fenol-cloroformio) adaptado do Doyle & Doyle (1990) ou o kit DNeasy com o protocolo Mouse Tail (QIAGEN). Um fragmento de 661 pb da região 5' do gene mitocondrial COI foi amplificado através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando o par de primers LIICO1F (5'-GATTTTTCTCAACTAACCAYAAAGA-3') e LIICO1R (5'-ACTTCTGGGTGTCCGAARAAAYCARAA-3') (Cardoso et al., 2018). Para cada 24 amostras utilizou-se um mix de PCR contendo 172,5µl de H₂O, 48µl de dNTP 1,25mM, 30µl de tampão 10X, 18µl de MgCl₂ 50mM, 3µl de cada primer (10µM), 1,5µl de Taq Polimerase (5U/µl) e 1µl de DNA. As reações foram realizadas em um termociclador sob condições que consistiram em: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 25s, anelamento a 50°C por 40s e extensão a 72°C por 45s, com extensão final de 72°C por 5 min. O sucesso da amplificação foi observado em gel de agarose a 1% corado com Gel Red (Biotium, Inc.).

O sequenciamento bidirecional de cada amostra foi realizado usando o kit BigDye v3.1 (Applied Biosystems) seguindo o protocolo do fabricante. O sequenciamento foi lido em um sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems).

3.3 Análise de dados

3.3.1 Análises genéticas

As sequências foram alinhadas no Geneious R9.1 e mapeadas para sequências de referência de espécies semelhantes identificadas através dos serviços de identificação BOLD. A verificação visual foi feita para todas as sequências e testes padrão (por exemplo, verificar se há códons de parada) realizados para identificar possíveis pseudogenes. Dentro do BOLD, uma árvore neighbor-joining (NJ) foi construída para todas as unidades taxonômicas usando o alinhamento MUSCLE e o modelo de distância Kimura 2-Parameters. Outras ferramentas analíticas dentro do BOLD foram então aplicadas ao conjunto de dados, incluindo o Barcode Gap Analysis, a Geographic Distance Correlation e o Barcode Index Number System (BIN). Todas as sequências que corresponderam ao padrão de qualidade exigido para o código de barras foram atribuídas a BINs.

3.3.2 Análises de diversidade

Para a geração dos índices de diversidade taxonômica foi utilizada a função “*diversity*”, com o argumento “*index*” preenchido por riqueza, shannon e simpson. Para os índices de diversidade filogenética foram utilizadas as funções “*pd*” para o índice PD, “*ses.mpd*” para os índices MPD e NRI e “*ses.mntd*” para os índices MNTD e NTI. Após esse processo, a análise de correlação de pearson foi utilizada para filtrar índices que possuem alta correlação dentro do conjunto de dados, sendo considerado um valor alto de correlação os pares de variáveis com $r \geq 0,70$. As variáveis com maior capacidade explicativa foram selecionadas em cada um dos pareamentos acima da faixa de corte.

Para visualizar e testar o modelo de cada período do ano, foi realizada a redução do conjunto de índices em duas dimensões através do escalonamento multidimensional não métrico (NMDS), com a função “*metaMDS*”. Essa técnica de ordenação reduz cada evento amostral de uma comunidade à uma coordenada num plano cartesiano bidimensional. A distância utilizada para gerar a ordenação foi a distância Euclidiana, que é útil quando os dados não possuem duplos zeros nas variáveis preditoras. O argumento ‘*scale = TRUE*’ foi utilizado para fazer com que cada variável seja comparável através de uma padronização por escores Z, que produz uma matriz com valores centralizados em média igual a zero e desvio padrão igual a 1.

Para a medição do nível de stress foram realizadas 20 tentativas da redução de dimensionalidade, sendo escolhida para análises posteriores a que produziu o menor valor. A métrica de stress é uma medida que verifica o quanto de distorção ocorre no conjunto de dados a partir da conversão da matriz de distância nos componentes bidimensionais do NMDS, sendo um valor mínimo de distorção o indicado para refletir melhor a realidade. A função “*envfit*” foi utilizada para avaliar o nível de correlação dos índices com os dois eixos de ordenação do NMDS (Borcard, 2011). A função produz um R^2 para cada variável, sendo útil para avaliar de forma independente o nível de correlação das variáveis preditoras com a matriz de abundância das comunidades (Benone *et al.*, 2020).

Todas as análises foram realizadas com os pacotes ‘*Picante*’ (Kembel *et al.*, 2010) e ‘*Vegan*’ (Oksanen *et al.*, 2019) no software R (R Core Team, 2020).

Análises adicionais de confiabilidade relativa aos valores dos índices devido efeitos de politomia e resolução de árvores filogenéticas distintas (complementando a falta de dados baseado em taxonomia de grupos maiores) serão feitas antes de submeter um manuscrito para publicação, mas não puderam ser completados no cronograma desta dissertação devido os atrasos relacionados a pandemia de COVID-19.

4. Resultados

4.1 Análises genéticas

Das 328 sequências de COI que foram produzidas e consideradas para atender as demandas de qualidade (tamanho > 600 bp, sem contaminação, sinais de pseudogenes e qualidade de cromatogramas), todas foram submetidas ao BOLD, elas corresponderam a 128 OTUs, 105 espécies, 74 gêneros, 27 famílias e 7 ordens. A ordem dominante foi dos Characiformes representada por 51 espécies ao passo que a ordem Synbranchiformes foi representada por apenas um indivíduo a nível de gênero. Em termos de cobertura de amostras por espécie, 51 (48%) das espécies foram representadas por três ou mais amostras, enquanto 31 (29%) das espécies foram representadas por apenas uma amostra.

A maioria das espécies foram discriminadas com o código de barras de DNA. Apenas uma sequência (a única sequência obtida para *Apistogramma agassizii*) foi excluída das análises, pois foi identificada no BOLD como um pseudogene. As frequências de nucleotídeos foram: G (18,19%), C (27,65%), A (24,10%) e T (30,07%). Um total de 130 BINs (*Barcode Index Numbers*) foram identificadas a partir das sequências submetidas ao BOLD, dos quais 79 foram BINs taxonomicamente concordantes com os registros no BOLD e 51 foram BINs *singletons* novos, ou seja, 51 novas potenciais espécies registradas para o BOLD. Não houve nenhuma discordância de BINs.

Os grupos de espécies que foram formados podem ser todos visualizados na árvore NJ que foi gerada pelo BOLD (Anexo - A). Na análise da lacuna do código de barras, para quase todas as espécies com mais de uma sequência, a divergência máxima dentro da espécie foi menor do que a distância para as espécies mais próximas. A exceção a isso foi *Hemigrammus cf. unilineatus*, onde possíveis linhagens crípticas extremamente divergentes em nossas amostras resultaram em maior associação de linhagens a outras espécies, sugerindo convergência no fenótipo externo entre espécies (talvez gêneros) distintos, e que merecem uma avaliação morfológica mais intensa para confirmar a identificação dessas amostras.

Prováveis linhagens crípticas também foram identificadas em *Astyanax bimaculatus*, *Moenkhausia oligolepis*, *Phenacogaster cf. pectinatus*, *Microcharacidium weitzmani*, *Nannostomus trifasciatus*, *Myloplus rubripinnis*, *Apistogramma cf. caetei*, *Laimosemion strigatus*, *Hypopygus lepturus*, *Sternopygus macrurus* e *Mastiglanis cf. asopos*, com base nas distâncias intraespecíficas médias >2,0%. A maioria dessas representam amostras alopátricas,

com separação mais frequente das linhagens da bacia do rio Guamá em relação às demais bacias hidrográficas. A distância K2P média dentro das espécies foi de 1,20%, porém muito maior entre congêneres (17,66%) e dentro das famílias (23,23%).

