



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE CIÊNCIAS NATURAIS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

SARAH JENNYFER DO NASCIMENTO ANDRADE

**DIVERSIDADE CRÍPTICA EM TRAÍRAS *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) DA
BACIA ATLÂNTICO NORDESTE OCIDENTAL**

**SANTARÉM – PA
2024**

SARAH JENNYFER DO NASCIMENTO ANDRADE

**DIVERSIDADE CRÍPTICA EM TRAÍRAS *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) DA
BACIA ATLÂNTICO NORDESTE OCIDENTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Ciências Naturais como requisito à obtenção de grau de Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Oeste do Pará.

Orientador: Prof^o. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues
Coorientadora: M.Sc. Karen Larissa Auzier Guimarães

**SANTARÉM – PA
2024**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/Ufopa

- A553e Andrade, Sarah Jennyfer do Nascimento
 Diversidade críptica em traíras *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) da bacia atlântico nordeste ocidental./ Sarah Jennyfer do Nascimento Andrade. – Santarém, 2024.
 55 p.: il.
 Inclui bibliografias.
- Orientador: Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues.
 Coorientadora: Karen Larissa Auzier Guimarães.
 Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências da Educação, Licenciatura em Ciências Biológicas.
1. Biodiversidade. 2. Diversidade genética. 3. *Hoplias malabaricus*. I. Rodrigues, Luís Reginaldo Ribeiro, *orient.* II. Guimarães, Karen Larissa Auzier, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 597.098115

SARAH JENNYFER DO NASCIMENTO ANDRADE


**DIVERSIDADE CRÍPTICA EM TRAÍRAS *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) DA
BACIA ATLÂNTICO NORDESTE OCIDENTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Ciências Naturais como requisito à obtenção de grau de Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Oeste do Pará.


Orientador: Prof. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues
Coorientadora: M.Sc. Karen Larissa Auzier Guimarães

Conceito: Aprovada


Data da aprovação: 07 de outubro de 2024

Documento assinado digitalmente
 **LUIS REGINALDO RIBEIRO RODRIGUES**
Data: 18/10/2024 07:22:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues
Universidade Federal do Oeste do Pará

Documento assinado digitalmente
 **KAREN LARISSA AUZIER GUIMARAES**
Data: 17/10/2024 20:03:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

M.Sc. Karen Larissa Auzier Guimarães
Universidade Federal do Oeste do Pará

Documento assinado digitalmente
 **DIEGO MAIA ZACARDI**
Data: 17/10/2024 08:07:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Diego Maia Zacardi
Universidade Federal do Oeste do Pará

Documento assinado digitalmente
 **MARCOS PRADO LIMA**
Data: 16/10/2024 16:54:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marcos Prado Lima
Universidade Federal do Oeste do Pará

**SANTARÉM – PA
2024**

Dedico este trabalho a Deus, pela sua constante presença em minha vida, à minha família, pelo apoio incondicional, ao meu namorado, pelo amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo seu infinito amor, pela sua graça em minha vida e por me conceder forças em todos os momentos, especialmente nos mais desafiadores. Palavras não são suficientes para expressar minha gratidão ao Senhor.

Agradeço à minha família, especialmente à minha mãe, Josielma Beserra, pelo apoio e pela presença constantes, por nunca ter permitido que eu desistisse e por sempre me aconselhar com sabedoria.

Ao Edifácio Júnior, meu companheiro de vida e meu amor, obrigada por me fazer enxergar a beleza dos processos que me trouxeram até aqui. Agradeço por ser meu porto seguro, minha fonte constante de alegria, por sua compreensão, paciência e incentivos, e por fazer parte da minha jornada e das minhas conquistas.

Ao meu orientador, Dr. Luís Reginaldo, pela oportunidade, por acreditar no meu potencial e confiar em mim. Agradeço pelos ensinamentos, pelas correções e pelas orientações que foram fundamentais para meu crescimento acadêmico. Obrigada por ser uma fonte de inspiração para seguir na área da biologia molecular.

À minha coorientadora, M.Sc. Karen Guimarães, pela parceria no trabalho, pelos ensinamentos, pelos conselhos e pela dedicação. Sua atenção e cuidado comigo durante o tempo em que estive no Laboratório de Genética e Biodiversidade da UFOPA (LGBio) foram essenciais. Obrigada por ser minha "mãe científica".

À minha amiga Alice Lima, que ganhei para a vida através da faculdade, obrigada por estar ao meu lado nos momentos de dificuldade e por ser minha dupla para todas as horas.

Aos membros do LGBio, por todos os momentos compartilhados, pelos ensinamentos e pelo apoio no laboratório: Ahieska Liscano, Carol Braga, Mara Guimarães, Adria Maia, Adília Nogueira, Jair Christian, Luan Maciel, Melquíades Costa e Yone Araújo. Meu muito obrigada! Aos docentes do PCNAT e aos colegas da turma de 2019, agradeço pelo convívio e pelas trocas de conhecimento ao longo do curso.

Agradeço à Universidade Federal do Oeste do Pará por me proporcionar o ambiente e as condições para o desenvolvimento da minha formação acadêmica.

Por fim, deixo expressos meus agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha trajetória acadêmica. Muito obrigada!

"Confie no Senhor de todo o coração e não se apoie na sua própria inteligência. Lembre de Deus em tudo o que fizer, e ele lhe mostrará o caminho certo".

Provérbios 3:5-6

RESUMO

Análises moleculares com DNA *barcoding* têm sido amplamente utilizadas para a identificação de espécies e o estudo da biodiversidade. No grupo dos peixes, o gene mitocondrial COI (*Citocromo c Oxidase subunidade I*) é o mais comumente utilizado como marcador tipo DNA *barcoding*. Neste estudo foi analisado a variação molecular, através do DNA *barcoding* em uma amostra populacional de traíras (*Hoplias malabaricus*) coletadas na Bacia do Atlântico Nordeste Ocidental (BANOC). Foram analisadas 106 sequências COI, sendo que 21 são provenientes de peixes coletados nas seguintes localidades: Rio Caeté, Riacho Grande, Rio Itapecuru, Rio Peria, Rio Pericumã, Rio Mearim e Rio Urumajó; enquanto que 63 sequências foram adicionadas a partir de bancos de dados públicos e de estudos anteriores. Adicionalmente foram incluídas 20 amostras do Suriname e duas de *Hoplias lacerdae* para comparação como grupo externo. As sequências obtidas foram submetidas a plataforma *BOLD Systems* e identificaram duas linhagens evolutivamente distintas de *H. malabaricus* da BANOC, as quais foram agrupadas em dois BINs (*Barcode Index Number*). Um grupo foi amplamente distribuído e associado ao BIN:AFU2064, enquanto que o outro foi restrito às sub-bacias do rio Itapecuru e Riacho Grande, BIN:ACR9466. A distância genética entre os dois grupos foi de 2,9%, enquanto a variação dentro de AFU2064 foi estimada em 2%. O estudo revelou uma diversidade haplotípica de 0,7582 e indicou a presença de múltiplas linhagens dentro do complexo *H. malabaricus*, e a importância de estratégias de conservação que considerem essa diversidade. O BIN:ACR9466 pode representar uma possível espécie nova ainda não descrita.

Palavras-chave: Biodiversidade; Diversidade genética; *Hoplias malabaricus*; DNA *barcoding*; Gene COI.

ABSTRACT

Molecular analyses using DNA barcoding have been widely applied for species identification and biodiversity studies. In fish, the mitochondrial gene COI (*Cytochrome c Oxidase subunit I*) is the most commonly used marker for DNA barcoding. This study analyzed molecular variation through DNA barcoding in a population sample of trahiras (*Hoplias malabaricus*) collected from the Northeastern Atlantic Basin (BANOC). A total of 106 COI sequences were examined: 21 from fish collected at the following locations—Caeté River, Grande Stream, Itapecuru River, Peria River, Pericumã River, Mearim River, and Urumajó River—while 63 sequences were obtained from public databases and previous studies. Additionally, 20 samples from Suriname and two samples of *Hoplias lacerdae* were included for comparison as an outgroup. The sequences were submitted to the BOLD Systems platform, identifying two evolutionarily distinct lineages of *H. malabaricus* from BANOC, which were grouped into two BINs (Barcode Index Numbers). One group was widely distributed and associated with BIN, while the other was restricted to the Itapecuru River and Grande Stream sub-basins, corresponding to BIN. The genetic distance between the two groups was 2.9%, while the variation within AFU2064 was estimated at 2%. The study revealed haplotypic diversity (0.7582) and indicated the presence of multiple lineages within the *H. malabaricus* complex, highlighting the importance of conservation strategies that account for this diversity. BIN ACR9466 may represent a possible new species yet to be described.

Keywords: Biodiversity; Genetic diversity; *Hoplias malabaricus*; DNA barcoding; COI gene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Padrões de coloração nas espécies do grupo <i>Hoplias malabaricus</i>	16
Figura 2 – Comparação da linha dentária entre <i>H. lacerdae</i> e <i>Hoplias</i> cf. <i>malabaricus</i> , com destaque para a configuração mandibular	17
Figura 3 – Morfologia de <i>Hoplias malabaricus</i> (CAX-27, 235 mm CP)	18
Figura 4 – Distribuição geográfica das amostras genéticas do grupo <i>Hoplias malabaricus</i> na América do Sul	21
Figura 5 – Mapa geográfico da Bacia do Atlântico Nordeste Ocidental e suas principais unidades hidrográficas	23
Figura 6 – Esquema representativo da identificação de espécies através do DNA <i>barcoding</i>	25
Figura 7 – Esquema do gene mitocondrial COI (citocromo c oxidase subunidade I) e sua localização no genoma mitocondrial	26
Figura 8 – Exemplar de <i>Hoplias malabaricus</i> (AMTRA308-24, 54 mm CP), coletado na sub-bacia do Riacho Grande, pertencente à Bacia do atlântico Nordeste Ocidental	29
Figura 9 – Distribuição dos pontos amostrais associados aos códigos BINs com ênfase na Bacia do Atlântico Nordeste Ocidental	32
Figura 10 – Interface web da plataforma <i>BOLD Systems</i> demonstrando o projeto AMTRA	35
Figura 11 – Árvore filogenética de <i>Neighbor-Joining</i> baseada nas sequências do gene mitocondrial COI	37
Figura 12 – Diagrama de <i>Median Joining</i> dos haplótipos de <i>H. malabaricus</i> , baseado no gene mitocondrial COI, com indicação das ocorrências dos haplótipos ao longo da Bacia do Atlântico Nordeste Ocidental e no Suriname	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Municípios e sub-bacias de coleta de amostras do complexo <i>Hoplias malabaricus</i>	28
Tabela 2 – Metadados das amostras do complexo <i>H. malabaricus</i> no presente estudo.....	29
Tabela 3 – Distâncias genéticas (p) entre linhagens de <i>H. malabaricus</i> identificadas pelo sistema BIN (gene COI)	36
Tabela 4 – Informações genéticas e localidades das sequências relacionadas à nova espécie candidata de <i>H. malabaricus</i> identificadas neste estudo	40

LISTA DE SIGLAS

AMTRA – *Amazonian Trahiras*
ANA – Agência Nacional de Águas
BANOC – Bacia do Atlântico Nordeste Ocidental
BIN – *Barcode Index Number*
BOLD – *Barcode of Life Data Systems*
COI – *Citocromo c oxidase subunidade I*
CP – Comprimento Padrão
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DNAMt – Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial
DNAsp - DNA Sequence Polymorphism
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
HCl – Ácido clorídrico
Hd – Diversidade haplotípica
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LGBio – Laboratório de Genética e Biodiversidade
MMA – Ministério do Meio Ambiente
NJ – *Neighbor-Joining*
MOTU – *Molecular Operational Taxonomic Unit*
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
RESL – *Refined Single Linkage Analysis*
RH – Região hidrográfica
rpm – Rotações por Minuto
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
UFOPA – Universidade Federal do Oeste do Pará

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Taxonomia e Sistemática de <i>Hoplias malabaricus</i> (Bloch, 1794)	14
1.2 Características morfológicas	15
1.3 Características ecológicas	17
1.3.1 Comportamento e hábitos alimentares	17
1.3.2 Relevância ecológica e econômica	20
1.4 Distribuição geográfica	21
1.5 Bacia do Atlântico Nordeste Ocidental	22
1.6 Diversidade genética	24
1.6.1 DNA <i>barcoding</i>	25
2 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	27
2.1 Geral	27
2.2 Específicos	27
3 METODOLOGIA	27
3.1 Tipo de estudo	27
3.2 Área de estudo	27
3.3 Métodos moleculares	32
3.4 Análise dos dados	33
4 RESULTADOS	34
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
GLOSSÁRIO	53
APÊNDICE	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 Taxonomia e Sistemática de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794)

A família Erythrinidae está agrupada com a família Tarumanidae dentro da ordem Characiformes, sendo Tarumanidae proposta como grupo irmão de Erythrinidae. Ambas formam parte da superfamília Erythrinioidea, uma relação sustentada por evidências morfológicas e moleculares (Arcila; Petry; Ortí, 2018; Melo *et al.*, 2022).

A família Erythrinidae inclui peixes comumente conhecidos como "traíras" e "jejus", que são predadores amplamente distribuídos em diversos ecossistemas aquáticos neotropicais (Oyakawa; Mattox, 2009). Estes peixes são endêmicos da região Neotropical, ocorrendo desde o Panamá até o sul do Equador, a oeste, e estendendo-se até a Argentina, ao sudeste, habitando predominantemente sistemas de água doce da América do Sul (Berra, 2001; Oyakawa, 2003).

A família Erythrinidae é composta por três gêneros: *Erythrinus* Scopoli 1777, *Hoplerythrinus* Gill 1896 e *Hoplias* Gill 1903 (Oyakawa, 2003). Enquanto as espécies dos gêneros *Erythrinus* e *Hoplerythrinus* geralmente alcançam comprimentos de até 40 cm, as espécies pertencentes ao gênero *Hoplias* são notavelmente maiores, com algumas atingindo quase 100 cm de comprimento (Bertollo, 2007; Oyakawa, 2003). Essa variação de tamanho reflete a adaptabilidade das espécies de *Hoplias* a diferentes habitats e sua posição como predadores nos ecossistemas onde vivem.

Atualmente, são reconhecidas 17 espécies válidas dentro da família Erythrinidae (Fricke, Eschmeyer, Fong, 2024), sendo o gênero *Hoplias* o mais diverso, com o maior número de espécies válidas. Este gênero é tradicionalmente dividido em três grupos com base em características morfológicas: *H. aimara*, *H. lacerdae* e *H. malabaricus* (Mattox; Toledo-Piza; Oyakawa, 2006; Oyakawa; Mattox, 2009; Oyakawa, 1990). *Hoplias patana* (Valenciennes 1847) e *H. microcephalus* (Agassiz 1829) são espécies válidas, entretanto, não estão associadas a esses grupos morfológicos e não possuem um grupo formalmente reconhecido (Cardoso *et al.*, 2018; Guimarães *et al.*, 2021).

O grupo *H. aimara* corresponde apenas a espécie *Hoplias aimara* (Valenciennes, 1847), o grupo *H. lacerdae* corresponde as espécies: *H. lacerdae* Miranda Ribeiro 1908, *H. australis* Oyakawa e Mattox 2009, *H. brasiliensis* (Spix & Agassiz 1829), *H. intermedius* (Günther 1864) e *H. curupira* Oyakawa e Mattox 2009.

De acordo com Mattox, Bifi e Oyakawa (2014), o grupo *H. malabaricus* pode representar talvez um dos problemas mais complexos na taxonomia de peixes neotropicais. Isso se deve ao grande número de espécies nominais, muitas das quais são consideradas sinônimos

juniores (por exemplo, Oyakawa, 2003), e à ausência de material-tipo para muitas dessas espécies. Além disso, o complexo de espécies é evidenciado por diversos estudos citogenéticos (como, Bertollo *et al.*, 2000; Blanco *et al.*, 2010a; Marques *et al.*, 2013; Rosa *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2009). Dados moleculares também evidenciam o complexo de espécies que ocorre com o grupo *H. malabaricus* (Dergam *et al.*, 1998; Guimarães *et al.*, 2022; Jacobina *et al.*, 2018; Marques *et al.*, 2013; Rosso *et al.*, 2012).

Estudos recentes tentam resolver a complexa taxonomia do grupo *H. malabaricus*, como a redescritção de espécies (Mattox; Bifi; Oyakawa, 2014) e a descrição de novas espécies (Azpelicueta *et al.*, 2015; Guimarães *et al.*, 2021; Rosso *et al.*, 2016, 2018). Sendo assim, atualmente o grupo *H. malabaricus* compreende as espécies válidas: *H. malabaricus* (Bloch, 1794), *H. microlepis* (Günther, 1864), *H. teres* (Valenciennes 1847), *H. mbigua* Azpelicueta, Benítez, Aichino e Mendez 2015, *H. misionera* Rosso, Mabragaña, González-Castro, Delpiani, Avigliano, Schenone e Díaz de Astarloa 2016, *H. argentinensis* Rosso, González-Castro, Bogan, Cardoso, Mabragaña, Delpiani e Díaz de Astarloa 2018, e *H. auri* Guimarães, Rosso, González-Castro, Souza, Díaz de Astarloa e Rodrigues 2021.

