

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

Utilização da técnica de DNA *Barcode* para a identificação de espécies de peixes de água doce comercializados nas regiões de Belo Horizonte e Muriaé

Glauber Batista Góis

Belo Horizonte – MG

2016

Glauber Batista Góis

Utilização da técnica de DNA *Barcode* para a identificação de espécies de peixes de água doce comercializados nas regiões de Belo Horizonte e Muriaé

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Zootecnia (Genética e Melhoramento Animal), sob orientação da Profa. Dra. Denise Aparecida Andrade de Oliveira.

Belo Horizonte – MG

2016

Dissertação de mestrado defendido e aprovado em 29/02/2016 pela comissão examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a. Dr^a. Denise Aparecida Andrade de Oliveira (Orientadora)

Prof. Dr. Kleber Campos Miranda Filho

Dr. Eduardo Geraldo Alves Coelho

Prof^a. Dr^a. Daniela Chemim de Melo Hoyos (Coorientadora)

“A amizade, depois da sabedoria, é a mais bela dádiva feita aos homens.”
François La Rochefoucauld

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Maurílio e Marina Góis

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por guiar todos os meus passos nessa caminhada que acaba de ser concluída, por me abençoar sempre, por me enviar em uma bela família e por ter amigos fantásticos.

A professora Dr^a. Denise Aparecida Andrade de Oliveira, minha orientadora, pelo exemplo de profissionalismo, pelos ensinamentos, pela paciência e pela confiança em mim depositada.

Agradeço ao apoio e amizade de todos os amigos e colegas do Laboratório de Genética da Escola de Veterinária.

A toda minha família, meus pais: Maurílio e Marina Góis, pelo amor, credibilidade e financiamento, as minhas irmãs, Amanda e Dâmares, pelo apoio de sempre.

Aos que sempre torceram e colaboraram de maneira direta ou indireta para conclusão deste trabalho: Muito OBRIGADO pela ajuda.

Aos CNPq 573899/2008-8 e FAPEMIG APQ-0084/08 pelo apoio financeiro.

Apesar da redação de uma dissertação ser um produto de responsabilidade e estresse de natureza individual, sem o apoio contínuo e incondicional da família e a contribuição e a dedicação coletiva dos meus amigos, certamente este trabalho não chegaria a bom termo. A todos eles registro minha mais profunda gratidão

Sumário

Resumo	11
Abstract.....	12
1. Introdução.....	13
2. Revisão Bibliográfica	
2.1. Aquarismo.....	14
2.2. Identificação de espécies.....	16
2.3. DNA <i>Barcode</i>	17
3. Objetivo	
3.1. Objetivos específicos.....	22
3.2. Objetivos gerais.....	22
4. Artigo Científico.....	23
5. Considerações Finais.....	52
6. Referências Bibliográficas.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distâncias genéticas (K2P) dentro de diferentes níveis taxonômicos para os 298 espécimes de peixes analisados.....	30
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Nucleotídeos diagnósticos nas sequências do COI das espécies *Hypostomus plecostomus* e *Pterygoplichthys disjunctivus*.....30
- Figura 2: Árvore condensada de *Neighbor-Joining* das distâncias (K2P) entre as sequências de COI de 298 espécimes de peixes ornamentais.....31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcentagem

°C- Graus Celsius

μl- Micro Litro

μM- micromolar

A- Adenina

BIN- *Barcode Index Number*

BLGEV- Banco de dados do Laboratório de Genética da Escola de Veterinária

BOLD- *Barcode Of Life Database*

C- Citosina

COI- Subunidade 1 da Citocromo Oxidase

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTP- Desoxirribonucleotídeos Tri-Fosfatados

EDTA- Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

FAO- Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FISHBOL- *Fish Barcode of Life Initiative*

G- Guanina

IBAMA- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ID- *Identity Document*

K2P- *Kimura-2-parameter*

Kb- Quilobyte

MEGA- *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

MgCl₂- Cloreto de Magnésio

MPA- Ministério da Pesca e Aquicultura

Ng- nanograma

NJ- *Neighbor-Joining*

NUMTs- *Nuclear Mitochondrial DNA*

Pb- Pares de Base

QV- *Qualified Value*

rDNA - DNA ribossomal

Rpm- Rotações por minutos

T- Timina

US\$- *United States dollar*

RESUMO

Impactos antropogênicos são uma ameaça crescente para a diversidade de peixes, especialmente em áreas em torno de grandes centros urbanos, e muitas ações efetivas de conservação dependem de identificação precisa das espécies. Considerando a utilidade do DNA *Barcode* como um sistema global de identificação e descoberta de espécies, este estudo tem como objetivo caracterizar molecularmente algumas espécies de peixes ornamentais e depositar sequências parciais do gene COI em uma biblioteca de referência. Seguindo essa metodologia, um fragmento da sub-unidade I da citocromo oxidase foi amplificado e sequenciado bidirecionalmente e a partir de 298 indivíduos. Uma análise de *Neighbor-Joining* revelou que esta abordagem pode discriminar inequivocamente todas as espécies pesquisadas. A maioria das espécies exibiu baixas distâncias genéticas intraespecíficas (1,53%), cerca de 9 vezes menor do que a distância entre as espécies dentro de um gênero. A biblioteca elaborada nesse estudo é um primeiro passo para conhecer melhor a diversidade molecular de peixes ornamentais, fornecendo uma base para futuros estudos sobre essa fauna - estendendo a capacidade de identificá-los em todas as fases da vida e até mesmo em restos ou fragmentos, fornecendo dados para uma melhor compreensão das interações entre as espécies, gerando estimativas sobre a composição de espécies e riqueza em um ecossistema, provendo ferramentas de autenticação de bioprodutos e monitoramento exploração ilegal de espécies