A espécie *Hoplias malabaricus* com valor máximo de divergência intraespecífica superior a 2,0% (2,31%), apresentou leve indício de isolamento por distância na análise da correlação entre distância geográfica e distância genética. O mesmo ocorreu com *M. oligolepis*, *L. strigatus*, *Curimatopsis crypticus*, *Crenicichla aff. inpa* e *Hyphessobrycon heterorhabdus* (Tabela 1), porém *C. crypticus* e *C. aff. inpa* com divergência intraespecífica máxima menor que 2,0% e *H. heterorhabdus* com 1,99%, isso pode fortalecer ainda mais a evidência de diversidade críptica para certas espécies, algumas formando linhagens segregadas por bacias, denotando uma provável especiação alopátrica (Figura 5) e outras ocorrendo no mesmo sistema de drenagem, indicando uma possível simpatria (Figura 6).

Tabela 1- Análise de correlação de distância geográfica (km) e genética (K2P) representada pelas seis espécies que apresentaram menores valores de P.

Species	Record Count	#BINs	Linear Regression Rsq	Linreg Slope	Gen Dist Max	Geo Mst Sum	Geo Dist Max	Mantel Rsq	Mantel Pvalue
<i>Hoplias malabaricus</i>	12	1	0.028	0.00443	2.273	205.817	132.201	0.028	0.08
<i>Curimatopsis crypticus</i>	6	1	0.727	0.00235	0.303	142.348	120.612	0.727	0.07
<i>Crenicichla aff. inpa</i>	5	1	0.969	0.00172	0.163	122.582	109.732	0.969	0.06
<i>Moenkhausia oligolepis</i>	9	1	0.183	0.03537	5.606	170.489	106.712	0.183	0.04
<i>Laimosemion strigatus</i>	7	1	0.211	0.06896	17.125	196.149	140.04	0.211	0.04

Hyphessobrycon heterorhabdus 10 1 0.774 0.02651 1.961 93.887 75.192 0.774 0.03

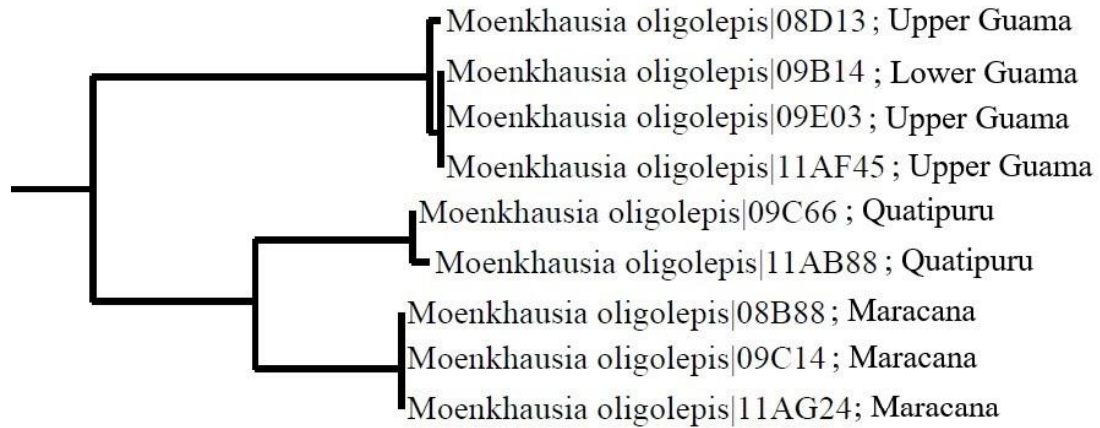


Figura 5 - Árvore filogenética (NJ) das sequências COI de *Moenkhausia oligolepis* demonstrando a separação de linhagens por diferentes bacias hidrográficas.

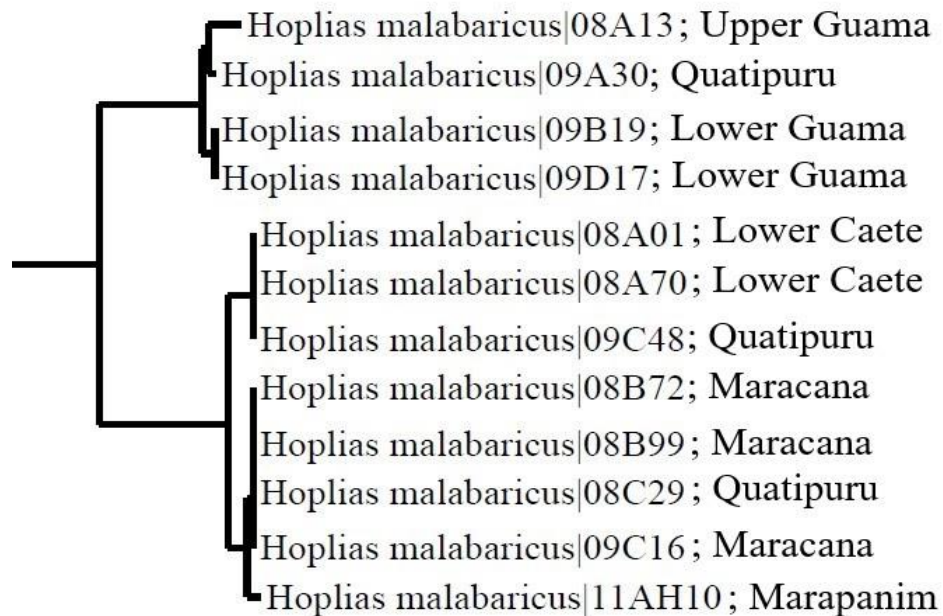


Figura 6 - Árvore filogenética (NJ) das sequências de COI de *Hoplias malabaricus* denotando uma possível simpatria com amostras das duas linhagens oriundas da bacia do Quatipuru.

A Tabela 2 mostra a importância do tamanho da cobertura geográfica para a detecção de linhagens crípticas, com destaque não só para o padrão encontrado entre a quantidade de bacias amostradas, mas também à amostragem ao longo do tempo. Os dados estão organizados

de maneira a mostrar o acúmulo de informação em termos do número de morfoespécies(M) e linhagens genéticas(Lg) reconhecidas ao longo dos anos de amostragem e considerando a quantidade de bacias em que ocorrem.

Olhando apenas para o Total (última linha da Tabela), sem levar em consideração a quantidade de bacias amostradas é possível notar que o total de morfoespécies e linhagens genéticas aumenta no decorrer dos anos (2009, 2010, 2011 e 2016), consequência do acúmulo de amostras com maior esforço amostral, com a quantidade de linhagens sendo sempre maior que a de morfoespécies, o que nos permite confirmar a importância da identificação molecular para a taxonomia, levando em conta que esses casos possam ser devidamente investigados, para uma possível futura decisão nomenclatural.

Agora olhando também para a quantidade de bacias hidrográficas onde linhagens distintas existem, observa-se um maior número de linhagens do que morfoespécies presentes em todos os anos para 1 bacia e nos dois primeiros anos para 2 bacias, enquanto tem um maior número de morfoespécies que linhagens em três ou mais bacias. Isso mostra que as novas linhagens resultantes da separação de indivíduos que pertencem às mesmas morfoespécies são em geral espécies crípticas alopátricas.

Tabela 2 - Comparativo de acumulação do número de morfoespécies (M) e linhagens genéticas (Lg) identificadas ao longo dos anos e classificadas quanto a quantidade de bacias em que ocorrem.

Quantidade de Bacias	2009		2010		2011		2016	
	M	Lg	M	Lg	M	Lg	M	Lg
1	45	63	46	66	61	86	61	87
2	26	27	26	27	25	24	25	24
3	17	16	17	16	20	19	20	19
4	6	4	6	4	10	9	10	9
5	2	1	2	1	2	1	2	1
Total	96	111	97	114	118	139	118	140

4.2 Análises de diversidade

A Tabela 3 mostra o resultado da análise de correlação de Pearson onde os índices que possuem alta correlação são destacados por seus valores estatisticamente significativos. Essa análise nos permitiu selecionar quais índices iriam fazer parte do conjunto de índices analisados. Logo, o Simpson e o PD foram os escolhidos para representarem o subconjunto de índices taxonômicos simples, e os índices NRI e NTI foram os representantes do subconjunto de índices de dispersão em termos de diversidade filogenética.