Historicamente, a taxonomia do gênero *Hoplias* passou por diversas revisões, especialmente com o advento de técnicas moleculares que permitiram uma análise mais detalhada das relações entre as espécies (Guimarães *et al.*, 2022; Jacobina *et al.*, 2018). *Hoplias malabaricus*, em particular, é um dos grupos mais estudados dentro da família devido à sua complexidade taxonômica e ampla distribuição geográfica (Bertollo *et al.*, 2000; Rosa *et al.*, 2009).

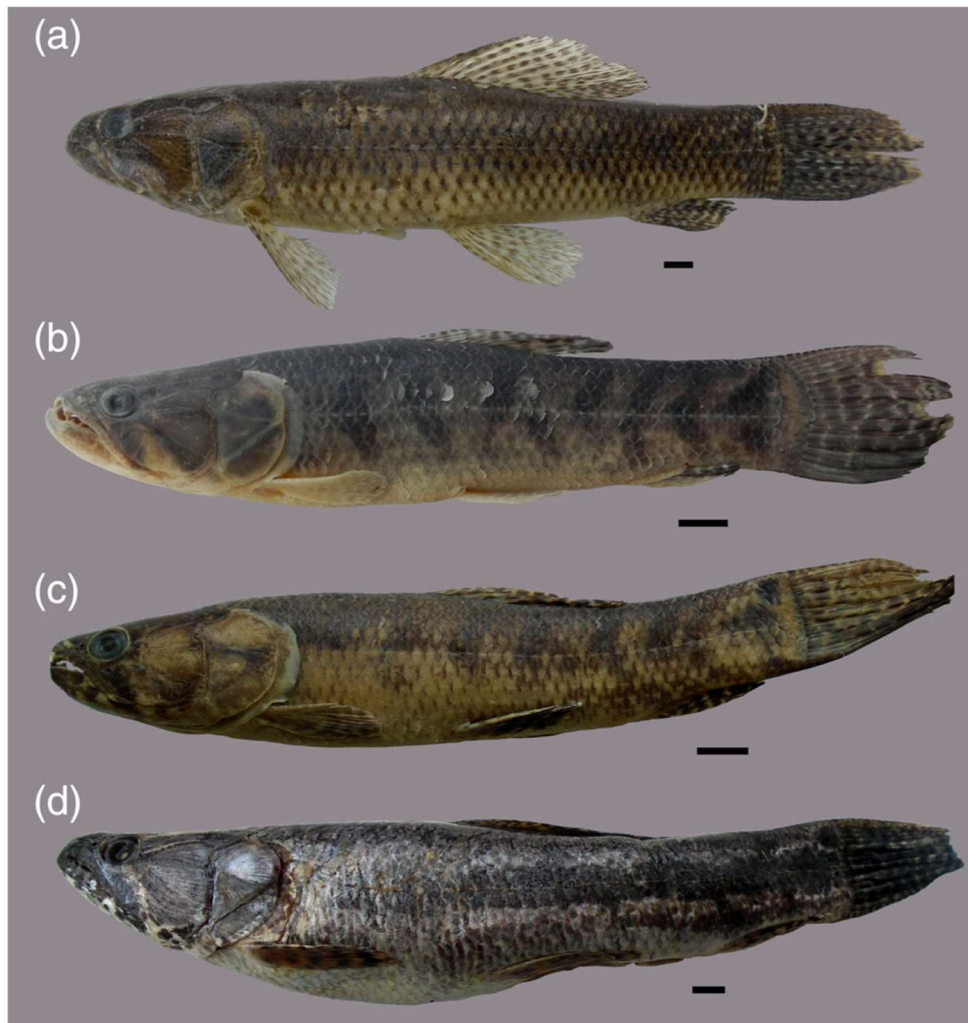
1.2 Características morfológicas

Hoplias malabaricus possui corpo alongado e cilíndrico, coberto por escamas cicloides, características típicas das espécies do gênero *Hoplias*. Sua cabeça é ossificada e alongada. A nadadeira caudal apresenta formato arredondado, as nadadeiras peitorais e dorsais possuem um padrão de listras escuras e claras, o que auxilia na camuflagem em ambientes aquáticos e a boca larga abriga dentes robustos e cônicos de tamanhos variados, inclusive na superfície da língua. No que se refere à coloração, *H. malabaricus* apresenta notável variabilidade, com padrões de manchas ou listras verticais que variam conforme a idade (Guimarães *et al.*, 2021; Pires; Barros; Fraga, 2020; Rosso *et al.*, 2016, 2018).

Esse padrão de manchas é uma característica que auxilia na distinção das espécies do gênero de *Hoplias* (Figura 1). Guimarães *et al.* (2021), destacam que o padrão de coloração, juntamente com outros traços morfológicos, facilita a distinção entre as espécies. Por exemplo,

H. auri pode ser caracterizado por uma coloração de fundo marrom e marrom claro, mais escuro no dorso e a superfície ventral branca ou amarelo-pálida, enquanto *H. mbigua* apresenta uma faixa longitudinal escura distintiva.

Figura 1 – Padrões de coloração nas espécies do grupo *Hoplias malabaricus*.



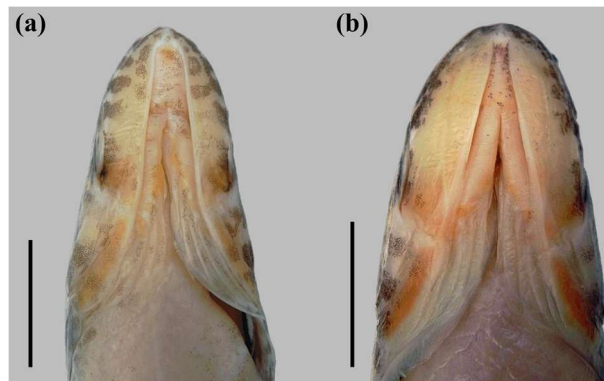
Legenda: 1 – Padrões de coloração: *Hoplias auri* (a), UFOPA - I 1353, holótipo, 229 mm de comprimento padrão (CP); *Hoplias misionera* (b), UNMDP 3865, 187 mm CP; *Hoplias argentinensis* (c), UNMDP 3867, 177 mm CP; e *Hoplias mbigua* (d), UNMDP 4966, 282 mm CP. Barras de escala = 1 cm. Fonte: Guimarães *et al.* (2021).

Outra característica que distingue *H. malabaricus* das demais espécies do gênero *Hoplias* é a disposição de sua linha dentária. Em *H. malabaricus*, as linhas dentárias formam uma configuração em "V", com o ponto de convergência voltado para a sínfise mandibular. Por outro lado, nas espécies relacionadas, como *H. lacerdae*, as linhas dentárias mantêm-se paralelas e não se encontram na área da sínfise mandibular (Oyakawa; Mattox, 2009; Rosso *et al.*, 2016; Santos, 2012), conforme demonstrado na figura 2. Além disso, a configuração única

da linha dentária de *H. malabaricus* pode ter implicações importantes para a taxonomia e a identificação das espécies dentro do gênero.

Na Figura 3, é possível observar a morfologia característica de *Hoplias malabaricus*, incluindo detalhes anatômicos como a forma do corpo, a disposição das nadadeiras e a estrutura da cabeça.

Figura 2 – Comparação da linha dentária entre *H. lacerdae* (a) e *Hoplias* cf. *malabaricus* (b), com destaque para a configuração mandibular.



Legenda: 2 – Comparação da linha dentária; barras de escala = 2 cm. Fonte: Adaptado de Rosso *et al.* (2016).

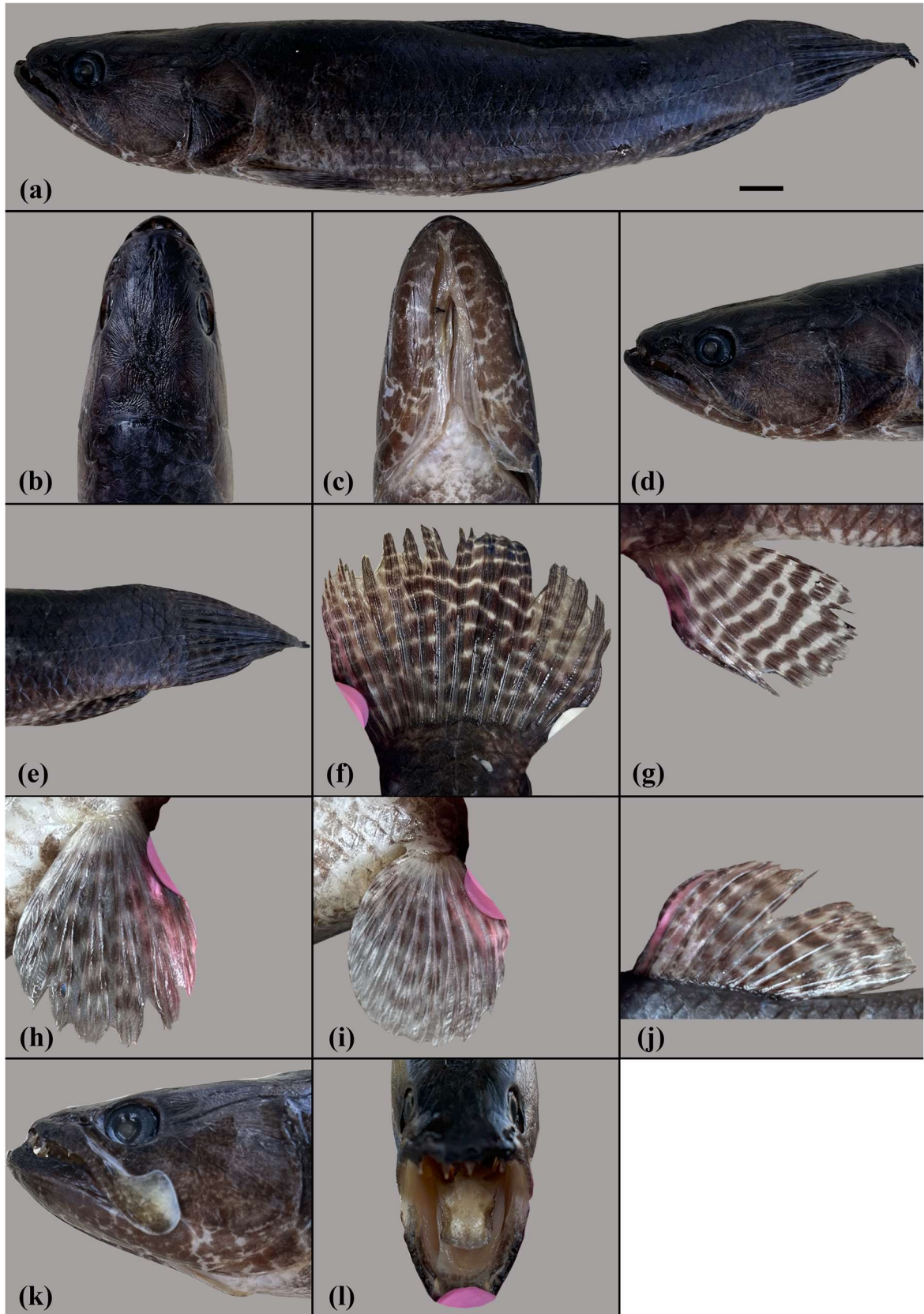
1.3 Características ecológicas

1.3.1 Comportamento e hábitos alimentares

O comportamento reprodutivo de *H. malabaricus* está diretamente relacionado a variações sazonais que impactam a dinâmica dos ecossistemas aquáticos, como o aumento do nível das águas durante o período chuvoso. Esse fenômeno, contribui para o sucesso reprodutivo da espécie, criando um ambiente propício para a desova e oferecendo vantagens às larvas e aos jovens da traíra, como disponibilidade de alimento e proteção contra predadores, aumentando as chances de sobrevivência dos ovos e dos recém-eclodidos (Martins, 2009).

O período reprodutivo coincide com o aumento da oferta de recursos alimentares, uma vez que a elevação do nível das águas está associada ao incremento de nutrientes nos sistemas aquáticos, favorecendo o surgimento de organismos essenciais à dieta das larvas e juvenis, como fitoplâncton, zooplâncton, bactérias e invertebrados. O aumento desses organismos no ecossistema é crucial para o crescimento e desenvolvimento dos estágios iniciais de vida da traíra, garantindo uma fonte estável de alimento durante o período crítico após a eclosão (Leão *et al.*, 1991).

Figura 3 – Morfologia de *Hoplias malabaricus* (CAX-27, 235 mm CP).



Legenda: 3 – Morfologia: (a) Vista lateral do corpo; (b) Vista dorsal da cabeça; (c) Vista ventral da cabeça; (d) Vista lateral da cabeça; (e) Região caudal; (f) Nadadeira caudal; (g) Nadadeira anal; (h) Nadadeira peitoral inferior direita; (i) Nadadeira peitoral superior direita; (j) Nadadeira dorsal; (k) Vista lateral do crânio, destacando o opérculo; (l) Vista frontal da boca, destacando os dentes. Barra de escala = 1cm. Fotos: autoria própria (2024).

O comportamento reprodutivo de *H. malabaricus* é caracterizado por uma estratégia adaptativa ao ambiente aquático. As traíras constroem seus ninhos em áreas com vegetação submersa, que oferecem proteção natural contra predadores. Esses ninhos são, em geral, formados em depressões rasas, com cerca de 20 cm de profundidade, onde a fêmea deposita seus ovos. O macho, responsável pela fertilização, permanece cuidando dos ovos por alguns dias, até que eclodam e as larvas se dispersem pela vegetação circundante (Martins, 2009).

As estratégias alimentares de *H. malabaricus* variam ao longo de seu ciclo de vida, refletindo sua capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais. As larvas da traíra alimentam-se principalmente de plâncton, enquanto os juvenis se nutrem de insetos aquáticos. À medida que crescem e atingem mais de 15 cm, tornam-se predominantemente piscívoros, assumindo o papel de predadores de topo nos ecossistemas em que habitam (Loreiro; Hahn, 1998). *Hoplias malabaricus* é uma espécie bentônica e sedentária, conhecida por seu comportamento de predador de tocaia, utilizando a estratégia de "senta e espera" para capturar suas presas, tanto durante o dia quanto à noite (Carvalho; Fernandes; Moreira, 2002; Corrêa *et al.*, 2014; Shibatta *et al.*, 2002).

A traíra exibe comportamentos típicos de um predador de emboscada, caracterizados pela utilização da espreita como estratégia principal para se aproximar de suas presas. Durante essa aproximação, a traíra demonstra uma notável capacidade de camuflagem, alterando sua coloração conforme necessário para maximizar o sucesso na captura de presas. Quando em deslocamento ou sondagem, ela apresenta uma coloração mais clara, facilitando a movimentação discreta no ambiente. No entanto, ao adotar a postura de emboscada, sua coloração muda para um padrão mais escuro e críptico, permitindo que ela se misture com o ambiente circundante e permaneça oculta até o momento do ataque (França, 2022).

As traíras frequentemente apresentam estômagos vazios, o que sugere uma capacidade de resistência a longos períodos de jejum. Este comportamento é particularmente prevalente nas estações mais frias, quando sua atividade alimentar tende a diminuir significativamente (Carvalho; Fernandes; Moreira, 2002).

Hoplias malabaricus pode apresentar uma dieta diferenciada com a presença ou ausência de peixes piscívoros, sendo uma espécie adaptável em termos alimentares. Em ambientes com concorrência de outros piscívoros, as traíras podem reduzir o consumo de peixes e passar a se alimentar mais de invertebrados. Este comportamento adaptativo evidencia a flexibilidade alimentar de *H. malabaricus*, permitindo-lhe sobreviver em habitats efêmeros e

sob diferentes pressões ecológicas (Pompeu; Godinho, 2001; Carvalho; Fernandes; Moreira, 2002).

1.3.2 Relevância ecológica e econômica

Hoplias malabaricus desempenha um papel fundamental como espécie-chave nos ecossistemas aquáticos, exercendo uma influência significativa na estrutura e no funcionamento desses ambientes (Petry, 2005). Como predador de topo, sua dieta é majoritariamente composta por peixes, mas a traíra também demonstra uma notável capacidade de adaptação ao se alimentar de invertebrados aquáticos quando necessário (Carvalho; Fernandes; Moreira, 2002).

Sua presença no ecossistema contribui diretamente para o equilíbrio das comunidades aquáticas, influenciando a dinâmica populacional de outras espécies de peixes e, por conseguinte, a estabilidade ecológica dos ambientes em que habita (Martins, 2009). Ao ocupar uma posição de destaque na cadeia alimentar, a traíra controla as populações de suas presas, ajudando a manter o equilíbrio das redes tróficas e garantindo a funcionalidade ecológica (Petry, 2005).

Hoplias malabaricus é considerada um bioindicador eficaz, sensível a mudanças ambientais (Belger, 2001). Flutuações em suas populações ou sua ausência podem sinalizar problemas relacionados à poluição ou degradação do habitat, evidenciando a importância de *H. malabaricus* para o monitoramento da qualidade ambiental dos ecossistemas aquáticos (Belger, 2001).