Tabela 3 - Correlação entre o conjunto de índices de diversidade utilizados no trabalho. Valores em negrito indicam forte correlação ($r \geq 0.7$).

Índices	Shannon	Simpson	MPD	NRI	MNTD	NTI	PD	Riqueza
Shannon	1.000							
Simpson	0.923	1.000						
MPD	-0.312	-0.230	1.000					
NRI	-0.300	-0.231	0.978	1.000				
MNTD	-0.340	-0.225	0.668	0.619	1.000			
NTI	-0.157	-0.160	0.549	0.539	0.869	1.000		
PD	0.369	0.128	-0.279	-0.211	-0.368	0.133	1.000	
Riqueza	0.390	0.146	-0.363	-0.301	-0.463	0.026	0.992	1.000

O resultado do NMDS/*envfit* não destacou nenhum agrupamento visível para os rios de menor ordem entre os períodos do ano, exibindo todos os índices significativos e correlacionados com a variabilidade dos dados. Os rios de maior ordem exibiram um agrupamento para comunidades do período seco e cheio, com os índices PD, NTI e NRI mais

relacionados ao período seco, enquanto o índice de Simpson foi mais relacionado ao período cheio (Figuras 7; Tabela 3).

Tabela 4: Resultado do *Envfit*. Valores em negrito indicam valores significativos ($p \leq 0.05$). NRI: índice da rede de parentesco; NTI: índice do táxon mais próximo; PD: diversidade filogenética de Faith.

Índices	1-2 ordem		3-4 ordem	
	R ²	p-valor	R ²	p-valor
NRI	0.322	0.001	0.198	0.001
NTI	0.151	0.004	0.104	0.025
PD	0.119	0.016	0.243	0.001
Simpson	0.195	0.001	0.201	0.001

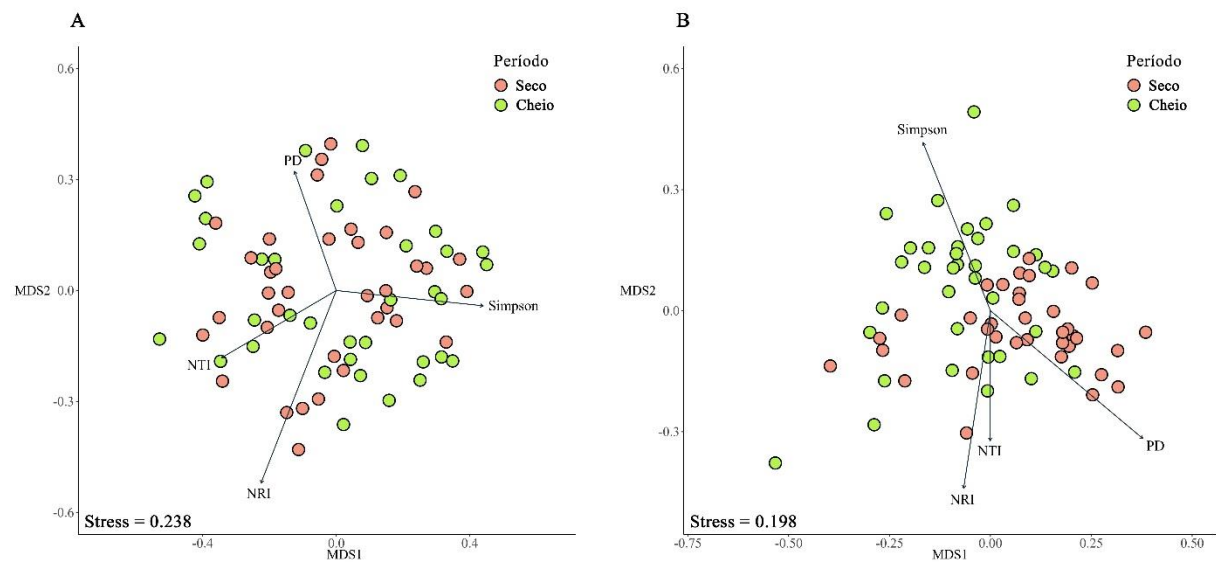


Figura 7 - *Envfit* aplicado aos eixos de ordenação do NMDs nos dois períodos do ano. Os pontos representam cada evento de amostragem, A) nos rios de 1/2 ordem; B) nos rios de 3/4 ordem.

5. Discussão

5.1 Análises genéticas

A produção de bibliotecas de DNA *barcode* mais abrangente é importante para fornecer suporte a futuros estudos promissores em diversas áreas, esse é o primeiro banco referencial de dados de DNA *barcode* para peixes de água doce dessa região, muitos bancos referenciais já vêm sendo construídos para outros organismos (Lobo *et al.*, 2016; Wirta *et al.*, 2016; Moriniere *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018) ou até mesmo para peixes de outras regiões de água doce (de Carvalho *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2016; Bagley *et al.*, 2019; Múrria *et al.*, 2020) e marinha (Ribeiro *et al.*, 2012; Knebelsberger *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2016; Limmon *et al.*, 2020).

Na análise de BIN não foi acusada nenhuma discordância. Uma boa parte (51/328 ou cerca de 15%) das amostras representam novos BINs para BOLD, as outras 277 amostras foram associadas a 79 BINs e concordantes com as identificações de espécies já existentes no BOLD. Essas amostras representam em média 3,5 amostras por BIN. A não discordância de BINs pode indicar uma fauna registrada relativamente bem avaliada, porém ainda não tão bem conhecida no que diz respeito ao número expressivo de novos BINs adicionados.

Como evidenciado pelo resultado da análise de BIN, em sua maioria, as identificações morfológicas corresponderam às moleculares considerando o efeito de espécies crípticas alopatricas (divergência intraespecífica maiores que 2.0%). É claro que se deve ter cuidado com os valores de divergência quando o número de amostras por espécie for baixo (Hanisch, *et al.*, 2017), em geral de 5 a 10 indivíduos por espécies são incluídos para desenvolver os dados no BOLD, no entanto esse tamanho de amostragem, possivelmente, não é o suficiente para recuperar as informações das distâncias genéticas confiavelmente, mas isso dependerá muito também do organismo em questão (Zhang *et al.*, 2010). E da cobertura espacial das amostras em relação à distribuição conhecida da espécie.

Aqui, apesar de não ter tido mais do que 10 indivíduos por morfoespécie para os táxons com divergência >2%, a detecção de linhagens crípticas putativas indica uma demanda para mais estudos nestes grupos. No caso de *Apistogramma cf. caetei*, a divergência já era esperada, pois apesar de ainda ser considerada como uma única espécie válida, espécies separadas por diferentes bacias na região já foram detectadas (Ready *et al.*, 2006). De forma similar, mas em outras regiões, *Moenkhausia oligolepis* também tem sido apontada como um complexo de espécies (Benine *et al.*, 2009).

Grande parte das espécies que apresentaram uma distância intraespecífica média maior que 2.0% tiveram linhagens exclusivas do Guamá, essa bacia compõe a última drenagem do lado sul do baixo Rio Amazonas (Garavello e Oliveira, 2014) logo, esse destaque pode se dá pelo fato dela ser mais conectada com o resto do Amazonas em relação às outras bacias costeiras, permitindo invasão da bacia por táxons novos após o Rio Amazonas mudar sua direção e misturando faunas antigas da moderna Amazônia central com as faunas isoladas do leste do arco do Gurupá. Anteriormente o Amazonas fluiu leste para o Pacífico, mas com o surgimento dos Andes mudou a desaguar primeiro no Caribe e depois desaguando na posição atual no Atlântico após o fechamento ao norte e o rompimento do arco do Tapajós (Hoorn *et al.*, 2010; Lundberg *et al.*, 1998)

É possível observar uma clara tendência filogeográfica para maioria das espécies, e ainda que, possivelmente, todas passaram pelos mesmos processos biogeográficos. Apesar do N amostral baixo que nos impede de inferir qualquer questão diretamente relacionada à análise da correlação entre distância geográfica e genética, esse resultado pode ao menos reforçar a ideia da existência de espécies crípticas para os táxons que apresentaram os menores valores de p.

Outros trabalhos também encontraram padrões similares de linhagens genéticas geograficamente separadas como em (Mutanen *et al.*, 2012 - com lepidópteros; Rosso *et al.*, 2012 – com peixes de água doce; Amor *et al.*, 2014 - com polvos; Oliveira *et al.*, 2016 - com peixes marinhos; Fernández-Álvarez *et al.*, 2020 - com lulas). O que contribui para o pressuposto da importância de uma ampla cobertura geográfica no que diz respeito a amostragem, pois quanto mais habitats são amostrados, principalmente de maneira alopátrica, a tendência é que se encontre mais linhagens genéticas do que morfoespécies, como bem mostra a Tabela 2.

Mesmo para organismos com capacidade de dispersão relativamente mais fácil entre diferentes habitats como borboletas, as sequências de COI foram frequentemente mais divergentes entre espécies irmãs alopátricas do que as simpátricas (Lukhtanov *et al.*, 2009), assim reforçando a importância do tamanho da cobertura geográfica para uma melhor avaliação da diversidade, e no caso de peixes de diferentes bacias essa importância pode ser ainda maior, uma vez que, (Fritts-Penniman *et al.*, 2020) a diversificação de linhagens frequentemente é resultado do isolamento geográfico.

Nos trabalhos citados acima os organismos estudados, borboletas e nudibrânquios, respectivamente, são seres bem diferentes, com habitats e condições de locomoção distintas, mesmo assim seus resultados foram teoricamente concordantes no que diz respeito à maior distância genética entre espécies alopátricas. Ainda assim, para esse tipo de conclusão, é importante, primeiramente, pensar nos mecanismos de isolamento envolvidos na diversificação dos seres vivos, no ambiente de estudo e no tipo de organismo que se está trabalhando, quais suas limitações de capacidade migratória, se forem migratórios, etc.

5.2 Análises de diversidade

Este é o primeiro estudo que emprega dados de DNA *barcode* para a investigação da diversidade filogenética de peixes da região Amazônica, comparando comunidades de rios menores e maiores ao longo do tempo, destacando a influência da sazonalidade no comportamento dos índices. O resultado gerado pelo *envfit* mostra que no período seco, onde a captura da fauna de peixes ocorre com maior facilidade (Couto *et al.*, 2018), o padrão encontrado nos rios maiores é influenciado por esse viés de amostragem existente entre períodos. Isso gera uma maior parcela de explicação dos índices filogenéticos, que são influenciados pela riqueza (PD, NRI e NTI), à fração de agrupamento do período seco (Figura 7b; Tabela 3).

Enquanto que o índice de Simpson foi altamente correlacionado a fração de agrupamento do período cheio (Figura 7b; Tabela 4), onde as espécies não são facilmente capturadas. Esse índice, por sua vez, é influenciado pela equitabilidade (forma como as espécies estão distribuídas nas comunidades) e não pela riqueza, de forma que a quantidade de espécies capturadas tende a não impactar a robustez da sua resposta ao período cheio, gerando o alto nível de explicação observado.

Nesse contexto, difícil saber se o resultado é devido a amostragem ou resultados reais, mas minimizando a influência da amostragem e discutindo os índices, deduzimos que os índices tradicionais como Simpson podem ser mais adequados para abordar o contexto de diversidade de peixes de rios de maior ordem no período cheio, enquanto que os de diversidade filogenética talvez sejam mais apropriados para o período seco.

Já a ausência de agrupamentos nos rios de menor ordem mostra que o esforço de amostragem captura a fauna de forma semelhante em ambos os períodos do ano (Figura 7a;

Tabela 4), sendo uma indicação de que a porcentagem de explicação (R^2) nos rios menores pode ser mais confiável, já que o resultado gerado é pouco impactado pelo viés de amostragem.

Apesar da direção de resposta dos índices taxonômicos (PD e riqueza são correlacionados, Tabela 3) ser diferente, explorando diferentes trechos do conjunto de dados, a porcentagem de explicação conjunta dos índices puramente filogenéticos têm a maior relevância explicativa (R^2 de NTI + NRI = 0.473) na estruturação das comunidades de peixes de pequenos riachos. Isso indica que as métricas que utilizam informação filogenética proveniente de caracteres genéticos geram respostas mais robustas para a fauna de peixes em comparação aos índices tradicionais de diversidade, como já observado em diversos estudos com outros organismos (Shapcott *et al.*, 2015 - plantas; Crawford *et al.*, 2010 - Anfíbios; Smith *et al.*, 2009 - insetos; Kress *et al.*, 2009 - plantas), já que consideram mais do que riqueza e abundância de espécies nas suas respostas (Cianciaruso *et al.*, 2009).

A existência do banco referencial de peixes do Nordeste paraense possibilita a exploração do contexto filogenético numa faceta diferente daquela voltada somente à abordagem morfológica, gerando margem para abordagens integrativas no estudo dessas métricas. Integrar diferentes abordagens é importante no contexto da avaliação da estrutura das comunidades porque, dependendo da escala espacial e temporal, a maior robustez dos resultados demanda múltiplas perspectivas interpretativas. Além disso, as informações genéticas são um passo importante para a construção de filogenias bem resolvidas essenciais para a representação honesta das relações evolutivas entre os indivíduos de uma comunidade (Kress *et al.*, 2015).

6. Conclusão

Os resultados reafirmam o sucesso do DNA *barcode* na identificação de espécies de peixes, através do gene Citocromo c Oxidase subunidade I (COI), e a sua capacidade de apontar possíveis espécies crípticas com a formação de subgrupos dentro de algumas morfoespécies. Além disso, a cobertura geográfica se mostrou fundamental na detecção de novas linhagens genéticas. A biblioteca de DNA *barcode* será uma base fundamental para diversas pesquisas contemporâneas que necessitam de dados representativos dos peixes dessa região.

A geração dos índices de diversidade filogenética, a partir das sequências contidas na biblioteca, destaca o notável papel da informação genética na geração de respostas mais precisas em análises de diversidade biológica. Os resultados apresentados podem ser considerados uma grande novidade para a ecologia de peixes Neotropicais. Nossos achados indicam que considerar os efeitos de amostragem e estocasticidade nas distintas estações do ano também é importante para ampliar a robustez dos resultados em trabalhos futuros com a mesma abordagem. Sabemos que vários fatores atuam no perfil de uma comunidade e reforçar as bases de entendimento de esforço amostral e sazonalidade é fundamental para se adentrar em características mais específicas das comunidades de peixes de riacho.

7. Referências Bibliográficas

- Ahrens, J. B., Borda, E., Barroso, R., Paiva, P. C., Campbell, A. M., Wolf, A., Nugues, M. M., Rouse, G. W. & Schulze, A. (2013). The curious case of *Hermodice carunculata* (Annelida: Amphinomididae): evidence for genetic homogeneity throughout the Atlantic Ocean and adjacent basins. *Molecular Ecology*, 22(8), 2280-2291.
- Albert, J. S., Petry, P. & Reis, R. E. (2011). Major biogeographic and phylogenetic patterns. *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes*, 1.
- Allen, B., Kon, M., & Bar-Yam, Y. (2009). A new phylogenetic diversity measure generalizing the Shannon index and its application to phyllostomid bats. *The American Naturalist*, 174(2), 236-243.
- Amor, M. D., Norman, M. D., Cameron, H. E., & Strugnell, J. M. (2014). Allopatric speciation within a cryptic species complex of Australasian octopuses. *PLoS One*, 9(6), e98982.
- Anderson, M. J. (2006). Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions. *Biometrics*, 62(1), 245-253.
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral ecology*, 26(1), 32-46.
- Armstrong, K. F., & Ball, S. L. (2005). DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1813-1823.
- Aust, S. K., Ahrends, D. L., & Kellar, P. R. (2015). Biodiversity assessment among two Nebraska prairies: a comparison between traditional and phylogenetic diversity indices. *Biodiversity data journal*, (3).
- Bagley, J. C., de Aquino, P. D. P. U., Breitman, M. F., Langeani, F., & Colli, G. R. (2019). DNA barcode and minibarcode identification of freshwater fishes from Cerrado headwater streams in Central Brazil. *Journal of fish biology*, 95(4), 1046-1060.
- Barletta, M., Jaureguizar, A. J., Baigun, C., Fontoura, N. F., Agostinho, A. A., Almeida-Val, V. M. F., Val, A. L., Torres, R. A., Jimenes-Segura, L. F., Giarrizzo, T., Fabre, N. N., Batista,