No contexto econômico, *H. malabaricus* desempenha um papel de destaque, especialmente no âmbito da pesca artesanal e do processamento de alimentos (Barros; Moraes Filho; Oliveira, 2007; Petry, 2005). A espécie é reconhecida por seu elevado valor nutritivo, sendo uma fonte de proteína essencial para diversas comunidades locais que dependem dos recursos pesqueiros para sua subsistência (Santos *et al.*, 2001). A adaptabilidade de *H. malabaricus* a diferentes tipos de ambientes de água doce – desde rios permanentes até corpos d'água efêmeros – faz com que ela seja um recurso muito explorado tanto pela pesca de subsistência quanto pela pesca comercial, contribuindo para as economias regionais. Além de sua importância para a subsistência, a traíra também apresenta grande potencial para exploração em larga escala, especialmente no setor de aquicultura (Neta *et al.*, 2021; Pessoa *et al.*, 2013).

A conservação de *H. malabaricus* é fundamental para a preservação da biodiversidade aquática. Proteger essa espécie auxilia na integridade dos ecossistemas e na estabilidade das redes alimentares, contribuindo para a saúde geral dos ambientes aquáticos. A

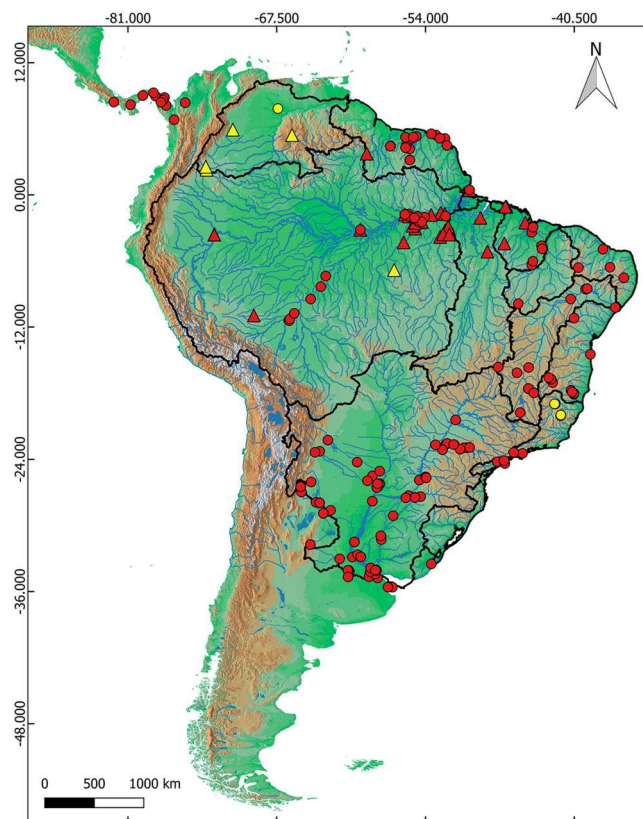
gestão adequada dos habitats e a promoção de práticas de uso sustentável são essenciais para garantir a continuidade da espécie e a manutenção da biodiversidade local.

1.4 Distribuição geográfica

Em termos biogeográficos, a distribuição de *H. malabaricus* cobre uma vasta área da América do Sul e central, e é frequentemente registrada ao longo das bacias dos rios Orinoco, Amazonas, São Francisco, Paraná, Paraguai e Prata (Bertollo *et al.*, 2000; Dagosta; Pinna, 2019; Guimarães *et al.*, 2022; Oyakawa, 2003). *Hoplias malabaricus* habita uma grande variedade de ambientes aquáticos, incluindo tanto sistemas lóticos quanto lênticos, como rios, lagos e reservatórios (Jacobina *et al.*, 2018).

A identificação das áreas de ocorrência de *H. malabaricus* é essencial para entender os padrões de variação genética e as possíveis barreiras geográficas que podem ter influenciado a evolução do grupo. Na Figura 4, é apresentada a distribuição geográfica de *Hoplias malabaricus* ao longo da América do Sul, destacando as principais regiões hidrográficas onde a espécie é encontrada.

Figura 4 – Distribuição geográfica das amostras genéticas do grupo *Hoplias malabaricus* na América do Sul.



Legenda: 4 – Distribuição geográfica: mapa elaborado pelo estudo de Guimarães *et al.* 2022. Os triângulos representam as localidades amostradas no estudo e círculos indicam sequências obtidas em bancos de dados públicos. As novas espécies putativas identificadas pelo estudo estão em amarelo. Fonte: Guimarães *et al.* (2022).

1.5 Bacia do Atlântico Nordeste Ocidental

A Bacia Atlântico Nordeste Ocidental (BANOC), possui uma área aproximada de 274.300 km², abrange cerca de 3% do território brasileiro, incluindo o estado do Maranhão e uma pequena parte do estado do Pará. Essa região hidrográfica é composta por 235 municípios, sendo 198 localizados no Maranhão e 37 no Pará. A oeste, faz fronteira com a Região Hidrográfica Tocantins/Araguaia, e a leste, com a Região Hidrográfica do Parnaíba (ANA, 2015; MMA, 2006).

Dentro da BANOC, estão incluídas diversas unidades hidrográficas, como as dos rios Preguiças, Peria, Munim, Itapecuru, Mearim, Turiaçu, Macaraçumé, Gurupi, e algumas drenagens costeiras do estado do Pará, como o rio Itinga e o rio Laranjeiras (Maranhão, 2011; MMA, 2006). Além disso, a região abrange o Sistema Hidrográfico do Litoral Ocidental e os sistemas hidrográficos das ilhas maranhenses. Esta vasta área hidrográfica inclui porções dos biomas Caatinga, Cerrado e Amazônia, sendo que 28% de seu território é ocupado por Unidades de Conservação e Terras Indígenas (ANA, 2015).

Geograficamente, a BANOC está situada entre as coordenadas 0°30'S e 6°45'S de latitude e 47°45'W a 42°00'W de longitude. A malha hidrográfica da região é iniciada pelo rio Gurupi, formado pela confluência dos rios Açailândia e Itinga (MMA, 2006). Na Figura 5, é apresentada a Bacia do Atlântico Nordeste Ocidental, destacando sua localização geográfica e as principais unidades hidrográficas associadas.

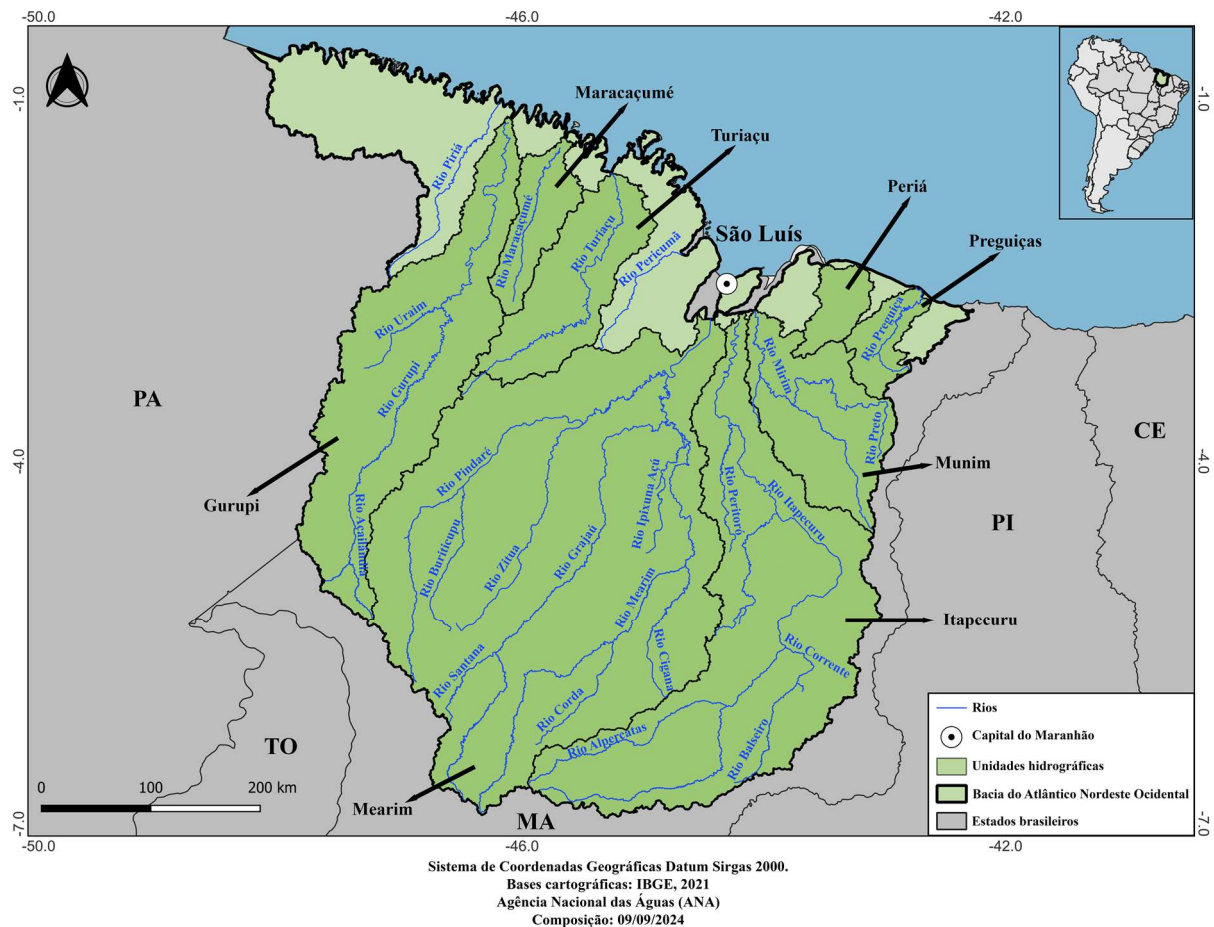
Em termos geológicos, a maior parte da BANOC está inserida na Bacia Sedimentar do Parnaíba, uma das províncias hidrogeológicas mais importantes do Brasil (MMA, 2006). A formação e o desenvolvimento das bacias hidrográficas na região foram diretamente influenciados pela estrutura dessa bacia sedimentar, que molda e controla os diferentes cursos d'água – alto, médio e baixo – característicos da região (Saraiva, 2019; Soares Júnior *et al.*, 2011; Soares Júnior; Costa; Hasui, 2008).

O padrão de drenagem dos rios da BANOC começou a se estabelecer durante o Paleoceno, aproximadamente há 67 milhões de anos, e foi consolidado no Mioceno, há cerca de 8 milhões de anos. Durante esse período, dois eventos geológicos importantes desempenharam um papel crucial na definição do padrão de drenagem: as regressões marinhas e a elevação máxima da Cordilheira dos Andes. Esses fenômenos, ocorridos ao longo de cerca de 90 milhões de anos, influenciaram profundamente tanto a geomorfologia da região quanto a distribuição das espécies de peixes que habitam suas águas (Hoorn *et al.*, 1995; Saraiva, 2019).

A BANOC tem sido reconhecida como uma unidade de endemismo para peixes de água doce (Hubert; Renno, 2006; Lundberg *et al.*, 1998), abrigando táxons endêmicos que se

estabeleceram devido ao isolamento provocado por barreiras naturais. A importância biogeográfica da BANOC é ressaltada pelo aumento significativo, na última década, dos esforços de inventário da ictiofauna local, resultando na descoberta de novas espécies endêmicas em suas sub-bacias hidrográficas (Guimarães *et al.*, 2018a, 2018b; Piorski *et al.*, 2008).

Figura 5 – Mapa geográfico da Bacia do Atlântico Nordeste Ocidental e suas principais unidades hidrográficas.



Fonte: Elaboração própria (2024).

Apesar dos avanços na descrição de novas espécies na BANOC, muitas das suas sub-bacias hidrográficas ainda permanecem em grande parte inexploradas em termos de sua ictiofauna (Abreu *et al.*, 2019; Barros; Fraga; Birindelli, 2011; Piorski, 2010). Dada essa exploração limitada, torna-se evidente a necessidade de ampliar os estudos na região, com ênfase particular na análise genética, como a proposta neste estudo, que busca revelar uma diversidade biológica ainda não catalogada e fornecer indícios sobre possíveis espécies crípticas dentro do complexo *Hoplias malabaricus*.

1.6 Diversidade genética

A diversidade genética desempenha um papel fundamental na capacidade de adaptação das populações às mudanças ambientais (Merchant *et al.*, 2024). Essa diversidade é essencial para a resiliência das espécies, permitindo que populações apresentem variações genéticas que podem ser vantajosas perante desafios como variações climáticas, doenças e outras pressões ambientais (McCallum *et al.*, 2014). Populações com alta variabilidade genética têm uma maior probabilidade de incluir indivíduos com características adaptativas que os tornam mais resistentes a esses estresses, o que contribui com a sobrevivência e estabilidade a longo prazo das espécies (Wang; Bradburd, 2014).

A espécie *H. malabaricus* tem sido reconhecida como complexo de espécies devido a variabilidade morfológica e genética observada entre suas populações (Bertollo *et al.*, 2000; Oyakawa, 2003; Rosa *et al.*, 2009). Essa diversidade se reflete, em parte, com a variabilidade cariotípica detectada em estudos citogenéticos, que têm sido fundamentais para a diferenciação de linhagens dentro do complexo (Dergam *et al.*, 1998; Lopes *et al.*, 1998; Rosa *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009; Utsunomia *et al.*, 2014). As variações cromossômicas observadas indicam a existência de espécies crípticas (Marques *et al.*, 2013), ou seja, espécies que são morfológicamente semelhantes, mas geneticamente distintas.

Essa diversidade própria dificulta a distinção clara entre as diferentes espécies dentro do grupo, o que exige abordagens mais detalhadas e específicas para uma correta identificação. Além dos estudos citogenéticos, outras abordagens genéticas têm sido empregadas para aprofundar a compreensão da biodiversidade dentro do complexo *H. malabaricus*. Investigações genéticas utilizando marcadores moleculares, como sequências do ácido desoxirribonucleico mitocondrial (DNAm), têm permitido uma delimitação mais precisa das linhagens (Cardoso *et al.*, 2018; Guimarães *et al.*, 2022; Jacobina *et al.*, 2018; Marques *et al.*, 2013) e a identificação de espécies novas dentro do grupo (Guimarães *et al.*, 2021; Rosso *et al.*, 2016, 2018).

A análise da diversidade genética de *H. malabaricus* desempenha um papel fundamental na compreensão dos processos evolutivos e das adaptações dessa espécie ao longo do tempo (Guimarães *et al.*, 2022). Essa investigação tem implicações diretas na sua classificação taxonômica e na identificação de possíveis espécies crípticas (Rosso *et al.*, 2016, 2018). O estudo dessa diversidade é uma ferramenta essencial para o conhecimento da evolução e da biogeografia da espécie, auxiliando na identificação de linhagens evolutivamente significativas e na elaboração de estratégias de manejo e de conservação.

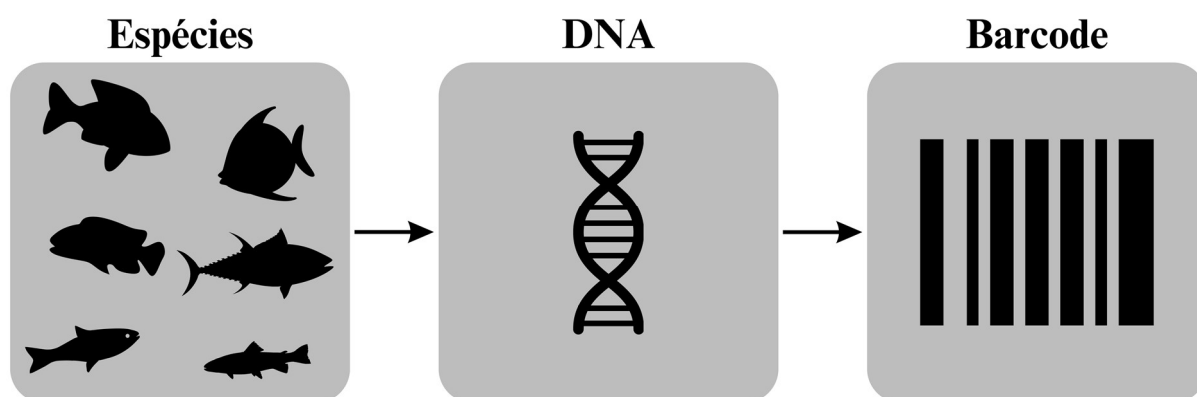
1.6.1 DNA *barcoding*

A análise da diversidade taxonômica molecular, utilizando a técnica de DNA *barcoding* (Hebert *et al.*, 2003; Hebert; Gregory, 2005), emergiu como ferramenta na investigação da biodiversidade, permitindo não apenas a identificação precisa das espécies, mas também a compreensão das relações evolutivas entre elas. No contexto de complexos de espécies, onde as distinções morfológicas podem ser sutis ou inexistentes, o DNA *barcoding* se destaca como uma metodologia efetiva para a identificação e delimitação de espécies crípticas (Lara *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2016; Mulvaney; Moir; Cherry, 2023; Odah, 2023; Toffoli *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2020).

Essa técnica possibilita a detecção de variações genéticas, que não podem ser identificadas por métodos tradicionais baseados em características morfológicas, oferecendo uma nova perspectiva sobre a biodiversidade e ajudando a esclarecer a estrutura taxonômica de grupos complexos (Hebert; Gregory, 2005). Conforme ilustrado na Figura 6, o processo de identificação de espécies via DNA *barcoding* envolve três etapas principais: a coleta das amostras biológicas, a extração e amplificação do DNA, e a geração do "barcode" genético, que é então comparado com sequências de referência para a identificação precisa da espécie.