- V. S., Lasso, C., Taphorn, D. C., Costa, M. F., Chaves, P. T., Vieira, J. P. & Corrêa, M. F. M. (2010). Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical systems. *Journal of fish biology*, 76(9), 2118-2176.
- Benone, N. L., Soares, B. E., Lobato, C. M. C., Seabra, L. B., Bauman, D., & de Assis Montag, L. F. (2020). How modified landscapes filter rare species and modulate the regional pool of ecological traits?. *Hydrobiologia*, 1-16.
- Betancur-R, R., Wiley, E. O., Arratia, G., Acero, A., Bailly, N., Miya, M., ... & Orti, G. (2017). Phylogenetic classification of bony fishes. *BMC evolutionary biology*, 17(1), 162.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K. & Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution*, 22(3), 148-155.
- Bononi, L., Taketani, R. G., Souza, D. T., Moitinho, M. A., Kavamura, V. N., & Melo, I. S. (2018). Higher phylogenetic diversity prevents loss of functional diversity caused by successive drying and rewetting cycles. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(7), 1033-1045.
- Borcard, D. (2011). Numerical ecology in R. Springer. *New York*.
- Brejão, G. L., Gerhard, P., & Zuanon, J. (2013). Functional trophic composition of the ichthyofauna of forest streams in eastern Brazilian Amazon. *Neotropical Ichthyology*, 11(2), 361-373.
- Brosse, S., Beauchard, O., Blanchet, S., Dürr, H. H., Grenouillet, G., Hugueny, B., Lauzeral, C., Leprieur, F., Tedesco, P. A., Villéger, S. & Oberdorff, T. (2013). Fish-SPRICH: a database of freshwater fish species richness throughout the World. *Hydrobiologia*, 700(1), 343-349.
- Bunce, M., Rodwell, L. D., Gibb, R., & Mee, L. (2008). Shifting baselines in fishers' perceptions of island reef fishery degradation. *Ocean & Coastal Management*, 51(4), 285-302.
- Cardoso, A. L., Pieczarka, J. C., Crampton, W. G., Ready, J. S., de Figueiredo Ready, W., Waddell, J. C., ... & Nagamachi, C. Y. (2018). Karyotypic diversity and evolution in a sympatric assemblage of Neotropical electric Knifefish. *Frontiers in genetics*, 9, 81.

- Cianciaruso, M. V., Silva, I. A., & Batalha, M. A. (2009). Diversidade filogenética e funcional: novas abordagens para a Ecologia de comunidades. *Biota Neotrop.*, 9(3), 93-103.
- Costa, F. O., & Carvalho, G. R. (2007). The Barcode of Life Initiative: synopsis and prospective societal impacts of DNA barcoding of fish. *Genomics, Society and Policy*, 3(2), 29.
- Costa, H., Foody, G., Jiménez, S., & Silva, L. (2015). Impacts of species misidentification on species distribution modeling with presence-only data. *ISPRS International Journal of Geo-Information*, 4(4), 2496-2518.
- Couto, T. B. D. A., Zuanon, J., Olden, J. D., & Ferraz, G. (2018). Longitudinal variability in lateral hydrologic connectivity shapes fish occurrence in temporary floodplain ponds. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 75(2), 319-328.
- Crawford, A. J., Lips, K. R., & Bermingham, E. (2010). Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(31), 13777-13782.
- Cutarelli, A., Amoroso, M. G., De Roma, A., Girardi, S., Galiero, G., Guarino, A., & Corrado, F. (2014). Italian market fish species identification and commercial frauds revealing by DNA sequencing. *Food Control*, 37, 46-50.
- Dagosta, F. C., & Pinna, M. D. (2017). Biogeography of Amazonian fishes: deconstructing river basins as biogeographic units. *Neotropical Ichthyology*, 15(3).
- Da Silva, J. M. C., Rylands, A. B., & Da Fonseca, G. A. (2005). The fate of the Amazonian areas of endemism. *Conservation Biology*, 19(3), 689-694.
- de Carvalho, D. C., Oliveira, D. A., Pompeu, P. S., Leal, C. G., Oliveira, C., & Hanner, R. (2011). Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial Dna*, 22(sup1), 80-86.
- de Carvalho, M. R., Bockmann, F. A., Amorim, D. S., Brandão, C. R. F., de Vivo, M., de Figueiredo, J. L., Britski, H. A., de Pinna, M. C. C., Menezes, N. A., Marques, F. P. L., Papavero, N., Cancellato, E. M., Crisci, J. V., McEachran, J. D., Schelly, R. C., Lundberg, J. G., Gill, A. C., Britz, R., Wheeler, Q. D., Stiassny, M. L. J., Parenti, L. R., Page, L. M., Wheeler, W. C., Faivovich, J., Vari, R. P., Grande, L., Humphries, C. J., DeSalle, R., Ebach, M. C. &

- Nelson, G. J. (2007). Taxonomic impediment or impediment to taxonomy? A commentary on systematics and the cybertaxonomic-automation paradigm. *Evolutionary Biology*, 34(3-4), 140-143.
- De Pinna, M. C. (2005). Diversity of tropical fishes. *Fish physiology*, 21, 47-84.
- Dettai, A., Lautredou, A. C., Bonillo, C., Goimbault, E., Busson, F., Causse, R., Couloux, A., Cruaud, C., Duhamel, G., Denys, G., Hauteceur, M., Iglesias, S., Koubbi, P., Lecointre, G., Moteki, M., Pruvost, P., Terceirie, S. & Ozouf, C. (2011). The actinopterygian diversity of the CEAMARC cruises: barcoding and molecular taxonomy as a multi-level tool for new findings. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 58(1-2), 250-263.
- Díaz, J., Villanova, G. V., Brancolini, F., del Pazo, F., Posner, V. M., Grimberg, A., & Arranz, S. E. (2016). First DNA barcode reference library for the identification of South American freshwater fish from the lower Paraná river. *PLoS One*, 11(7), e0157419.
- Dong, W., Xu, C., Li, C., Sun, J., Zuo, Y., Shi, S., Cheng, T., Guo, J. & Zhou, S. (2015). *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Scientific reports*, 5, 8348.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(13), 39-40.
- Elahi, R., O'Connor, M. I., Byrnes, J. E., Dunic, J., Eriksson, B. K., Hensel, M. J., & Kearns, P. J. (2015). Recent trends in local-scale marine biodiversity reflect community structure and human impacts. *Current Biology*, 25(14), 1938-1943.
- Faith, D. P. (1992). Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological conservation*, 61(1), 1-10.
- Faith, D. P., Lozupone, C. A., Nipperess, D., & Knight, R. (2009). The cladistic basis for the phylogenetic diversity (PD) measure links evolutionary features to environmental gradients and supports broad applications of microbial ecology's "phylogenetic beta diversity" framework. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(11), 4723-4741.
- Fernández-Álvarez, F. Á., Braid, HE, Nigmatullin, CM, Bolstad, KS, Haimovici, M., Sánchez, P., ... & Villanueva, R. (2020). Biodiversidade global do gênero *Ommastrephes*

(Ommastrephidae: Cephalopoda): um complexo de espécies crípticas alopátricas. *Zoological Journal of the Linnean Society* .

Fricke, R., Eschmeyer, WN & Van der Laan, R. (eds) 2020. ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES: GENERA, SPECIES, REFERENCES. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Versão eletrônica acessada 19 08 2020.