Como uma técnica eficiente, o DNA *barcoding* utiliza uma sequência padronizada do gene mitocondrial *Citocromo c Oxidase subunidade I* (COI) para identificar e delimitar espécies biológicas, além de evidenciar a ocorrência de estruturas filogenéticas (Hebert *et al.*, 2003). O gene COI é amplamente utilizado em estudos de biologia molecular para a identificação de espécies, devido sua variação entre diferentes espécies (Aguiar *et al.*, 2022; Hebert; Gregory, 2005; Rees *et al.*, 2014; Ward; Hanner; Hebert, 2009; Ward *et al.*, 2005).

Figura 6 – Esquema representativo da identificação de espécies através do DNA *barcoding*.



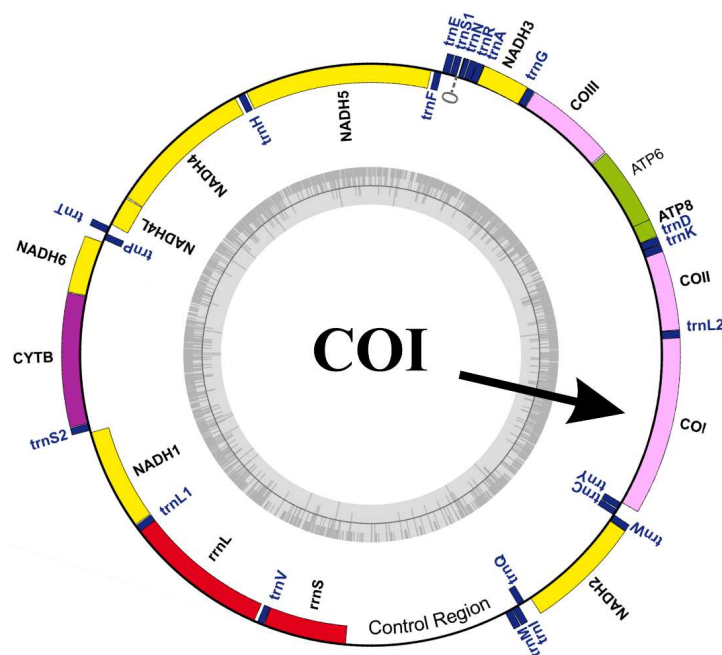
Fonte: Elaboração própria (2024).

O gene COI apresenta uma taxa de mutação moderada e contém regiões conservadas que permitem sua amplificação, ao mesmo tempo em que possui regiões variáveis que fornecem uma resolução suficiente para distinguir espécies. A técnica de DNA *barcoding*, baseada na sequência do gene COI, tem demonstrado ser eficaz na delimitação de espécies, especialmente em complexos taxonômicos com alta diversidade genética. A Figura 7 apresenta uma ilustração do gene COI, destacando sua localização no genoma mitocondrial.

Ratnasingham e Hebert (2013) introduziram o sistema *Barcode Index Number* (BIN) como uma abordagem inovadora para a catalogação de sequências de DNA mitocondrial no banco de dados público *Barcode of Life Datasystems* (BOLD, www.boldsystems.org). O sistema BIN opera por meio de um algoritmo em duas etapas que agrupa sequências de DNA em clusters, os quais são então atribuídos a um identificador único chamado *Barcode Index Number*. Este identificador é interpretado como uma *Molecular Operational Taxonomic Unit* (MOTU), que é um conceito utilizado para definir grupos de organismos com base em similaridades genéticas, muitas vezes representando uma espécie. A criação de BINs facilita a organização sistemática e a comparação de sequências de DNA.

No contexto de *Hoplias*, a aplicação do sistema BIN é particularmente relevante, pois aprimora a capacidade de detectar e catalogar a diversidade genética, além de identificar potenciais espécies crípticas dentro desse complexo (Cardoso *et al.*, 2018; Guimarães *et al.*, 2022, 2021a, 2021b; Rosso *et al.*, 2016, 2018).

Figura 7 – Esquema do gene mitocondrial COI e sua localização no genoma mitocondrial.



Fonte: Adaptado de Pereira dos Santos *et al.* (2024).

2 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

2.1 Geral:

Analisar a diversidade genética em uma população de traíras do complexo *Hoplias malabaricus* provenientes da Bacia do Atlântico Nordeste Ocidental.

2.2 Específicos:

- Disponibilizar publicamente na plataforma *BOLD Systems*, sequências parciais do gene mitocondrial COI de *H. gr. malabaricus* provenientes da BANOC;
- Analisar a variação molecular em traíras (*H. gr. malabaricus*) da BANOC;
- Estimar as distâncias genéticas entre as diferentes espécies ou populações do grupo.

3 METODOLOGIA

3.1 Tipo de estudo

A pesquisa abrange a biologia molecular por meio de técnicas de extração de material genético, amplificação de fragmentos por PCR, purificação e sequenciamento de DNA. No âmbito da taxonomia, foca na delimitação de possíveis novas espécies com base em dados genéticos. Portanto, esta pesquisa é caracterizada como um estudo de manipulação experimental (Lakatos, 2016).

3.2 Área de estudo

Foram analisados 21 indivíduos de traíras identificadas primariamente como da espécie *H. malabaricus* (Figura 8). As amostras de tecido muscular processadas pertencem ao “Banco de Tecidos da Família Erythrinidae” do Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBio) da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) e foram coletadas no âmbito do projeto “Taxonomia integrativa de *Hoplias malabaricus* na bacia amazônica e drenagens adjacentes e avaliação de risco à contaminação por mercúrio na bacia do rio Tapajós” sob licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) permissão N° 77783-1 e do projeto “Estudo taxonômico das espécies e populações do clado *Hyphessobrycon rosy tetra*” permissão SISBIO N° 79948-2.

Esses espécimes foram coletados em sete sub-bacias da BANOC: Rio Caeté, Riacho Grande, Rio Itapecuru, Rio Peria, Rio Pericumã, Rio Mearim e Rio Urumajó (Figura 9) – os municípios das coletas estão informados na Tabela 1. Além disso, foram utilizadas 63 sequências obtidas de bancos de dados públicos, *BOLD Systems*, e de pesquisas anteriores (por

exemplo, Guimarães *et al.*, 2022; Jacobina *et al.*, 2018). Também foram adicionadas 20 sequências do Suriname, possivelmente a localidade tipo de *H. malabaricus*, para a identificação de espécimes relacionados a *H. malabaricus stricto sensu* (Cardoso *et al.*, 2018). Duas sequências pertencentes à espécie *H. lacerdae* foram adotadas como grupo externo (Cardoso *et al.*, 2018), totalizando 106 sequências analisadas. A Tabela 2 representa os metadados associados a cada sequência analisada.

Tabela 1 – Municípios e sub-bacias de coleta de amostras do complexo *Hoplias malabaricus*.

Localidade	Sub-bacias	n	Referência
Açailândia, MA, Brasil	Rio Mearim	1	4
Aldeias Altas, MA, Brasil	Rio Itapecurú	4	1
Augusto Correa, PA, Brasil	Rio Urumajó	1	4
Bragança, PA, Brasil	Rio Caeté	8	2 e 4
Caxias, MA, Brasil	Rio Itapecurú	40	1, 3 e 5
Colinas, MA, Brasil	Rio Itapecurú	4	1 e 5
Formosa da Serra Negra, MA, Brasil	Riacho Grande	2	3
Gonçalves Dias, MA, Brasil	Rio Itapecurú	3	3
Mirador, MA, Brasil	Rio Itapecurú	3	1 e 5
Peri Mirim, MA, Brasil	Rio Pericumã	2	4
Peritoró, MA, Brasil	Rio Itapecurú	1	3
Presidente Vargas, MA, Brasil	Rio Itapecurú	2	1
Rosário, MA, Brasil	Rio Itapecurú	11	1
Santo Amaro do Maranhão, MA, Brasil	Rio Peria	2	3
Suriname		20	1 e 2
Argentina	Médio Rio Uruguai	2	2

Fonte: (1) *BOLD Systems* (<http://www.boldsystems.org>); (2) Cardoso *et al.* 2018; (3) Este estudo; (4) Guimarães *et al.* 2022; (5) Jacobina *et al.* 2018.

As sub-bacias foram categorizadas de acordo com o sistema de classificação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) das Bacias Hidrográficas do Brasil – BHB250 Versão 2021.09.24 (IBGE, 2021).

Figura 8 – Exemplar de *Hoplias malabaricus* (AMTRA308-24, 54 mm CP), coletado na sub-bacia do Riacho Grande, pertencente à Bacia do atlântico Nordeste Ocidental.



Foto: Erick C. Guimarães (2021).

Tabela 2 – Metadados das amostras do complexo *H. malabaricus* no presente estudo.

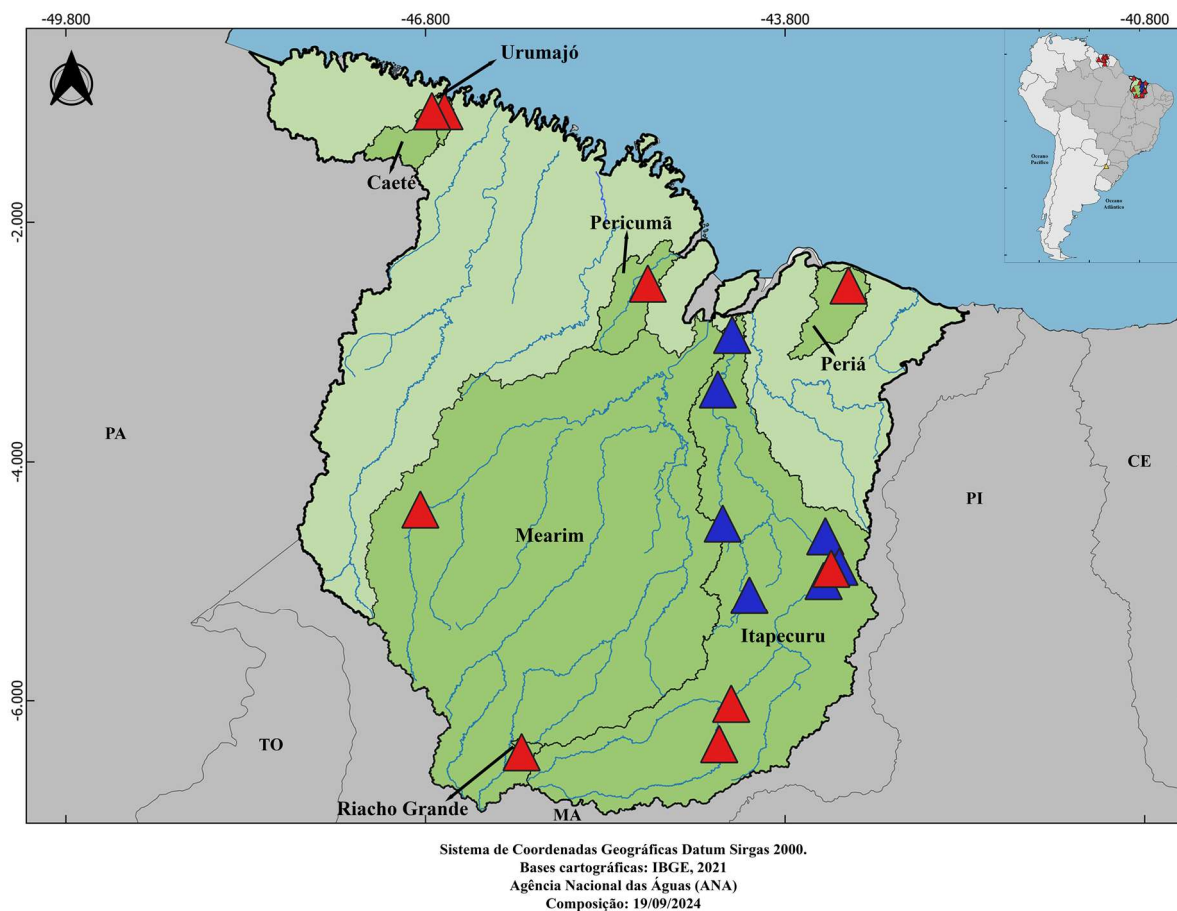
Código BIN	Amostra	Identificação	Sub-bacia	Lat	Lon	Referência
ABW2258	FARGB521-12	<i>H. lacerdae</i>	Médio Rio Uruguai	-27.443	-54.941	2
ABW2258	FARGB522-12	<i>H. lacerdae</i>	Médio Rio Uruguai	-27.443	-54.941	2
ACR9466	AMTRA297-24	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.870	-43.361	3
ACR9466	AMTRA229-22	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.870	-43.361	3
ACR9466	AMTRA230-22	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.870	-43.361	3
ACR9466	AMTRA231-22	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.870	-43.361	3
ACR9466	AMTRA298-24	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.994	-43.477	3
ACR9466	AMTRA299-24	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.994	-43.477	3
ACR9466	AMTRA243-24	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.994	-43.477	3
ACR9466	AMTRA244-24	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.994	-43.477	3
ACR9466	AMTRA245-24	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.994	-43.477	3
ACR9466	AMTRA246-24	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.994	-43.477	3
ACR9466	AMTRA301-24	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-5.116	-44.097	3
ACR9466	AMTRA302-24	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-5.116	-44.097	3
ACR9466	AMTRA303-24	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-5.116	-44.097	3
ACR9466	AMTRA307-24	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.514	-44.319	3
ACR9466	AMTRA308-24	<i>H. malabaricus</i>	Riacho Grande	-6.429	-45.997	3
ACR9466	ITAPE092-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-3.9395	-44.36	1
ACR9466	ITAPE093-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-2.94	-44.240	1
ACR9466	ITAPE094-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-2.94	-44.240	1

ACR9466	ITAPE095-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-2,94	-44.240	1
ACR9466	ITAPE097-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-2,94	-44.240	1
ACR9466	ITAPE098-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-3,395	-44.36	1
ACR9466	ITAPE099-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-2,94	-44.240	1
ACR9466	ITAPE100-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-2,94	-44.240	1
ACR9466	ITAPE102-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-2,94	-44.240	1
ACR9466	ITAPE103-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-2,94	-44.240	1
ACR9466	ITAPE104-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-2,94	-44.240	1
ACR9466	ITAPE105-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.874	-43.346	1
ACR9466	ITAPE106-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.874	-43.346	1
ACR9466	ITAPE107-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.874	-43.346	1
ACR9466	ITAPE108-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.874	-43.346	1
ACR9466	ITAPE109-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.874	-43.346	1
ACR9466	ITAPE110-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.874	-43.346	1
ACR9466	ITAPE111-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.874	-43.346	1
ACR9466	ITAPE112-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.874	-43.346	1
ACR9466	ITAPE113-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.620	-43.463	1
ACR9466	ITAPE114-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.620	-43.463	1
ACR9466	ITAPE115-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.620	-43.463	1
ACR9466	ITAPE116-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.620	-43.463	1
ACR9466	ITAPE117-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.874	-43.346	1
ACR9466	ITAPE118-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.874	-43.346	1
ACR9466	ITAPE119-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.874	-43.346	1
ACR9466	ITAPE120-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.874	-43.346	1
ACR9466	ITAPE121-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.874	-43.346	1
ACR9466	ITAPE122-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.874	-43.346	1
ACR9466	ITAPE123-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.874	-43.346	1
ACR9466	ITAPE124-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.874	-43.346	1
ACR9466	ITAPE125-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-6.361	-44.348	1
ACR9466	ITAPE126-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-6.361	-44.348	1
ACR9466	ITAPE127-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-6.025	-44.249	1
ACR9466	ITAPE128-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-6.025	-44.249	1
ACR9466	ITAPE129-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.891	-43.414	1
ACR9466	ITAPE130-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.891	-43.414	1
ACR9466	ITAPE131-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.891	-43.414	1
ACR9466	RENA032-16	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.890	-43.415	1
ACR9466	RENA033-16	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.890	-43.415	1
ACR9466	RENA034-16	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.890	-43.415	1
ACR9466	RENA035-16	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.890	-43.415	1
ACR9466	RENA036-16	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.890	-43.415	1
ACR9466	RENA037-16	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.890	-43.415	1
ACR9466	RENA038-16	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.890	-43.415	1
ACR9466	RENA039-16	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.890	-43.415	1
AFU2064	AMTRA212-19	<i>H. malabaricus</i>	Rio Pericumã	-2.511	-44.944	4
AFU2064	AMTRA213-19	<i>H. malabaricus</i>	Rio Pericumã	-2.511	-44.944	4
AFU2064	AMTRA210-19	<i>H. malabaricus</i>	Rio Mearim	-4.397	-46.842	4

AFU2064	AMTRA164-19	<i>H. malabaricus</i>	Rio Urumajó	-1.072	-46.640	4
AFU2064	AMTRA259-24	<i>H. malabaricus</i>	Rio Caeté	-1.072	-46.746	3
AFU2064	AMTRA165-19	<i>H. malabaricus</i>	Rio Caeté	-1.072	-46.746	4
AFU2064	AMTRA260-24	<i>H. malabaricus</i>	Rio Caeté	-1.072	-46.746	3
AFU2064	AMTRA261-24	<i>H. malabaricus</i>	Rio Caeté	-1.072	-46.746	3
AFU2064	AMTRA173-19	<i>H. malabaricus</i>	Rio Caeté	-1.072	-46.746	4
AFU2064	AMTRA172-19	<i>H. malabaricus</i>	Rio Caeté	-1.072	-46.746	4
AFU2064	AMTRA168-19	<i>H. malabaricus</i>	Rio Caeté	-1.072	-46.746	4
AFU2064	AMTRA174-19	<i>H. malabaricus</i>	Rio Caeté	-1.072	-46.746	4
AFU2064	AMTRA239-23	<i>H. malabaricus</i>	Riacho Grande	-6.429	-45.997	3
AFU2064	AMTRA228-22	<i>H. malabaricus</i>	Rio Peria	-2.527	-43.269	3
AFU2064	AMTRA218-19	<i>H. malabaricus</i>	Rio Peria	-2.527	-43.269	3
AFU2064	ITAPE096-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-2.94	-44.240	1
AFU2064	ITAPE101-15	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-2.94	-44.240	1
AFU2064	ANGBF33222-19	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-6.361	-44.348	5
AFU2064	ANGBF33223-19	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-6.025	-44.249	5
AFU2064	ANGBF33224-19	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-6.025	-44.249	5
AFU2064	ANGBF33225-19	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.891	-43.414	5
AFU2064	ANGBF33226-19	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.891	-43.414	5
AFU2064	ANGBF33227-19	<i>H. malabaricus</i>	Rio Itapecurú	-4.891	-43.414	5
AFU2064	GBOL2290-17	<i>H. malabaricus</i>	Rio Maroni	3.178	-55.419	1
AFU2064	GBOL2291-17	<i>H. malabaricus</i>	Rio Maroni	3.178	-55.419	1
AFU2064	HPRB063-17	<i>H. malabaricus</i>	Rio Commewijne	5.315	-54.833	2
AFU2064	HPRB064-17	<i>H. malabaricus</i>	Rio Suriname	4.183	-55.433	2
AFU2064	HPRB065-17	<i>H. malabaricus</i>	Rio Commewijne	5.315	-54.833	2
AFU2064	HPRB067-17	<i>Hoplías</i> sp.	Rio Saramacca	5.119	-55.283	2
AFU2064	HPRB069-17	<i>H. malabaricus</i>	Rio Saramacca	4.428	-55.764	2
AFU2064	HPRB070-17	<i>H. malabaricus</i>	Rio Coppename	5.232	-55.804	2
AFU2064	HPRB071-17	<i>H. malabaricus</i>	Rio Commewijne	4.450	-57.163	2
AFU2064	HPRB072-17	<i>H. malabaricus</i>	Rio Coppename	5.232	-55.804	2
AFU2064	HPRB073-17	<i>Hoplías</i> sp.	Rio Maroni	3.178	-55.419	2
AFU2064	HPRB075-17	<i>H. malabaricus</i>	Rio Saramacca	4.428	-55.764	2
AFU2064	HPRB077-17	<i>Hoplías</i> sp.	Rio Suriname	5.244	-55.100	2
AFU2064	HPRB078-17	<i>Hoplías</i> sp.	Alto Saramacca	4.428	-55.764	2
AFU2064	HPRB079-17	<i>Hoplías</i> sp.	Alto Saramacca	4.290	-55.803	2
AFU2064	HPRB080-17	<i>H. malabaricus</i>	Rio Corantijne	4.422	-57.191	2
AFU2064	HPRB081-17	<i>Hoplías</i> sp.	Rio Saramacca	5.119	-55.283	2
AFU2064	HPRB082-17	<i>H. malabaricus</i>	Rio Maroni	3.178	-55.419	2
AFU2064	HPRB083-17	<i>H. malabaricus</i>	Rio Maroni	3.178	-55.419	2
AFU2064	HPRB084-17	<i>Hoplías</i> sp.	Alto Saramacca	4.290	-55.803	2

Fonte: (1) *BOLD Systems* (<http://www.boldsystems.org>); (2) Cardoso *et al.* 2018; (3) Este estudo; (4) Guimarães *et al.* 2022; (5) Jacobina *et al.* 2018.

Figura 9 – Distribuição dos pontos amostrais associados aos códigos BINs com ênfase na Bacia do Atlântico Nordeste Ocidental.



Legenda: 9 – Distribuição dos pontos amostrais utilizados neste estudo. Os triângulos vermelhos correspondem ao BIN:AFU2064; os triângulos azuis, ao BIN:ACR9466. Fonte: Elaboração própria (2024).

3.3 Métodos moleculares

O DNA genômico total foi extraído utilizando o protocolo de *salting-out* (Aljanabi; Martinez, 1997; Vitorino *et al.*, 2015), com algumas adaptações. Os tecidos foram macerados em microtubos de 1,5 mL, lavados com 600 μ L de água destilada e centrifugados por 1 minuto a 10.000 rpm, repetindo-se o processo três vezes. Para a lise celular, foram adicionados 440 μ L de tampão de lise (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 400 mM NaCl, 2% SDS) e 12 μ L de proteinase K (10 mg/mL), incubando-se a mistura em banho-maria a 55°C por aproximadamente 3 horas. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 300 μ L de NaCl (5 M), misturando-se manualmente por 10 minutos, seguido de centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante contendo o DNA, aproximadamente 600 μ L, foi transferido para um novo microtubo e precipitado com 500 μ L de isopropanol a 100%, sendo armazenado em freezer a -20°C por 30 minutos. O DNA foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm, lavado com 700 μ L de etanol a 70%, seco e ressuspensão em 40 μ L de água estéril, incubado a 37°C

por 30 minutos e armazenado a -20°C . A qualidade do DNA foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%.

Após a extração, foi realizada a amplificação por PCR do fragmento do gene COI utilizando os primers padronizados Fish F1-5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3' e Fish R1-5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3' (Ward *et al.*, 2005). As reações de PCR seguiram os seguintes passos: 1) desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 2) desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 59°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 2 minutos, repetindo-se esse ciclo 35 vezes; 3) extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos das reações foram corados com GelRed (Biotium) e visualizados em gel de agarose a 1%. Em seguida, as amostras foram purificadas utilizando o protocolo de polietilenoglicol 8000 (PEG 20%) (Dun; Blattner, 1987) e, posteriormente, sequenciadas unidirecionalmente em sequenciador automático de DNA modelo ABI 3500 (*Applied Biosystems*), utilizando o kit ABI Prism Big Dye Terminator V.3, conforme as instruções do fabricante. Parte das amostras foi sequenciada no Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBio), enquanto a outra parte foi sequenciada pela empresa "ACTGene Análises Moleculares", utilizando o mesmo kit e protocolo de sequenciamento.

3.4 Análise dos dados

Foram utilizadas sequências parciais do gene COI com 684 pares de bases. As sequências foram alinhadas através do algoritmo *ClustalW* (Thompson; Higgins; Gibson, 1994), implementado no software BioEdit (Hall, 1999), e a qualidade do alinhamento inspecionada visualmente. As reconstruções das relações filogenéticas foram realizadas pelo método *Neighbor-Joining* (NJ), o suporte estatístico dos agrupamentos foi calculado pelo método Bootstrap, com 1000 replicações (Felsenstein, 1985). As reconstruções filogenéticas foram processadas com o software MEGA11 (Tamura; Stecher; Kumar, 2021) e editadas com o FigTree v.1.4.4 (Rambaut, 2018). As distâncias genéticas inter e intraespecíficas foram calculadas com base nos valores de distância p , em comparações par-a-par, utilizando o software Mega 11 (Tamura; Stecher; Kumar, 2021).

A delimitação molecular das espécies foi realizada pelo método *Barcode Index Number* (BIN) disponível na plataforma *BOLD Systems* (<http://www.boldsystems.org>) (Ratnasingham; Hebert, 2007), para identificar MOTUs delimitadas como espécie. O BIN utiliza um algoritmo denominado *Refined Single Linkage Analysis* (RESL) para encontrar clusters – grupos de sequências de DNA agrupadas com base em sua similaridade genética – a partir dos dados de entrada e da biblioteca arquivada do BOLD. As MOTUs são definidas por

meio de clusters de sequências com muita similaridade, e essa abordagem é fundamental para a delimitação de espécies em estudos de biodiversidade (Ratnasingham; Hebert, 2013).

Para explorar a variação molecular e as relações entre diferentes linhagens do complexo *H. malabaricus*, foi construída uma rede de haplótipos usando o critério *Median Joining* empregado no programa PopArt 1.7 (Leigh; Bryant, 2015). Os dados haplotípicos foram obtidos usando o software DNAsp v.6 (Rozas *et al.*, 2017).

4 RESULTADOS

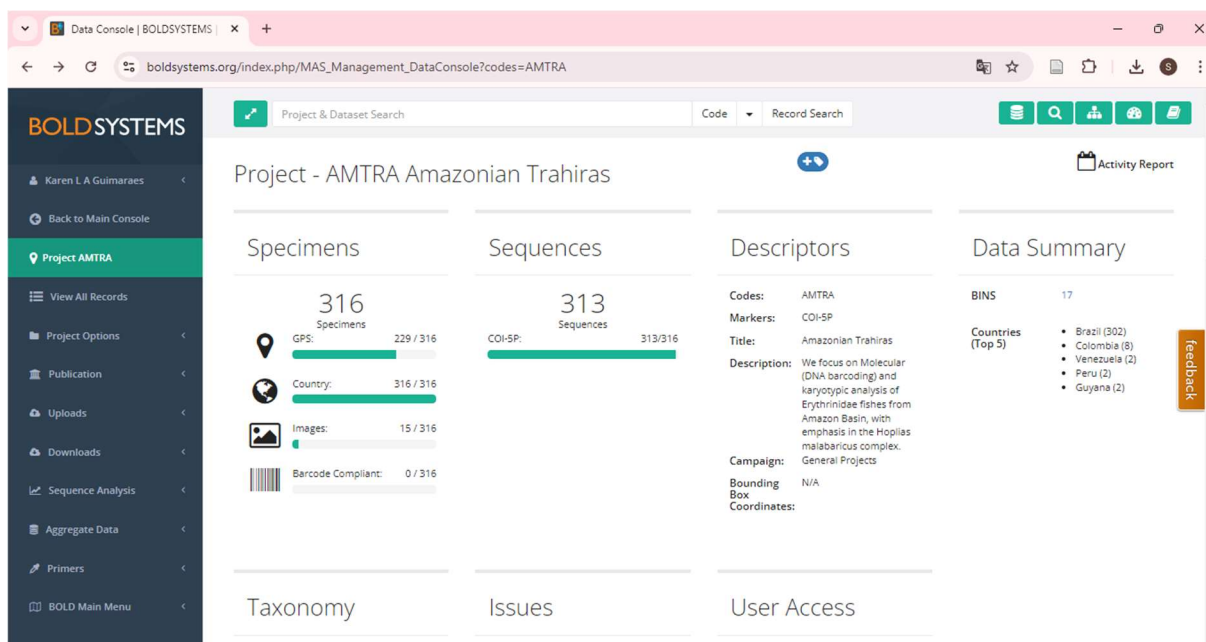
O DNA genômico de 21 indivíduos de *Hoplias malabaricus* da Bacia do Atlântico Nordeste Ocidental foi extraído e a região DNA *barcode* foi sequenciada com sucesso. Todas as novas sequências *barcode* de traíras (gene mitocondrial COI) foram depositadas na base de dados do repositório público *BOLD Systems* e vinculadas ao Projeto AMTRA: “*Amazonian Traíras*” (Figura 10).

O Projeto AMTRA foi lançado com a proposta de explorar a diversidade genética de peixes da família Erythrinidae na Bacia Amazônica, por meio de análises moleculares (DNA *barcoding*) e cariotípicas, com ênfase no complexo *Hoplias malabaricus*. O Laboratório de Genética e Biodiversidade da Universidade Federal do Oeste do Pará é responsável pela idealização, coordenação e execução do projeto, o qual teve início em 2013 e, ao longo do tempo, ampliou o banco de dados de DNA *barcoding* das traíras, contribuindo com novas sequências e expandindo a cobertura geográfica e taxonômica das amostras coletadas.

Atualmente, o projeto é reconhecido como o maior contribuinte de sequências de DNA *barcoding* de traíras no repositório público *BOLD Systems*, com um total de 313 sequências depositadas. Essas sequências estão distribuídas entre os seguintes países: Brasil, Colômbia, Venezuela, Peru e Guiana. Em termos de dados taxonômicos, o projeto possui sequências de *Hoplias malabaricus*, *Hoplias auri*, *Hoplias curupira* e *Hoplias misionera*.

Os resultados obtidos por meio do Projeto AMTRA contribuíram para os estudos realizados por Guimarães *et al.*, (2022), Guimarães *et al.* (2021a); Guimarães *et al.* (2021b), Marques *et al.* 2011, Marques *et al.* (2013) e o presente estudo.

Figura 10 – Interface web da plataforma *BOLD Systems* demonstrando o projeto AMTRA.



Fonte: Elaboração própria (2024).

No total, foram analisadas 106 sequências do gene COI mitocondrial de *Hoplias malabaricus*. Após a edição inicial para triagem e alinhamento as sequências deste estudo apresentaram um comprimento de 549pb, sem códons de parada ou inserções/deleções (indels), sugerindo a integridade das sequências analisadas (Apêndice A). A composição de bases nucleotídicas foi de 30,7% de Timina (T), 29% de Citosina (C), 22,5% de Adenina (A) e 17,8% de Guanina (G), refletindo uma predominância de bases pirimídicas (T e C), que somam 59,7%, em relação às bases purínicas (A e G), que representam 40,3%.

Para compreender a diversidade genética e as relações evolutivas entre as sequências, foi gerada uma árvore filogenética utilizando o método NJ. Este método é eficaz para inferir a filogenia com base nas distâncias genéticas entre as sequências, ele constrói uma árvore filogenética que reflete essas distâncias e foi escolhido por sua capacidade de representar visualmente as relações evolutivas de maneira clara.

A árvore filogenética pelo método NJ revelou três clusters distintos, associados às seguintes espécies conforme o método BIN: *Hoplias malabaricus* (BIN:AFU2064), *H. malabaricus* (BIN:ACR9466) e *Hoplias lacerdae* (BIN:ABW2258). A identificação desses clusters demonstra a estrutura genética dentro da BANOC, refletindo diferenças entre as espécies e possíveis linhagens dentro de *H. malabaricus* (Figura 11).

Além disso, utilizando o método BIN, foram identificadas duas linhagens evolutivamente distintas entre as populações de *Hoplias malabaricus* na BANOC. A primeira

linhagem, associada ao BIN:AFU2064, é amplamente distribuída, incluindo amostras da localidade-tipo (Suriname). A segunda linhagem, associada ao BIN:ACR9466, foi encontrada nas sub-bacias dos rios Itapecuru e Riacho Grande.

A distância genética (p) entre as linhagens definidas pelo BIN para o gene COI é sustentada por uma distância interespecífica de 2,9% indicando uma divergência considerável, enquanto a variação genética dentro do cluster AFU2064 é de 2% (Tabela 3).

A análise das 104 sequências de DNA, excluindo-se o grupo externo, permitiu identificar 26 haplótipos distintos e 56 sítios polimórficos, resultando em uma diversidade haplotípica (Hd) de 0,7582. A rede de haplótipos foi criada para visualizar as relações entre os haplótipos e interpretar a variabilidade genética. Esta rede ilustra como os haplótipos estão distribuídos e como a diversidade é compartilhada entre as sub-bacias. O grupo BIN:ACR9466 mostrou cinco haplótipos na sub-bacia do rio Itapecuru e um haplótipo compartilhado com a sub-bacia do Riacho Grande. O grupo BIN:AFU2064 apresentou uma vasta distribuição de haplótipos, incluindo amostras da localidade tipo, conforme mostrado na Figura 12.

Tabela 3 – Distâncias genéticas (p) entre linhagens de *H. malabaricus* identificadas pelo sistema BIN para o gene COI. Os valores de divergência intraespecíficas estão demonstrados em negrito.