Fritts-Penniman, AL, Gosliner, TM, Mahardika, GN, & Barber, PH (2020). Diversificação ecológica e geográfica enigmática em nudibrânquios associados a corais. *Molecular Phylogenetics and Evolution* , 144 , 106698.

Garavello, J. C., & de Oliveira, A. K. (2014). Ichthyological overview and remarks on freshwater fishes from Capim river, lower Amazon basin, Brazil. *Open Journal of Ecology*, 4(13), 797.

Gill, B. A., Musili, P. M., Kurukura, S., Hassan, A. A., Goheen, J. R., Kress, W. J., Kuzmina, M., Pringle, R. M. & Kartzinel, T. R. (2019). Plant DNA-barcode library and community phylogeny for a semi-arid East African savanna. *Molecular ecology resources*.

Grella, M. D., Savino, A. G., Paulo, D. F., Mendes, F. M., Azeredo-Espin, A. M., Queiroz, M. M., Thyssen, T. J. & Linhares, A. X. (2015). Phenotypic polymorphism of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann)(Diptera: Calliphoridae) may lead to species misidentification. *Acta tropica*, 141, 60-72.

Hajibabaei, M., Singer, G. A., Hebert, P. D., & Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics*, 23(4), 167-172.

Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & Dewaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.

Hoorn, C., Wesselingh, F. P., Hovikoski, J., & Guerrero, J. (2010). The development of the amazonian mega-wetland (Miocene; Brazil, Colombia, Peru, Bolivia). *Amazonia, landscape and species evolution: a look into the past*, 123, 142.

- Huemer, P., Mutanen, M., Sefc, K. M., & Hebert, P. D. (2014). Testing DNA barcode performance in 1000 species of European Lepidoptera: large geographic distances have small genetic impacts. *PLoS One*, *9*(12), e115774.
- Hu, H. H., Liu, B., Liang, Y. S., Ye, J. F., Saqib, S., Meng, Z., ... & Chen, Z. D. (2020). An updated Chinese vascular plant tree of life: Phylogenetic diversity hotspots revisited. *Journal of Systematics and Evolution*, *58*(5), 663-672.
- Keat-Chuan Ng, C., Aun-Chuan Ooi, P., Wong, W. L., & Khoo, G. (2017). A review of fish taxonomy conventions and species identification techniques. *Survey in Fisheries Sciences*, *4*(1), 54-93.
- Kembel, S. W., Cowan, P. D., Helmus, M. R., Cornwell, W. K., Morlon, H., Ackerly, D. D., Blomberg, S. P., & Webb, C. O. (2010). Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics*, *26*(11), 1463-1464.
- Kneibelsberger, T., Dunz, A. R., Neumann, D. & Geiger, M. F. (2015). Molecular diversity of Germany's freshwater fishes and lampreys assessed by DNA barcoding. *Molecular ecology resources*, *15*(3), 562-572.
- Kneibelsberger, T., Landi, M., Neumann, H., Kloppmann, M., Sell, A. F., Campbell, P. D., ... & Costa, F. O. (2014). A reliable DNA barcode reference library for the identification of the North European shelf fish fauna. *Molecular ecology resources*, *14*(5), 1060-1071.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., & Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(23), 8369-8374.
- Kress, W. J., Erickson, D. L., Jones, F. A., Swenson, N. G., Perez, R., Sanjurjo, O., & Bermingham, E. (2009). Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(44), 18621-18626.
- Kress, W. J., García-Robledo, C., Uriarte, M., & Erickson, D. L. (2015). DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in ecology & evolution*, *30*(1), 25-35.

- Kumar, C. P., John, B. A., Khan, S. A., Lyla, P. S., Murugan, S., Rozihan, M., & Jalal, K. C. A. (2011). Efficiency of Universal Barcode Gene(Coxi) on Morphologically Cryptic Mugilidae Fishes Delineation. *Trends in Applied Sciences Research*, 6(9), 1028-1036.
- Lasso, C. A., Machado-Allison, A., & Taphorn, D. C. (2016). Fishes and aquatic habitats of the Orinoco River Basin: diversity and conservation. *Journal of fish biology*, 89(1), 174-191.
- Levêque, C., Oberdorff, T., PAUGy, D., Stiassny, M. L. J., & Tedesco, P. A. (2007). Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. In *Freshwater animal diversity assessment* (pp. 545-567). Springer, Dordrecht.
- Limmon, G., Delrieu-Trottin, E., Patikawa, J., Rijoly, F., Dahrudin, H., Busson, F., ... & Hubert, N. (2020). Assessing species diversity of Coral Triangle artisanal fisheries: A DNA barcode reference library for the shore fishes retailed at Ambon harbor (Indonesia). *Ecology and evolution*, 10(7), 3356-3366.
- Lukhtanov, V. A., Sourakov, A., Zakharov, E. V., & Hebert, P. D. (2009). DNA barcoding Central Asian butterflies: increasing geographical dimension does not significantly reduce the success of species identification. *Molecular Ecology Resources*, 9(5), 1302-1310.
- Lundberg, J. G., Marshall, L. G., Guerrero, J., Horton, B., Malabarba, M. C. S. L., & Wesselingh, F. (1998). The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*, 27, 13-48.
- Mace, G. M. (2004). The role of taxonomy in species conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1444), 711-719.
- Malabarba, L. R., & Malabarba, M. C. (2020). Phylogeny and classification of Neotropical fish. In *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish* (pp. 1-19). Academic Press.
- Múrria, C., Väisänen, L. O., Somma, S., Wangenstein Fuentes, O. S., Arnedo, M. A., & Prat, N. (2020). Towards an Iberian DNA barcode reference library of freshwater macroinvertebrates and fishes.
- Mutanen, M., Hausmann, A., Hebert, P. D., Landry, J. F., de Waard, J. R., & Huemer, P. (2012). Allopatry as a Gordian knot for taxonomists: patterns of DNA barcode divergence in Arctic-Alpine Lepidoptera. *PLoS One*, 7(10), e47214.

- Nagendra, H. (2002). Opposite trends in response for the Shannon and Simpson indices of landscape diversity. *Applied geography*, 22(2), 175-186.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., & Wagner, H. (2019). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-6. 2019. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Oliveira, L. M., Kneibelsberger, T., Landi, M., Soares, P., Raupach, M. J., & Costa, F. O. (2016). Assembling and auditing a comprehensive DNA barcode reference library for European marine fishes. *Journal of fish biology*, 89(6), 2741-2754.
- Pavoine, S., & Bonsall, M. B. (2011). Measuring biodiversity to explain community assembly: a unified approach. *Biological Reviews*, 86(4), 792-812.
- Pennisi, E. (2019). DNA barcodes jump-start search for new species.
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rosso, J. J., Mabragna, E., Gonzalez Castro, M., & Díaz de Astarloa, J. M. (2012). DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. *Molecular Ecology Resources*, 12(6), 999-1011.
- Sanchez, G., Tomano, S., Umino, T., Wakabayashi, T., & Sakai, M. (2016). Evaluation of the 5' end of the 16S rRNA gene as a DNA barcode marker for the Cephalopoda. *Fisheries science*, 82(2), 279-288.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W. & Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.
- Schweiger, O., Klotz, S., Durka, W., & Kühn, I. (2008). A comparative test of phylogenetic diversity indices. *Oecologia*, 157(3), 485-495.

Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell system technical journal*, 27(3), 379-423.

Shapcott, A., Forster, P. I., Guymer, G. P., McDonald, W. J., Faith, D. P., Erickson, D., & Kress, W. J. (2015). Mapping biodiversity and setting conservation priorities for SE Queensland's rainforests using DNA barcoding. *PLoS One*, 10(3), e0122164.

Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity. *nature*, 163(4148), 688-688.

Smith, M. A., FERNANDEZ-TRIANA, J. O. S. E., Roughley, R. O. B., & Hebert, P. D. (2009). DNA barcode accumulation curves for understudied taxa and areas. *Molecular Ecology Resources*, 9, 208-216.

Taanman, J. W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1410(2), 103-123.

Vačkář, D., ten Brink, B., Loh, J., Baillie, J. E., & Reyers, B. (2012). Review of multispecies indices for monitoring human impacts on biodiversity. *Ecological Indicators*, 17, 58-67.

Valentini, A., Miquel, C., Nawaz, M. A., Bellemain, E. V. A., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Cruaud, C., Nascetti, G., Wincker, P., Swenson, J. E., Taberlet, P. (2009). New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. *Molecular Ecology Resources*, 9(1), 51-60.

Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boye, F., Gaboriaud, G. C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, H. G., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J. M., Peroux, T., Crivelli, A. J., Oliver, A., Acqueberge, M., Brun, M. L., Moller, P. R., Willerslev, E. & Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25(4), 929-942.

Valsecchi, J.; Marmontel, M.; Franco, C.L.B.; Cavalcante, D.P.; Cobra, I.V.D.; Lima, I.J.; Lanna, J.M.; Ferreira, M.T.M.; Nassar, P.M.; Botero-Arias, R.; Monteiro, V. Atualização e composição da lista – Novas Espécies de Vertebrados e Plantas na Amazônia 2014-2015. Edição: Iniciativa Amazônia Viva da Rede WWF (Denise Oliveira e Sandra Charity), WWF-

Brasil (Jorge Eduardo Dantas e Mariana Gutiérrez). Brasília, DF e Tefé, AM: WWF e Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, publicado em 2017

Vannote, R. L., Minshall, G. W., Cummins, K. W., Sedell, J. R., & Cushing, C. E. (1980). The river continuum concept. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, 37(1), 130-137.

Vences, M., Thomas, M., Van der Meijden, A., Chiari, Y., & Vieites, D. R. (2005). Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in zoology*, 2(1), 1-12.

Veneza, I., Silva, R., Freitas, L., Silva, S., Martins, K., Sampaio, I., Schneider, H. & Gomes, G. (2018). Molecular authentication of Pargo fillets *Lutjanus purpureus* (Perciformes: Lutjanidae) by DNA barcoding reveals commercial fraud. *Neotropical Ichthyology*, 16(1).

Xu, L., Wang, X., Van Damme, K., Huang, D., Li, Y., Wang, L., Ning, J., & Du, F. (2021). Assessment of fish diversity in the South China Sea using DNA taxonomy. *Fisheries Research*, 233, 105771.

Yang, Z., & Rannala, B. (2017). Bayesian species identification under the multispecies coalescent provides significant improvements to DNA barcoding analyses. *Molecular ecology*, 26(11), 3028-3036.

Ward, R. D., Hanner, R., & Hebert, P. D. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of fish biology*, 74(2), 329-356.

Webb, C. O. (2000). Exploring the phylogenetic structure of ecological communities: an example for rain forest trees. *The American Naturalist*, 156(2), 145-155.

Webb, C. O., Ackerly, D. D., McPeck, M. A., & Donoghue, M. J. (2002). Phylogenies and community ecology. *Annual review of ecology and systematics*, 33(1), 475-505.

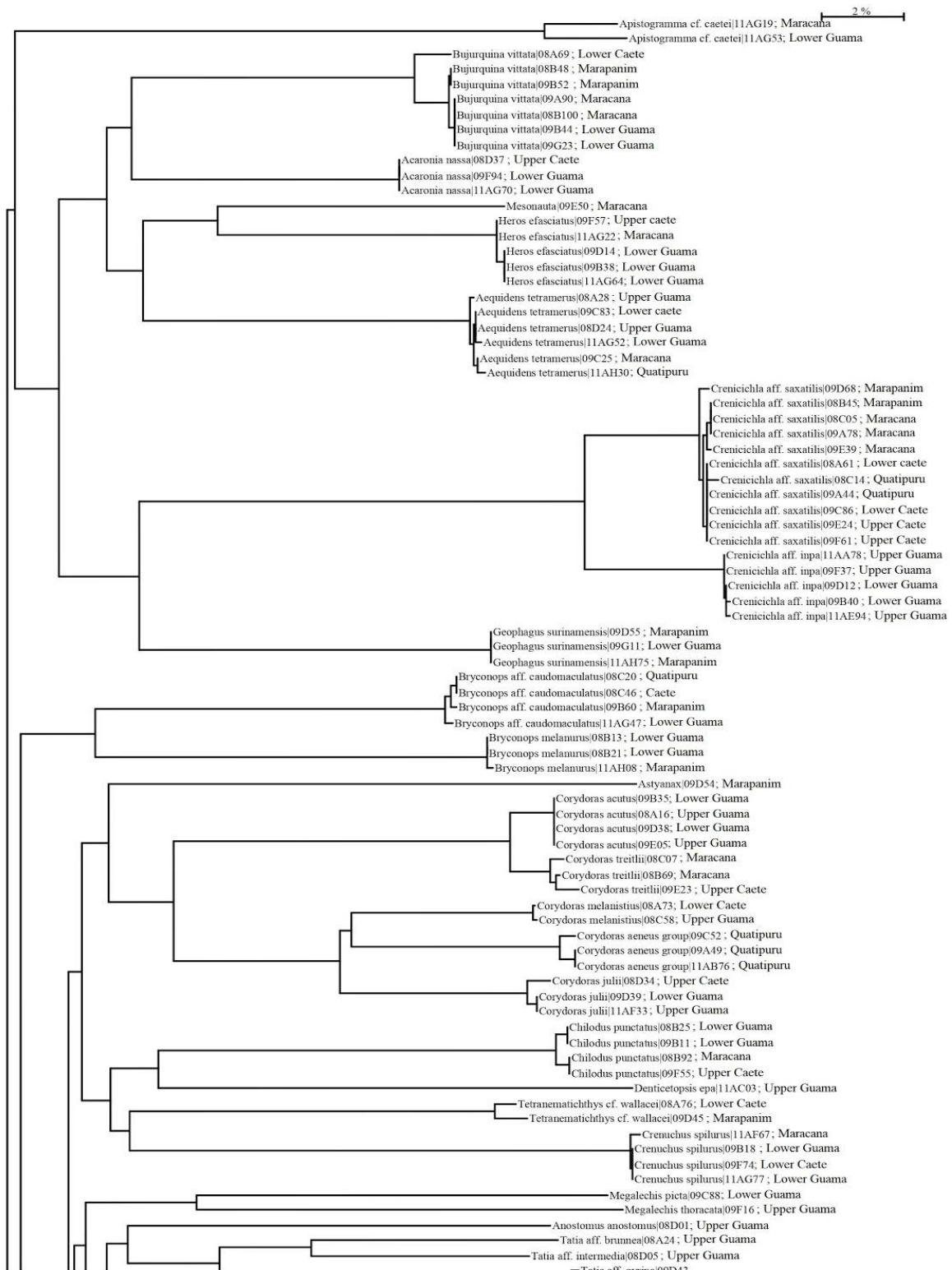
Weigt, L. A., Baldwin, C. C., Driskell, A., Smith, D. G., Ormos, A., & Reyier, E. A. (2012). Using DNA barcoding to assess Caribbean reef fish biodiversity: expanding taxonomic and geographic coverage. *PloS one*, 7(7), e41059.

Wirta, H., Várkonyi, G., Rasmussen, C., Kaartinen, R., Schmidt, N. M., Hebert, P. D. N., ... & Gjelstrup, P. (2016). Establishing a community-wide DNA barcode library as a new tool for arctic research. *Molecular ecology resources*, *16*(3), 809-822.