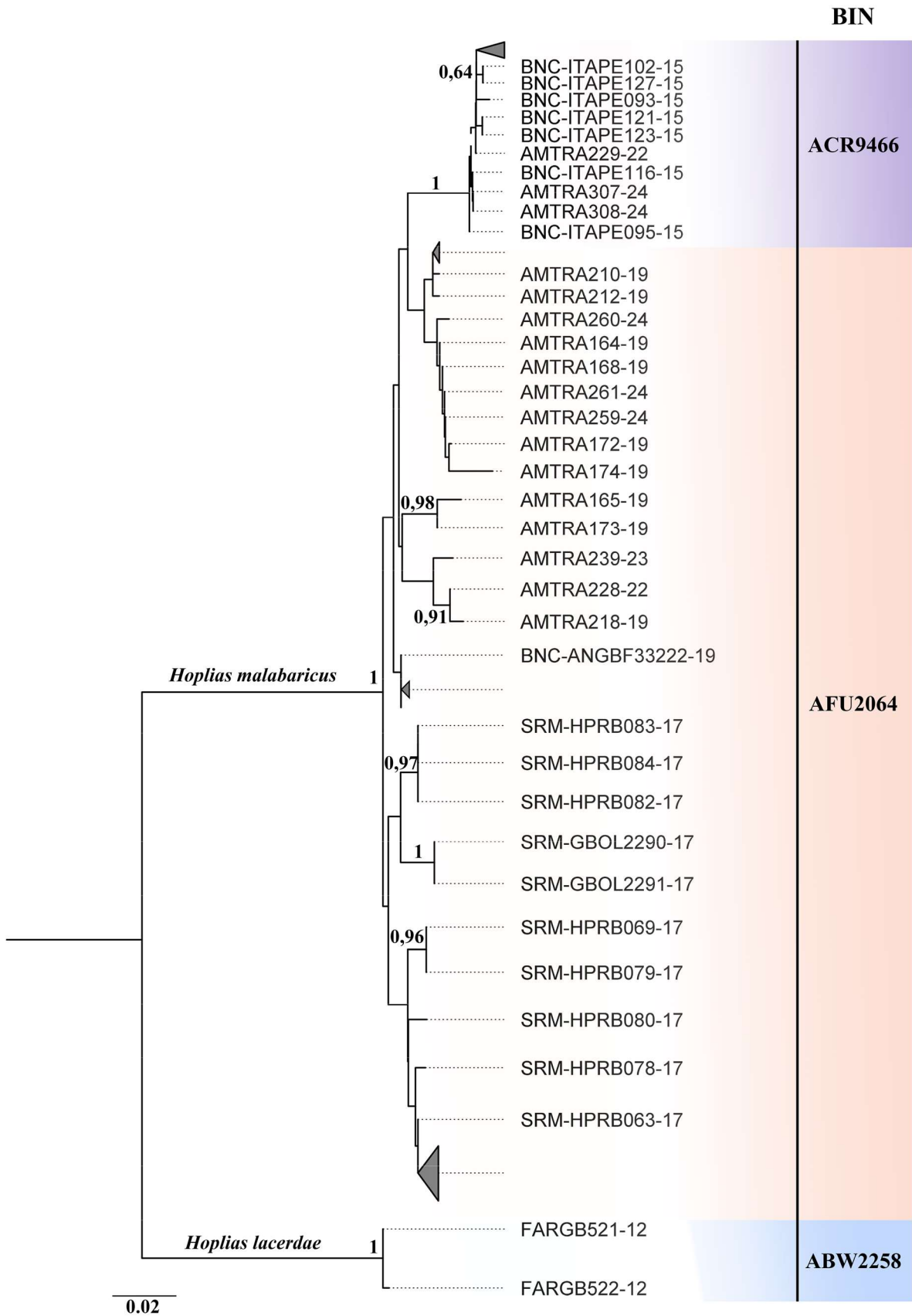
	ACR9466	AFU2064	<i>Hoplias lacerdae</i>
ACR9466	0		
AFU2064	0.0292	0.02	
<i>Hoplias lacerdae</i>	0.1395	0.1307	0

Fonte: Elaboração própria (2024).

A diversidade haplotípica observada, com um índice de Hd de 0,7582, é significativa para compreender a variabilidade genética nas populações de *H. malabaricus*. Segundo Funk e Omland, (2003), a Hd sugere uma maior capacidade adaptativa das populações e indica a presença de múltiplas linhagens evolutivas na área estudada.

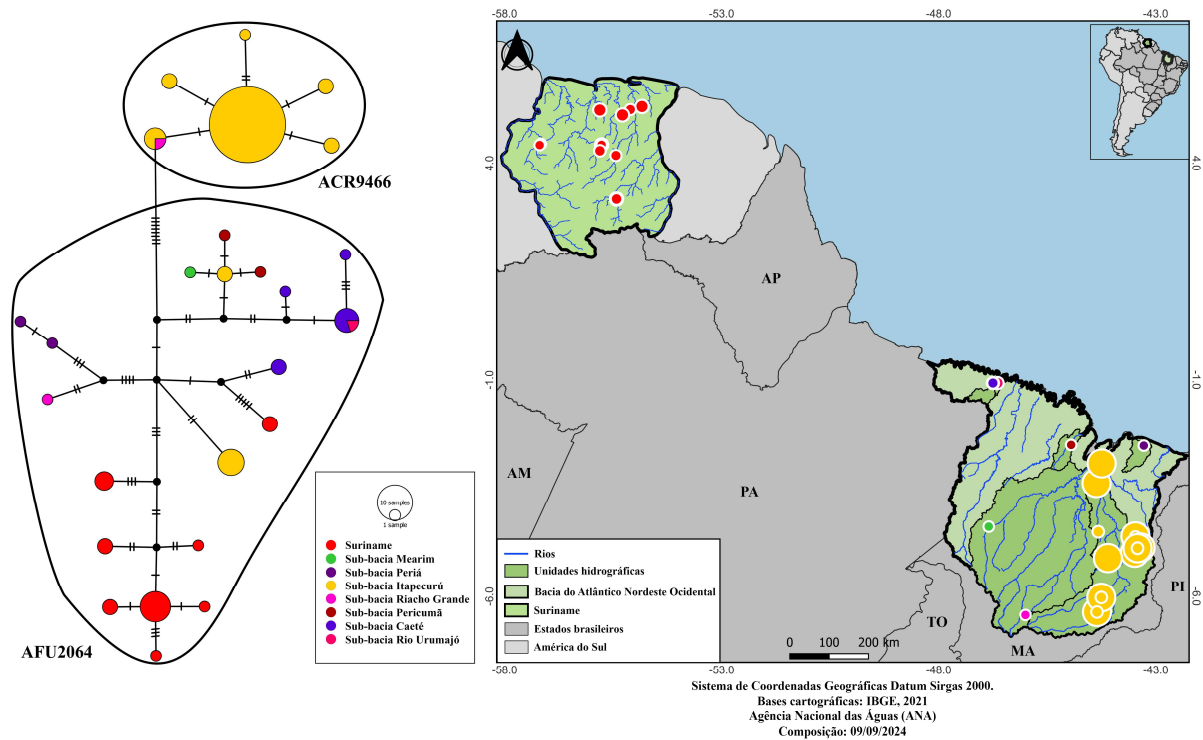
Os resultados obtidos fornecem uma visão sobre a diversidade genética e a estrutura das populações de *H. malabaricus* na Bacia do Atlântico Nordeste Ocidental. A árvore filogenética e a análise de haplótipos revelam a presença de duas linhagens distintas e suas diversidades genéticas, destacando a importância da análise filogenética para compreender a variabilidade e a estrutura das populações.

Figura 11 – Árvore filogenética de *Neighbor-Joining* baseada nas sequências do gene mitocondrial COI.



Legenda: 11 – Alguns ramos foram colapsados para melhor visualização da árvore filogenética. A barra lateral indica as divisões de delimitação das espécies com base nos códigos BINs. Fonte: Elaboração própria (2024).

Figura 12 – Diagrama de *Median Joining* dos haplótipos de *H. malabaricus*, baseado no gene mitocondrial COI, com indicação das ocorrências dos haplótipos ao longo da Bacia do Atlântico Nordeste Ocidental e no Suriname.



Legenda: 12 – Diagrama de *Median Joining*: foram identificados 26 haplótipos, com o tamanho dos círculos proporcional às suas frequências. As cores representam os haplótipos associados às diferentes sub-bacias. As elipses indicam os códigos BIN aos quais cada haplótipo pertence (BIN:ACR9466 e BIN:AFU2064). Pequenos círculos pretos representam haplótipos não amostrados ou possivelmente extintos. As barras perpendiculares indicam etapas mutacionais. Fonte: Elaboração própria (2024).

5 DISCUSSÃO

A árvore filogenética revela as distâncias genéticas entre os indivíduos, permitindo a análise das relações evolutivas entre os organismos. Esse tipo de análise evidencia como as espécies estão relacionadas entre si e com seus ancestrais comuns, proporcionando conhecimento acerca da biodiversidade e da evolução das espécies (Caldart *et al.*, 2016).

A árvore de NJ revelou três clusters distintos (Figura 10), correspondentes às categorias de espécies definidas pelo método BIN: *Hoplias malabaricus* (BIN:AFU2064 e BIN:ACR9466) e *Hoplias lacerdae* (BIN:ABW2258). A presença desses clusters indica a estrutura genética dentro da BANOC. O cluster BIN:AFU2064 representa indivíduos provenientes de todas as sub-bacias e da localidade-tipo, Suriname. Os espécimes do Suriname também apresentam distância genética em relação aos demais indivíduos do mesmo cluster (Tabela 3), enquanto o BIN:ACR9466 está restrito a sub-bacias específicas, do rio Itapecuru e do Riacho Grande, que são bacias vizinhas, sendo o Riacho Grande um divisor de águas entre

as sub-bacias do rio Itapecuru e do rio Mearim, sugerindo uma diferenciação geográfica significativa entre as populações.

Os resultados deste estudo revelam a estrutura genética de *Hoplias malabaricus*, com a identificação de duas linhagens distintas na BANOC. Esses achados contribuem para a compreensão da variabilidade genética do grupo *Hoplias malabaricus* na região. A diversidade genética desse grupo já havia sido relatada por Guimarães *et al.* (2022), que observaram uma elevada variabilidade genética entre os espécimes da BANOC e da bacia do Tocantis, com a presença de 11 haplótipos e uma alta diversidade haplotípica de 0,947, dos quais 7 haplótipos são exclusivos da BANOC. Isso indica que as sub-bacias do Atlântico Nordeste Ocidental podem abrigar uma diversidade genética ainda subestimada, o que pode ter importantes implicações para futuras revisões taxonômicas e estratégias de conservação.

As divergências genéticas observadas com o limiar de 2% em *H. malabaricus* sugerem uma diferenciação específica significativa dentro do gênero *Hoplias* (Tabela 3). Esse nível de variação está em conformidade com o que foi reportado em estudos anteriores, que discutem a complexidade do processo de especiação dentro deste grupo (Cardoso *et al.*, 2018; Guimarães *et al.*, 2022; Jacobina *et al.*, 2018; Marques *et al.*, 2013).

A literatura tem documentado distâncias genéticas para o gene COI entre diferentes espécies de *Hoplias*, refletindo essa complexidade. Por exemplo, *H. misionera* e *H. argentinensis* apresentaram divergências de 5,6% e 9,0%, respectivamente, em relação às suas espécies irmãs (Rosso *et al.*, 2016, 2018). Em contraste, *H. auri* exibiu uma divergência de 3% em relação a outras espécies do gênero (Guimarães *et al.*, 2021). Esses dados reforçam a ideia de que o processo de especiação em *Hoplias* é dinâmico e variável, com diferentes espécies apresentando distintos graus de divergência genética.

As distâncias genéticas encontradas entre as linhagens (2,9% entre BIN:AFU2064 e BIN:ACR9466) e dentro do cluster AFU2064 (2%) são indicativas de uma divergência evolutiva substancial. A distância genética interespecífica sugere uma separação evolutiva importante, enquanto a variação dentro do cluster aponta para uma diversidade genética moderada. A variação intraespecífica observada no cluster BIN:AFU2064, junto à distinção interespecífica em relação ao cluster BIN:ACR9466, sugere a presença de diversidade críptica, particularmente na bacia do rio Itapecuru e Riacho Grande. Esses resultados corroboram com estudos anteriores que mostram a importância das distâncias genéticas na compreensão da evolução e adaptação das espécies (Hebert *et al.*, 2003; Hebert; Gregory, 2005).

A análise revelou 26 haplótipos distintos e 56 sítios polimórficos, com uma Hd de 0,7582. A rede de haplótipos criou um panorama detalhado das relações entre os haplótipos e

mostrou a separação entre o grupo BIN:ACR9466 e o grupo BIN:AFU2064. O grupo BIN:ACR9466 possui um conjunto de cinco haplótipos na sub-bacia do rio Itapecuru e um haplótipo compartilhado com a sub-bacia do Riacho Grande, enquanto o grupo BIN:AFU2064 demonstra maior distribuição, incluindo amostras de ambas as sub-bacias (Figura 11).

O método de DNA *barcoding* revelou-se eficiente na identificação das espécies e na determinação das linhagens mitocondriais de *H. malabaricus* (Guimarães *et al.*, 2022; Jacobina *et al.*, 2018). A precisão do método BIN para a identificação de espécies foi corroborada pelos dados filogenéticos e pela análise de haplótipos.

A Tabela 4 apresenta as principais características genéticas e as localidades das sequências relacionadas à nova espécie candidata, reforçando a hipótese de que ela representa uma linhagem ainda não descrita. A análise das distâncias genéticas, bem como a estrutura dos haplótipos, sugere diferenciação em relação às outras populações de *H. malabaricus*.

Tabela 4 – Informações genéticas e localidades das sequências relacionadas à nova espécie candidata de *H. malabaricus* identificadas neste estudo.

Código BIN	Amostra	Sub-bacia	Haplótipo	Distância interespecífica
ACR9466	AMTRA297-24	Rio Itapecurú	Hap_1	2,9%
ACR9466	AMTRA229-22	Rio Itapecurú	Hap_1	2,9%
ACR9466	AMTRA230-22	Rio Itapecurú	Hap_1	2,9%
ACR9466	AMTRA231-22	Rio Itapecurú	Hap_1	2,9%
ACR9466	AMTRA298-24	Rio Itapecurú	Hap_1	2,9%
ACR9466	AMTRA299-24	Rio Itapecurú	Hap_1	2,9%
ACR9466	AMTRA243-24	Rio Itapecurú	Hap_2	2,9%
ACR9466	AMTRA244-24	Rio Itapecurú	Hap_1	2,9%
ACR9466	AMTRA245-24	Rio Itapecurú	Hap_1	2,9%
ACR9466	AMTRA246-24	Rio Itapecurú	Hap_2	2,9%
ACR9466	AMTRA301-24	Rio Itapecurú	Hap_1	2,9%
ACR9466	AMTRA302-24	Rio Itapecurú	Hap_1	2,9%
ACR9466	AMTRA303-24	Rio Itapecurú	Hap_1	2,9%
ACR9466	AMTRA307-24	Rio Itapecurú	Hap_10	2,9%
ACR9466	AMTRA308-24	Riacho Grande	Hap_10	2,9%

Fonte: Elaboração própria (2024).

A diferenciação observada entre as linhagens pode estar associada a fatores ambientais e biogeográficos. Espécies de peixes amplamente distribuídas, como *H. malabaricus* (Reis, 2003), estão expostas a extensas mudanças evolutivas e impulsos ecológicos que promovem eventos de dispersão (Albert; Reis, 2011; Cardoso; Montoya-Burgos, 2009; Guimarães *et al.*, 2022; Hoorn *et al.*, 2009). A distribuição das populações de *Hoplias*

malabaricus nas bacias hidrográficas da BANOC pode ser influenciada por barreiras geográficas que delimitam a dispersão genética entre as sub-bacias (Forien, 2019).

Os resultados deste estudo demonstram variações genéticas intraespecíficas significativas dentro de *H. malabaricus*, que podem ser indicativas de fluxo gênico histórico ou recente entre as sub-bacias. A observação de linhagens geneticamente distintas dentro da mesma bacia sugere que eventos geológicos ou mudanças climáticas, que no passado permitiram a interconectividade das bacias, podem ter facilitado a migração e a mistura genética entre as populações (Calvez *et al.*, 2022). Essas linhagens distintas dentro de *H. malabaricus* destacam a complexidade da especiação e da estrutura populacional nesta região, reforçando a ideia de que as bacias hidrográficas atuam como unidades de endemismo, moldando a diversidade genética local (Alexander *et al.*, 2006; Vergara; Azpelicueta; Garcia, 2008).

As características ecológicas de *H. malabaricus* também devem ser consideradas ao interpretar os padrões genéticos observados. Como uma espécie de hábito sedentário com pouco ou nenhum deslocamento migratório (Almeida; Hahn; Vazzoler, 1997; Suzuki *et al.*, 2018), *H. malabaricus* tende a ter uma menor capacidade de superar barreiras físicas, como divisões naturais entre bacias hidrográficas, ou evitar pressões ambientais específicas. Isso resulta em um maior acúmulo dos efeitos de eventos vicariantes e processos ecológicos no DNA das populações isoladas (López-Fernández *et al.*, 2013). Essa limitação na dispersão pode favorecer um aumento na diversidade genética entre as populações de diferentes bacias hidrográficas, como observado no presente estudo.

As pressões seletivas exercidas pelos diferentes ambientes aquáticos nas sub-bacias do Itapecuru e Riacho Grande parecem desempenhar um papel crucial na diversificação das populações de *H. malabaricus*. Por exemplo, as características hidrológicas distintas, como a presença de lagoas marginais que se isolam durante a estiagem, podem criar microhabitats que favorecem a seleção de haplótipos específicos adaptados a condições ambientais (Wagner *et al.*, 2017). Considerando a preferência de *H. malabaricus* por ambientes lênticos (Petry; Agostinho; Gomes, 2003), sua diversidade genética pode estar intimamente ligada à arquitetura de drenagem das bacias hidrográficas onde habita (Piorski, 2010).

Em seu estudo, Piorski, (2010) observou que os maiores índices de diversidade genética em *H. malabaricus* foram encontrados em drenagens com cursos d'água meandantes, que formam diversas lagoas marginais durante o período de estiagem. Esse cenário de isolamento temporário das lagoas pode ter desempenhado um papel crucial na geração da variabilidade genética observada na espécie, uma vez que as populações isoladas podem ter

experimentado eventos de deriva genética e seleção local, resultando em uma maior diversificação genética (Angst *et al.*, 2022; Sachdeva, 2022).