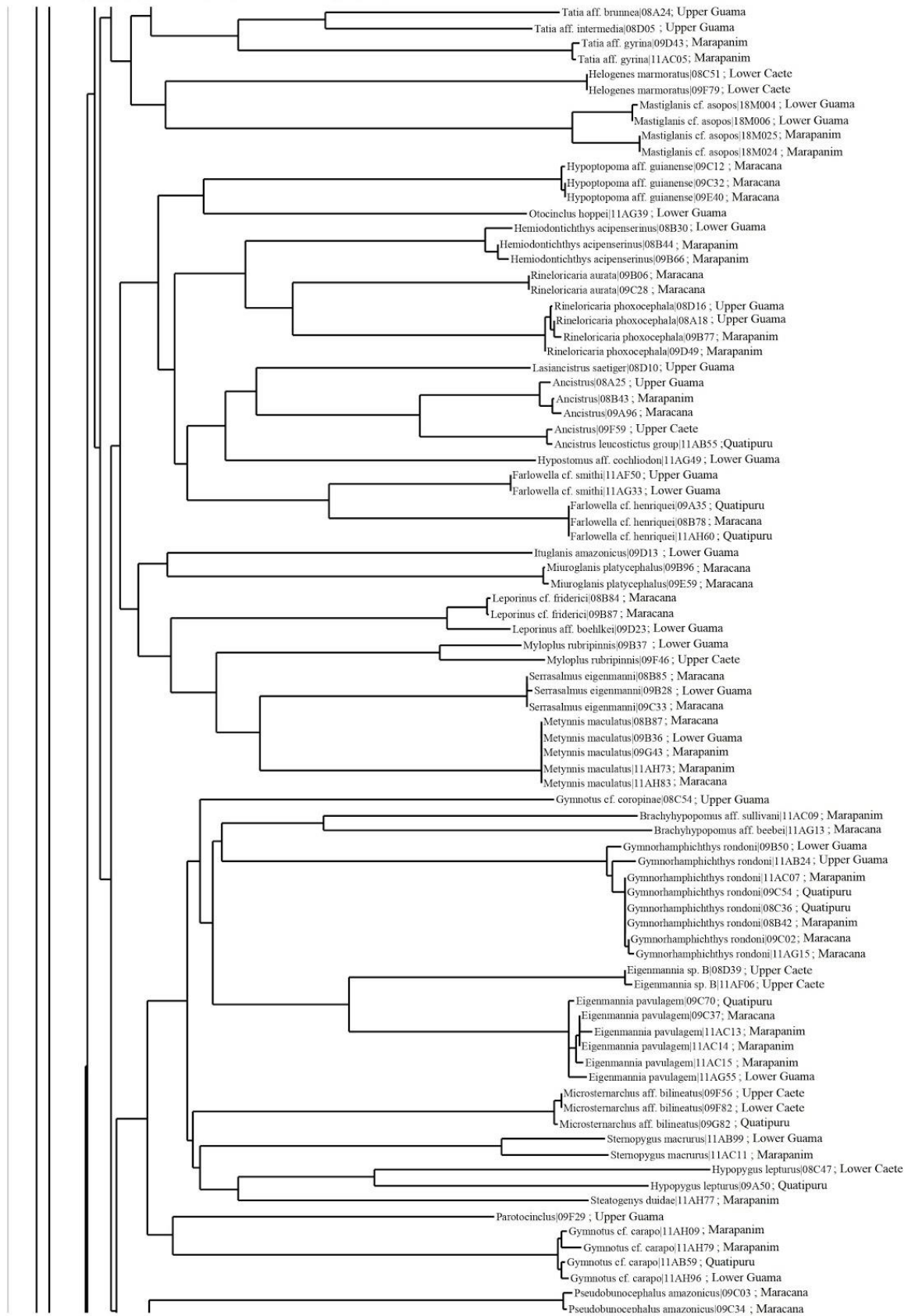
Wu, R., Zhang, H., Liu, J., Niu, S., Xiao, Y., & Chen, Y. (2018). DNA barcoding of the family Sparidae along the coast of China and revelation of potential cryptic diversity in the Indo-West Pacific oceans based on COI and 16S rRNA genes. *Journal of Oceanology and Limnology*, *36*(5), 1753-1770.

Anexos

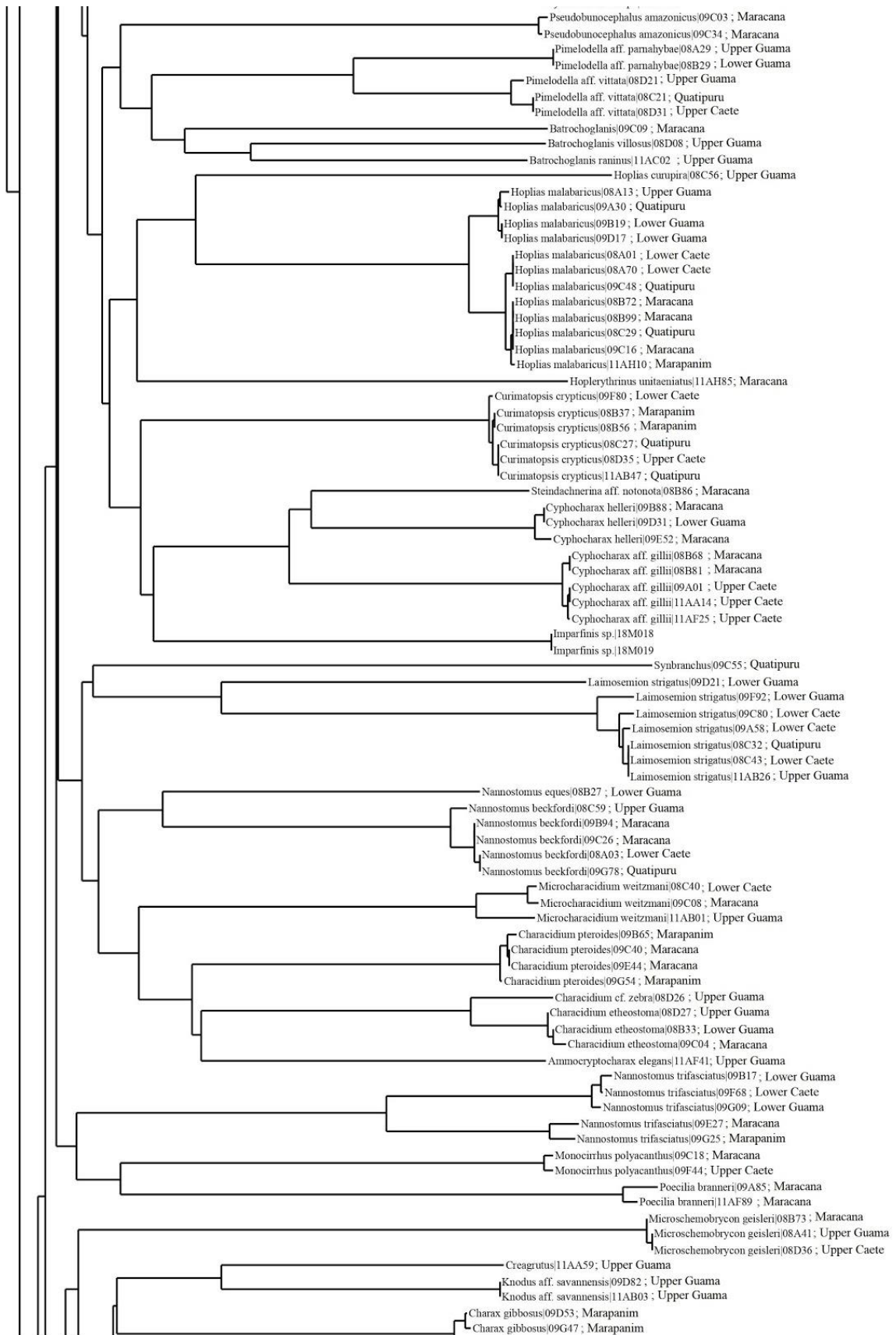
Anexo A - Árvore Neighbor-joining (NJ) de 328 sequências COI de peixes do nordeste paraense, gerada pelo BOLD a partir do modelo de substituição Kimura 2-Parameters (K2P). Descrição dos nomes: identificação do BOLD + código da amostra + bacia.



continuação do Anexo - A



continuação do Anexo – A



continuação do Anexo – A