A diferenciação observada entre as linhagens de *H. malabaricus* pode estar diretamente relacionada a fatores ambientais e biogeográficos específicos das sub-bacias dos rios Itapecuru e Riacho Grande. As variações nos habitats dessas regiões podem ter contribuído para o isolamento reprodutivo, levando à divergência genética entre as populações.

A identificação de linhagens geneticamente distintas dentro da BANOC ressalta a necessidade de estratégias de conservação que levem em conta essa diversidade intraespecífica. A presença de um haplótipo único e a coexistência de linhagens distintas dentro da mesma bacia sugerem que as populações de *H. malabaricus* podem estar adaptadas a seus ambientes locais.

A RH abordada neste estudo é composta por drenagens de sub-bacias hidrográficas que abrigam uma ictiofauna ainda pouco explorada (Abreu *et al.*, 2019; Barros, Mc; Fraga; Birindelli, 2011; Piorski, 2010). A história geológica singular dessas sub-bacias tem favorecido a descoberta de novos táxons (Abreu *et al.*, 2019), evidenciando o potencial da área para a identificação de espécies endêmicas. Ao longo dos últimos anos, diversas espécies foram descritas na região (Guimarães *et al.*, 2018a, 2018b; Lucena, 2007; Ottoni, 2011; Piorski *et al.*, 2008), o que reforça a importância de análises detalhadas dos grupos taxonômicos presentes, podendo resultar no reconhecimento de novas espécies exclusivas dessa área.

Os resultados obtidos são consistentes com estudos anteriores sobre *Hoplias* e outras espécies de peixes em regiões similares, que também identificaram diferenças genéticas significativas entre populações geograficamente isoladas (por exemplo, Blanco *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2018; Grassi *et al.*, 2017).

Esta pesquisa desempenha um papel crucial no aprofundamento do conhecimento sobre a diversidade taxonômica e a estrutura genética de *H. malabaricus* na Bacia do Atlântico Nordeste Ocidental. A complexidade revelada na estrutura populacional de *H. malabaricus* neste estudo evidencia a necessidade de uma abordagem taxonômica integrativa, que forneça uma compreensão mais abrangente das relações evolutivas entre as linhagens identificadas.

6 CONCLUSÃO

O estudo ampliou o conhecimento sobre a diversidade taxonômica molecular grupo *Hoplias malabaricus* na BANOC, apresentando a existência de duas linhagens distintas de traíras na região de estudo. Uma dessas linhagens pode ser atribuída à espécie *Hoplias*

malabaricus stricto sensu, enquanto a outra, restrita às bacias do rio Itapecuru e Riacho Grande, pode representar uma espécie nova ainda não descrita.

Esses achados contribuem para o entendimento da diversidade genética e evolutiva de *H. malabaricus* e destacam a necessidade de uma abordagem taxonômica integrativa para uma classificação mais precisa. Além disso, eles ressaltam a importância de estratégias de conservação que reconheçam e preservem a diversidade genética dentro da BANOC, considerando as possíveis espécies novas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. M. S. *et al.* **Historical biogeography of fishes from coastal basins of Maranhão State, northeastern Brazil.** *Neotropical Ichthyology*, [S. l.], v. 17, p. e180156, 19 jun. 2019.

AGUIAR, R. G. *et al.* **A new species of *Knodus* (Characiformes: Characidae), with deep genetic divergence, from the Mearim and Munim river basins, Northeastern Brazil, and evidence for hidden diversity in adjacent river basins.** *Neotropical Ichthyology*, [S. l.], v. 20, n. 2, p. e210173, 2022.

ALBERT, J. S.; REIS, R. E. **Introduction To Neotropical Freshwaters.** *In*: ALBERT, J. S.; REIS, R. (org.). *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. [S. l.]: University of California Press, 2011. p. 3–20. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1525/9780520948501-003/pdf?licenseType=restricted>. Acesso em: 16 ago. 2024.

ALEXANDER, H. J. *et al.* **Parallel Evolution and Vicariance in the Guppy (*Poecilia reticulata*) Over Multiple Spatial and Temporal Scales.** *Evolution*, [S. l.], v. 60, n. 11, p. 2352–2369, 2006.

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. **Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques.** *Nucleic Acids Research*, [S. l.], v. 25, n. 22, p. 4692–4693, 1 nov. 1997.

ALMEIDA, V. L. L.; HAHN, N. S.; VAZZOLER, A. E. A. de M. **Feeding patterns in five predatory fishes of the high Paraná River floodplain (PR, Brazil).** *Ecology of Freshwater Fish*, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 123–133, 1997.

ANA. **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil: regiões hidrográficas brasileiras.** [S. l.]: Agência Nacional das Águas, 2015.

ANGST, P. *et al.* **Genetic Drift Shapes the Evolution of a Highly Dynamic Metapopulation.** *Molecular Biology and Evolution*, [S. l.], v. 39, n. 12, p. msac264, 1 dez. 2022.

ARCILA, D.; PETRY, P.; ORTÍ, G. **Phylogenetic relationships of the family Tarumaniidae (Characiformes) based on nuclear and mitochondrial data.** *Neotropical Ichthyology*, [S. l.], v. 16, p. e180016, 11 out. 2018.

AZPELICUETA, M. de L. M. *et al.* **A new species of the genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae), a tararira from the lower Paraná River in Misiones, Argentina.** Accepted: 2018-05-14T15:06:45Z, nov. 2015. Disponível em: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/45064>. Acesso em: 18 set. 2024.

BARROS, L. A.; MORAES FILHO, J.; OLIVEIRA, R. L. **Larvas de nematóides de importância zoonótica encontradas em traíras (*Hoplias malabaricus* bloch, 1794) no município de Santo Antonio do Leverger, MT.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, [S. l.], v. 59, p. 533–535, abr. 2007.

BARROS, M.; FRAGA, E.; BIRINDELLI, J. **Fishes from the Itapecuru River basin, State of Maranhão, northeast Brazil.** *Brazilian Journal of Biology*, [S. l.], v. 71, n. 2, p. 375–380, maio 2011.

BELGER, L. **Influência de alguns fatores ambientais sobre o nível de mercúrio em *Cichla* spp. e *Hoplias malabaricus* na bacia do Rio Negro.** [S. l.], 2001.

BERRA, T. M. **Freshwater Fish Distribution.** [S. l.]: Academic Press, 2001.

BERTOLLO, *et al.* **A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations.** Chromosome Research, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 603–613, 1 out. 2000.

BERTOLLO, Luiz Antonio Carlos. **Chromosome evolution in the Neotropical Erythrinidae fish family: An overview.** In Fish Cytogenetics; Pizano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B.G., Eds. [S. l.]: CRC Press, 2007.

BLANCO, D. R. *et al.* **Karyotypic diversity between allopatric populations of the group *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae): evolutionary and biogeographic considerations.** Neotropical Ichthyology, [S. l.], v. 8, p. 361–368, 2010a.

BLANCO, D. R. *et al.* **Karyotypic diversity between allopatric populations of the group *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae): evolutionary and biogeographic considerations.** Neotropical Ichthyology, [S. l.], v. 8, p. 361–368, 2010b.

CALDART, E. T. *et al.* **Phylogenetic Analysis: Basic Concepts and Its Use as a Tool for Virology and Molecular Epidemiology.** Acta Scientiae Veterinariae, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 20, 16 jan. 2016.

CALVEZ, V. *et al.* **Dynamics of lineages in adaptation to a gradual environmental change.** Annales Henri Lebesgue, [S. l.], v. 5, p. 729–777, 2022.

CARDOSO, Y. P. *et al.* **A continental-wide molecular approach unraveling mtDNA diversity and geographic distribution of the Neotropical genus *Hoplias*.** PLOS ONE, [S. l.], v. 13, n. 8, p. e0202024, 13 ago. 2018.

CARDOSO, Y. P.; MONTOYA-BURGOS, J. I. **Unexpected diversity in the catfish *Pseudancistrus brevispinis* reveals dispersal routes in a Neotropical center of endemism: the Guyanas Region.** Molecular Ecology, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 947–964, 2009.

CARVALHO, L. N.; FERNANDES, C. H. V.; MOREIRA, V. S. S. **Alimentação de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Osteichthyes, Erythrinidae) no rio Vermelho, Pantanal Sul Mato-Grossense.** Revista Brasileira de Zoociências, [S. l.], v. 4, n. 2, 2002. Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/zoociencias/article/view/24241>. Acesso em: 19 ago. 2024.

CORRÊA, L. L. *et al.* **Behavioral changes caused by *Austrodiplostomum* spp. in *Hoplias malabaricus* from the São Francisco River, Brazil.** Parasitology Research, [S. l.], v. 113, n. 2, p. 499–503, 1 fev. 2014.

DAGOSTA, F. C. P.; PINNA, M. D. **The Fishes of the Amazon: Distribution and Biogeographical Patterns, with a Comprehensive List of Species.** Bulletin of the American Museum of Natural History, [S. l.], v. 2019, n. 431, p. 1–163, jun. 2019.

DERGAM, J. A. *et al.* **Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae:Characiformes) in the Iguçu, Tibagi, and Paraná Rivers.** Genetics and Molecular Biology, [S. l.], v. 21, p. 493–496, dez. 1998.

DUN, I. S.; BLATTNER, F. R. **Charons 36 to 40: multi enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and ploystuffers**. *Nucleic Acids Research*, [S. l.], v. 15, n. 6, p. 2677–2698, 25 mar. 1987.

FELSENSTEIN, J. **CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP**. *Evolution*, [S. l.], v. 39, n. 4, p. 783–791, jul. 1985.

FORIEN, R. **Gene flow across geographical barriers — scaling limits of random walks with obstacles**. *Stochastic Processes and their Applications*, [S. l.], v. 129, n. 10, p. 3748–3773, 1 out. 2019.

FRANÇA, M. J. de P. **Comportamento predatório da traíra (*Hoplias aff. malabaricus*) (Bloch, 1794) em um riacho de altitude, avaliado pelo uso de BRUVs**. 2022. Disponível em: <https://ufsj.edu.br/portal2-repositorio/File/pge/Maria%20Julia%20-%20versao%20final.pdf>. Acesso em: 21 ago. 2024.

FRICKE R., ESCHMEYER W., FONG J. D. **CAS – Eschmeyer’s catalog of fishes: Genera, species, references** [Internet]. San Francisco: California Academy of Science; 2024. Disponível em: <https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Acesso em: 19 ago. 2024.

FUNK, D. J.; OMLAND, K. E. **Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA**. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, [S. l.], v. 34, n. Volume 34, 2003, p. 397–423, 1 nov. 2003.

GRASSI, D. J. *et al.* **Cytogenetic characterization of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) from the Ctlamochita River (Córdoba, Argentina): first evidence for southernmost populations of this species complex and comments on its biogeography**. *Comparative Cytogenetics*, [S. l.], v. 11, p. 15–28, 9 jan. 2017.

GUIMARÃES, E. C. *et al.* **A new species of *Charax* (Ostariophysi, Characiformes, Characidae) from northeastern Brazil**. *Zoosystematics and Evolution*, [S. l.], v. 94, n. 1, p. 83–93, 1 fev. 2018.

GUIMARÃES, E. C. *et al.* **A new species of *Hyphessobrycon* Durbin from northeastern Brazil: evidence from morphological data and DNA barcoding (Characiformes, Characidae)**. *ZooKeys*, [S. l.], v. 765, p. 79–101, 7 jun. 2018.

GUIMARÃES, K. L. A. *et al.* **A new species of *Hoplias malabaricus* species complex (Characiformes: Erythrinidae) from the Crepori River, Amazon basin, Brazil**. *Journal of Fish Biology*, [S. l.], v. 100, n. 2, p. 425–443, 2021.

GUIMARÃES, K. L. A. *et al.* **DNA barcoding and phylogeography of the *Hoplias malabaricus* species complex**. *Scientific Reports*, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 5288, 28 mar. 2022.

GUIMARÃES, K. L. A. *et al.* **Integrative taxonomy reveals disjunct distribution and first record of *Hoplias misionera* (Characiformes: Erythrinidae) in the Amazon River basin: morphological, DNA barcoding and cytogenetic considerations**. *Neotropical Ichthyology*, [S. l.], v. 19, n. 2, p. e200110, 2021.

HALL, T. A. **BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** [S. l.: s. n.], 1999. Disponível em: <https://www.academia.edu/download/29520866/1999hall1.pdf>.

HEBERT, P. D. N. *et al.* **Biological identifications through DNA barcodes.** Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, [S. l.], v. 270, n. 1512, p. 313–321, 7 fev. 2003.

HEBERT, P. D. N.; GREGORY, T. R. **The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy.** Systematic Biology, [S. l.], v. 54, n. 5, p. 852–859, 1 out. 2005.

HOORN, C. *et al.* **Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America.** Geology, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 237–240, 1 mar. 1995.

HOORN, C. *et al.* **The Development of the Amazonian Mega-Wetland (Miocene; Brazil, Colombia, Peru, Bolivia).** Amazonia: Landscape and Species Evolution. [S. l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 2009. p. 123–142. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781444306408.ch8>. Acesso em: 16 ago. 2024.

HUBERT, N.; RENNO, J.-F. **Historical biogeography of South American freshwater fishes.** Journal of Biogeography, [S. l.], v. 33, n. 8, p. 1414–1436, 2006.

IBGE. **Bacias Hidrográficas do Brasil BHB250.** 2021. Disponível em: https://geoftp.ibge.gov.br/informacoes_ambientais/estudos_ambientais/bacias_e_divisoes_hidrograficas_do_brasil/2021/Bacias_Hidrograficas_do_Brasil_BHB250/vetores/Documentacao_Tecnica_BHB250.pdf. Acesso em: 13 set. 2024.

JACOBINA, U. P. *et al.* **DNA barcode sheds light on systematics and evolution of neotropical freshwater trahiras.** Genetica, [S. l.], v. 146, n. 6, p. 505–515, 1 dez. 2018.

LAKATOS, E. M. **Fundamentos De Metodologia Científica.** [S. l.]: Editora Atlas Ltda, 2016.

LARA, A. *et al.* **DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts.** Molecular Ecology Resources, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 421–430, 2010.

LEIGH, J. W.; BRYANT, D. **POPART: full-feature software for haplotype network construction.** Methods in Ecology and Evolution, [S. l.], v. 6, n. 9, p. 1110–1116, set. 2015.

LOPES, P. A. *et al.* **Cytotaxonomy of *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) in the Aguapey River (Province of Corrientes, Argentina).** Copeia, [S. l.], v. 1998, n. 2, p. 485–487, 1998.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H. *et al.* **TESTING FOR ANCIENT ADAPTIVE RADIATIONS IN NEOTROPICAL CICHLID FISHES.** Evolution, [S. l.], v. 67, n. 5, p. 1321–1337, 1 maio 2013.

LOREIRO, V. E.; HAHN, N. S. **Dieta e atividade da traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Osteichthyes, Erythrinidae), anos de formação do reservatório de Segredo (PR).** 1998. Disponível em: <http://www.alb.periodikos.com.br/article/6279b761782aad044755f4ad/pdf/alb-8-1-195.pdf>. Acesso em: 21 ago. 2024.

LUCENA, C. A. S. D. **Revisão taxonômica das espécies do gênero *Roeboides* grupo-affinis (Ostariophysi, Characiformes, Characidae)**. Iheringia. Série Zoologia, [S. l.], v. 97, n. 2, p. 117–136, 30 jun. 2007.

LUNDBERG, J. G. *et al.* **The stage for Neotropical fish diversification: A history of tropical South American rivers**. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS. Editors. Phylogeny and classification of neotropical fishes. Porto Alegre (Brazil): EDIPUCRS, [S. l.], p. 13–48, 1 jan. 1998.

MARANHÃO. **PLANO DE AÇÃO PARA PREVENÇÃO E CONTROLE DO DESMATAMENTO E DAS QUEIMADAS NO ESTADO DO MARANHÃO**. [S. l.], 2011.

MARQUES, D. F. *et al.* **Cytogenetic and DNA barcoding reveals high divergence within the trahira, *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) from the lower Amazon River**. Neotropical Ichthyology, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 459–466, jun. 2013.

MARTINS, J. M. E. **BIOLOGIA DE HOPLIAS MALABARICUS (BLOCH, 1794) (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) NA REPRESA DE CAPIM BRANCO I, RIO ARAGUARI, MG**. [S. l.], 2009.

MATTOX, G. M. T.; BIFI, A. G.; OYAKAWA, O. T. **Taxonomic study of *Hoplias microlepis* (Günther, 1864), a trans-Andean species of trahiras (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae)**. Neotropical Ichthyology, [S. l.], v. 12, p. 343–352, jun. 2014.

MATTOX, G. M. T.; TOLEDO-PIZA, M.; OYAKAWA, O. T. **Taxonomic Study of *Hoplias Aimara* (Valenciennes, 1846) and *Hoplias macrophthalmus* (Pellegrin, 1907) (Ostariophysi, Characiformes, Erythrinidae)**. Copeia, [S. l.], v. 2006, n. 3, p. 516–528, set. 2006.

MCCALLUM, K. P. *et al.* **Combining population genetics, species distribution modelling and field assessments to understand a species vulnerability to climate change**. Austral Ecology, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 17–28, 2014.

MELO, B. F. *et al.* **Cryptic species in the Neotropical fish genus *Curimatopsis* (Teleostei, Characiformes)**. Zoologica Scripta, [S. l.], v. 45, n. 6, p. 650–658, 2016.

MELO, B. F. *et al.* **Paleogene emergence and evolutionary history of the Amazonian fossorial fish genus *Tarumania* (Teleostei: Tarumaniidae)**. Frontiers in Ecology and Evolution, [S. l.], v. 10, 16 ago. 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/ecology-and-evolution/articles/10.3389/fevo.2022.924860/full>. Acesso em: 13 set. 2024.

MERCHANT, H. N. *et al.* **Patterns of Genetic Diversity and Gene Flow Associated With an Aridity Gradient in Populations of Common Mole-rats, *Cryptomys hottentotus hottentotus***. Genome Biology and Evolution, [S. l.], v. 16, n. 7, p. evae144, 1 jul. 2024.

MMA. **Caderno Da Região Hidrográfica Atlântico Nordeste Ocidental**. [S. l.]: Ministério Do Meio Ambiente, 2006.

MULVANEY, J.; MOIR, M.; CHERRY, M. I. **DNA barcoding reveals cryptic diversification and taxonomic discordance among bats and birds within Sub-Saharan Africa**. Biodiversity and Conservation, [S. l.], v. 32, n. 14, p. 4895–4914, 1 dez. 2023.

- NETA, Z. M. *et al.* **Elaboration and quality control of the piracui from trahira (*Hoplias malabaricus*) during storage.** International Journal of Gastronomy and Food Science, [*S. l.*], v. 23, p. 100287, 1 abr. 2021.
- ODAH, M. A. A. **Unlocking the genetic code: Exploring the potential of DNA barcoding for biodiversity assessment.** AIMS Molecular Science, [*S. l.*], v. 10, n. 4, p. 263–294, 2023.
- OTTONI, F. ***Cichlasoma zarskei*, a new cichlid fish from northern Brazil (Teleostei: Labroidei: Cichlidae).** Vertebrate Zoology, [*S. l.*], v. 61, n. 3, p. 335–342, 13 dez. 2011.
- OYAKAWA, O. T. **Family Erythrinidae.** Pp. 238-240. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr., (Eds.). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, EDIPUCRS. Copeia, [*S. l.*], n. 3, p. 714–716, 2003.
- OYAKAWA, Osvaldo T.; MATTOX, G. M. T. **Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species.** Neotropical Ichthyology, [*S. l.*], v. 7, p. 117–140, jun. 2009.
- OYAKAWA, Osvaldo Takeshi. **Revisão sistemática das espécies do gênero *Hoplias* (grupo *lacerdae*) da Amazônia brasileira e região leste do Brasil (Teleostei: Erythrinidae).** [*S. l.*], 1990. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/000732571>. Acesso em: 19 ago. 2024.
- PEREIRA DOS SANTOS, M. *et al.* **The complete mitochondrial genome of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) and phylogenetic relationships within the Yponomeutoidea superfamily.** Scientific Reports, [*S. l.*], v. 14, n. 1, p. 7119, 26 mar. 2024.
- PESSOA, E. K. R. *et al.* **Morfologia comparativa do trato digestório dos peixes *Hoplias malabaricus* e *Hypostomus puarum* do açude Marechal Dutra, Rio Grande do Norte, Brasil.** Biota Amazônia, [*S. l.*], 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/24689>.
- PETRY, A. C. **A traíra *Hoplias aff. malabaricus* (Bloch, 1794) na planície de inundação do alto rio Paraná:** [*S. l.*], 2005.
- PETRY, A. C.; AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. **Fish assemblages of tropical floodplain lagoons: exploring the role of connectivity in a dry year.** Neotropical Ichthyology, [*S. l.*], v. 1, p. 111–119, dez. 2003.
- PIORSKI, N. M. **Diversidade genética e filogeográfica das espécies *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) e *Prochilodus lacustris* Steindachner, 1907 no Nordeste do Brasil.** 2010. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/5384/3078.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 16 ago. 2024.
- PIORSKI, N. M. *et al.* ***Platydoras brachylecis*, a new species of thorny catfish (Siluriformes: Doradidae) from northeastern Brazil.** Neotropical Ichthyology, [*S. l.*], v. 6, n. 3, p. 481–494, 2008.
- PIRES, W. M. M.; BARROS, M. C.; FRAGA, E. C. **DNA Barcoding unveils cryptic lineages of *Hoplias malabaricus* from Northeastern Brazil.** Brazilian Journal of Biology, [*S. l.*], v. 81, p. 917–927, 23 out. 2020.

POMPEU, P. dos S.; GODINHO, A. L. **Mudança na dieta da traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch) (Erythrinidae, Characiformes) em lagoas da bacia do rio Doce devido à introdução de peixes piscívoros.** 2001. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbzool/a/LnHJQDJL5FwpQ3qSPFRpmwm/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 21 ago. 2024.

RAMBAUT, A. **FigTree v.1.4.4.** 2018. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Acesso em: 9 ago. 2024.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. **A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System.** PLOS ONE, [S. l.], v. 8, n. 7, p. e66213, 8 jul. 2013.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. **BOLD: The Barcode of Life Data System** (<http://www.barcodinglife.org>). Molecular Ecology Notes, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 355–364, 2007.

REES, H. C. *et al.* **REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology.** Journal of Applied Ecology, [S. l.], v. 51, n. 5, p. 1450–1459, 2014.

REIS, R. E. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America.** [S. l.]: EDIPUCRS, 2003.

RÖPKE, C. P. *et al.* **Simultaneous abrupt shifts in hydrology and fish assemblage structure in a floodplain lake in the central Amazon.** Scientific Reports, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 40170, 10 jan. 2017.

ROSA, R. *et al.* **Cytotaxonomy in distinct populations of *Hoplias aff. malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) from lower Paranapanema River basin.** Journal of Fish Biology, [S. l.], v. 75, n. 10, p. 2682–2694, 2009.

ROSSO, J. *et al.* **A new species of the *Hoplias malabaricus* species complex (Characiformes: Erythrinidae) from the La Plata River basin.** Cybium: international journal of ichthyology, [S. l.], v. 40, 22 set. 2016.

ROSSO, J. *et al.* **Integrative taxonomy reveals a new species of the *Hoplias malabaricus* species complex (Teleostei: Erythrinidae).** Accepted: 2019-10-18T15:53:16Z, 2 ago. 2018. Disponível em: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/86367>. Acesso em: 26 jul. 2024.

ROSSO, J. J. *et al.* **DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina.** Molecular Ecology Resources, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 999–1011, 2012.

ROZAS, J. *et al.* **DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets.** Molecular Biology and Evolution, [S. l.], v. 34, n. 12, p. 3299–3302, 1 dez. 2017.

SACHDEVA, H. **Reproductive isolation via polygenic local adaptation in sub-divided populations: Effect of linkage disequilibria and drift.** PLOS Genetics, [S. l.], v. 18, n. 9, p. e1010297, 1 set. 2022.

SANTOS, A. *et al.* **Composição química e rendimento do filé da traíra (*Hoplias malabaricus*).** Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia, [S. l.], v. 8, 1 jan. 2001.

SANTOS, F. A. dos *et al.* Cytogenetic variation of repetitive DNA elements in *Hoplias malabaricus* (Characiformes - Erythrinidae) from white, black and clear water rivers of the Amazon basin. *Genetics and Molecular Biology*, [S. l.], v. 39, p. 40–48, mar. 2016.

SANTOS, F. A. D. CARACTERIZAÇÃO CITOGENÔMICA EM *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) PROVENIENTES DE RIOS DE ÁGUAS BRANCAS, ÁGUAS CLARAS E ÁGUAS PRETAS. [S. l.], 2012.

SANTOS, U. *et al.* Molecular and karyotypic phylogeography in the Neotropical *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae) fish in eastern Brazil. *Journal of Fish Biology*, [S. l.], v. 75, n. 9, p. 2326–2343, 2009.

SARAIVA, A. C. S. DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DO GÊNERO *Loricaria* Linnaeus, 1758 NA REGIÃO HIDROGRÁFICA. [S. l.], 2019.

SHIBATTA, O. *et al.* Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. [S. l.: s. n.], 2002.

SOARES JÚNIOR, A. V. *et al.* Evolução do rifteamento e paleogeografia da margem Atlântica Equatorial do Brasil: Triássico ao Holoceno. [S. l.], 1 dez. 2011. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/72935>. Acesso em: 23 ago. 2024.

SOARES JÚNIOR, A. V.; COSTA, J. B. S.; HASUI, Y. EVOLUÇÃO DA MARGEM ATLÂNTICA EQUATORIAL DO BRASIL: TRÊS FASES DISTENSIVAS. *Geosciences = Geociências*, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 427–437, 2008.

SUZUKI, H. I. *et al.* Estratégias reprodutivas das assembléias de peixes de reservatórios do Estado do Paraná e bacias limítrofes. Accepted: 2018-11-07T18:49:06Z, 7 nov. 2018. Disponível em: <http://repositorio.uem.br:8080/jspui/handle/1/5340>. Acesso em: 16 ago. 2024.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, [S. l.], v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 25 jun. 2021.

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. [S. l.], 1994.

TOFFOLI, D. *et al.* A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). *Genetics and Molecular Biology*, [S. l.], v. 31, p. 324–336, 2008.

UTSUNOMIA, R. *et al.* Genetic differentiation among distinct karyomorphs of the wolf fish *Hoplias malabaricus* species complex (Characiformes, Erythrinidae) and report of unusual hybridization with natural triploidy. *Journal of Fish Biology*, [S. l.], v. 85, n. 5, p. 1682–1692, 2014.

VERGARA, J.; AZPELICUETA, M. de las M.; GARCIA, G. Phylogeography of the Neotropical catfish *Pimelodus albicans* (Siluriformes: Pimelodidae) from río de la Plata basin, South America, and conservation remarks. *Neotropical Ichthyology*, [S. l.], v. 6, p. 75–85, mar. 2008.

VITORINO, C. A. *et al.* **Genetic diversity of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes: Arapaimidae) in the Araguaia-Tocantins basin estimated by ISSR marker.** *Neotropical Ichthyology*, [*S. l.*], v. 13, p. 557–568, set. 2015.

WAGNER, D. N. *et al.* **Fine-scale genetic structure due to adaptive divergence among microhabitats.** *Heredity*, [*S. l.*], v. 118, n. 6, p. 594–604, jun. 2017.

WANG, I. J.; BRADBURD, G. S. **Isolation by environment.** *Molecular Ecology*, [*S. l.*], v. 23, n. 23, p. 5649–5662, 2014.

WANG, T. *et al.* **DNA barcoding reveals cryptic diversity in the underestimated genus *Triplophysa* (Cypriniformes: Cobitidae, Nemacheilinae) from the northeastern Qinghai-Tibet Plateau.** *BMC Evolutionary Biology*, [*S. l.*], v. 20, n. 1, p. 151, 12 nov. 2020.

WARD, R. D.; HANNER, R.; HEBERT, P. D. N. **The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL.** *Journal of Fish Biology*, [*S. l.*], v. 74, n. 2, p. 329–356, 2009.

WARD, Robert D *et al.* **DNA barcoding Australia's fish species.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, [*S. l.*], v. 360, n. 1462, p. 1847–1857, 15 set. 2005.

GLOSSÁRIO

Ácido desoxirribonucleico (DNA) – Molécula que contém a informação genética dos organismos.

Adaptação evolutiva – Processo pelo qual os organismos se tornam mais adequados ao seu ambiente.

Alelo – Diferentes versões de um gene.

Ambiente lêntico – Ecossistema aquático de águas paradas, como lagos.

Ambiente lótico – Ecossistema aquático de águas correntes, como rios.

Amplificação de DNA – Processo de replicação de uma sequência específica de DNA, geralmente realizado por PCR.

Análise de diversidade – Avaliação da variação genética em uma população.

Análise filogenética – Estudo das relações evolutivas entre diferentes espécies.

Análise genética – Avaliação das sequências de DNA para determinar variações ou semelhanças entre indivíduos ou espécies.

Árvore filogenética – Gráfico que mostra as relações evolutivas entre espécies.

Bacia hidrográfica – Área que drena a água da chuva para um rio ou lago.

Bacia sedimentar – Estrutura geológica que acumula sedimentos, frequentemente relacionada a formações hidrográficas.

Barcode Index Number (BIN) – Sistema que agrupa sequências de DNA semelhantes para identificação de espécies.

Biogeografia – Estudo da distribuição de espécies e ecossistemas no espaço e no tempo.

BOLD Systems – Plataforma que armazena dados de DNA para identificação de espécies.

Citocromo c oxidase subunidade I (COI) – Gene mitocondrial utilizado no DNA *barcoding* para identificar espécies.

Cluster – Grupo de sequências de DNA geneticamente semelhantes.

Complexo de espécies – Espécies morfológicamente semelhantes, mas geneticamente diferentes.

Conservação genética – Proteção da variabilidade genética de uma espécie para manter sua capacidade adaptativa.

Divergência genética – Acúmulo de diferenças genéticas entre populações que pode levar à formação de novas espécies.

Diversidade genética – Variedade de genes em uma população ou espécie.

Diversidade haplotípica – Variedade de haplótipos (conjuntos de alelos) em uma população.

DNA *barcoding* – Técnica que usa uma pequena parte do DNA para identificar espécies.

Endemismo – Quando uma espécie é restrita a uma área geográfica específica.

Erythrinidae – Família de peixes que inclui a traíra, *Hoplias malabaricus*.

Espécie chave – Organismo que exerce um papel crucial em um ecossistema.

Espécies crípticas – Espécies morfológicamente semelhantes, mas geneticamente distintas.

Evolução molecular – Mudanças na sequência de DNA que ocorrem ao longo do tempo.

Extração de DNA – Processo laboratorial de obtenção de DNA de células ou tecidos para análises genéticas.

Filogenia – Estudo da história evolutiva e das relações entre espécies ou grupos de espécies.

Fragmento de DNA – Peça isolado de uma sequência de DNA.

Gene – Segmento de DNA que codifica características biológicas.

Genoma – Conjunto completo de material genético de um organismo.

Haplótipo – Conjunto de alelos de diferentes loci em um cromossomo que são herdados juntos.

Hotspots – locais que concentram alta biodiversidade, associada a uma grande ocorrência de endemismos e sujeitas a grande pressão antrópica.

Linhagem evolutiva – Grupo de organismos relacionados que descendem de um ancestral comum.

Morfologia – Estudo da forma e estrutura dos organismos.

Mutação – Alteração na sequência de DNA que pode resultar em variação genética.

Neighbor-Joining (NJ) – Método de construção de árvores filogenéticas com base em distâncias genéticas.

Organismo piscívoro – Organismo que se alimenta predominantemente de peixes.

PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) – Técnica utilizada para amplificar fragmentos específicos de DNA.

Plâncton – Pequenos organismos aquáticos que servem de base alimentar em ecossistemas aquáticos.

Poli(etil)enoglicol (PEG) – Composto químico utilizado na purificação de DNA.

Polimorfismo genético – Presença de duas ou mais variantes de um gene em uma população.

Relações filogenéticas – Relações evolutivas entre organismos.

Rede de haplótipos – Diagrama que representa as relações entre diferentes haplótipos em uma população.

RESL (Refined Single Linkage Analysis) – Algoritmo que agrupa sequências de DNA semelhantes.

Salting-out – Método de extração de DNA que usa alta concentração de sal para separar o DNA de outras substâncias celulares.

Sequenciamento de DNA – Processo que determina a ordem dos nucleotídeos no DNA.

Sítio de restrição – Local específico em uma molécula de DNA reconhecido e cortado por enzimas de restrição.

Sistemática – Estudo da classificação e relações evolutivas dos organismos.

Sub-bacia – Divisão de uma bacia hidrográfica, composta por vários rios menores.

Taxonomia – Ciência que classifica e nomeia os organismos.

Vicariância – Mecanismo evolutivo no qual a distribuição de uma espécie ancestral é fragmentada em duas ou mais áreas, devido ao surgimento de uma barreira natural.

**APÊNDICE A – SEQUÊNCIA DE DNA *BARCODING* DO GENE MITOCONDRIAL
COI DO EXEMPLAR AMTRA307-24 DO COMPLEXO *Hoplias malabaricus*,
BIN:ACR9466, COLETADO NA SUB-BACIA ITAPECURU, PERTENCENTE À
BACIA DO ATLÂNTICO NORDESTE OCIDENTAL.**

CATGCCTTCGTGATAATTTTCTTCATAGTAATGCCTATCATGATCGGGGGGTTTCGG
GAACTGACTTGTTCCCCTCATGATCGGGGCACCTGACATAGCCTTTCCACGAATA
AATAACATAAGTTTCTGACTTCTTCCCCCTCATTACTTCTCCTGTTAGCCTCCTCC
GGCGTAGAGGCGGGAGTCGGGACAGGCTGAACTGTTTACCCCCCTTTGCCGGAA
ACCTCGCACATGCGGGAGCCTCCGTCGACCTGGCAATCTTTTCTCTCCATCTTGCA
GGGTCTCCTCAATTTTAGGAGCTATCAATTTTATCACAACAATTATTAATATAAA
ACCCCCTGCCATTTACAATACCAAACCCCTCTATTTGTTGAGCTATTTTAGTTA
CAGCCGTCCTTCTCTCCTCTCCCTTCCCGTTCTTGCTGCTGGAATTACAATACTTT
TAACAGACCGAAA