Palavras-Chave: Biodiversidade, Citocromo Oxidase Subunidade 1, DNA mitocondrial

ABSTRACT

Anthropogenic impacts are a rising threat to the diversity of fish, especially in areas around urban centers, and many effective conservation actions depend on accurate identification of species. Considering the usefulness of DNA Barcode as a global system of identification and discovery of species, this study aims to molecularly characterize the species of ornamental fish and provide partial COI gene sequences in a reference library. Following this methodology, a fragment of the subunit I of cytochrome oxidase gene was amplified and sequenced bidirectionally from 298. A Neighbor-Joining analysis showed that this approach can clearly discriminate all the surveyed species. Most of the species showed low intraspecific genetic distances (1.53%), about 9-fold less than the distance between species within a genus. The library developed in this study is a first step to better understand the molecular diversity of ornamental fish, providing a basis for future studies on this fauna - extending the ability to identify them in all life stages and even remnants or fragments, providing data for a better understanding of the interactions between species, generating estimates of the species composition and richness in an ecosystem, providing bioproducts authentication tools and monitoring illegal exploitation of species.

Keywords: Biodiversity, Cytochrome Oxidase Subunit I, Mitochondrial DNA.

1. INTRODUÇÃO

Conhecer a diversidade biológica é o ponto de partida para todos os estudos básicos ou aplicados, relacionados às ciências da vida. O conhecimento de espécies, inclusive de peixes com potencial ornamental, bem como também a capacidade de nomeá-las, é fundamental para o estudo da ecologia, comportamento, evolução e todas as outras disciplinas relacionadas aos organismos (Savage, 1995).

A ictiofauna de água doce é a mais rica de todo o planeta. De acordo com Reis *et al.* (2003), das 13.000 espécies de peixes de água doce estimadas para o planeta, se conhecem apenas 6.025 espécies, das quais 4.475 são consideradas válidas e cerca de 1.550 são conhecidas, porém ainda não descritas formalmente. Esse número foi discutido e aceito por Malabarba *et al.* (2011), que acrescentam que toda essa diversidade de peixes de água doce neotropicais ocorre em menos de 0,003% da água doce do planeta.

Os estudos sistemáticos dos peixes, têm-se expandido consideravelmente nos últimos anos, principalmente após a incorporação de novas técnicas de obtenção e interpretação de dados, entre as quais está o uso da metodologia de análise filogenética proposta inicialmente por Hennig (1966) e diversas metodologias moleculares, como por exemplo a técnica do DNA *Barcode*.

Em função da taxa atual de redução da diversidade em todo o planeta, observa-se a necessidade de obter mais informações acerca da biodiversidade. As metodologias moleculares surgiram como ferramenta para obtenção de conhecimento sobre biodiversidade e não pretendem substituir a taxonomia morfológica tradicional. Métodos moleculares surgem como uma nova coluna para sustentar a abordagem da taxonomia integrativa (Padial *et al.*, 2010). Mesmo com notáveis progressos, muito ainda resta a ser conhecido sobre a composição e o relacionamento dos diversos grupos, devido à imensa magnitude da biodiversidade de peixes. Nesse contexto, o presente estudo intenta compilar uma biblioteca referência de sequências *Barcode* para os peixes ornamentais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aquarismo

O aquarismo é uma atividade de lazer e entretenimento. Na China, há mais de três mil anos, já se cultivava peixes em viveiros para fins ornamentais (Nottingham e Barros, 2006). No início do século X, foi escrito o primeiro livro de aquarismo “O livro do peixe vermelho” (Chang Chi’ente, 1956 citado por Ribeiro et al., 2008) e a atividade de contemplação de aquários começou a se desenvolver. Em 1853, ocorreu a inauguração do primeiro aquário público na Inglaterra, o que aumentou o interesse em aquarismo no ocidente (Alderton, 2008). Atualmente, essa atividade é de grande rentabilidade devido aos avanços tecnológicos e à facilidade de comercialização de peixes e acessórios ligados à área.

O comércio de peixes ornamentais tem crescido significativamente atualmente. Os últimos dados disponibilizados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2012), mostram que as exportações mundiais de peixes ornamentais em 2011 foram avaliadas em mais de 362 milhões de dólares e as importações globais em mais de 350 milhões. Mais de um bilhão de peixes ornamentais, que compreendem mais de 4.000 espécies de água doce e 1.400 marinhos, são comercializados internacionalmente a cada ano (Whittington e Chong, 2007). Conforme os dados mais recentes sobre peixes ornamentais no Brasil, entre 2006 e 2007, o volume de exportação aumentou aproximadamente de US\$ 5 milhões para US\$ 6 milhões (IBAMA, 2008).

Os maiores importadores de peixes ornamentais são os Estados Unidos, Japão, Alemanha, Inglaterra e França. Por outro lado, os maiores fornecedores de peixes ornamentais são países asiáticos, tais como Cingapura, Filipinas, Tailândia, Sri Lanka, Indonésia e Hong Kong. A América do Sul também tem uma participação considerável nessas exportações, principalmente Colômbia, Peru e Brasil (Dykman, 2012). Nacionalmente, as principais cidades fornecedoras são Muriaé/MG, Mogi das Cruzes/SP, Magé/RJ, Recife/PE, Cascavel/PR e Manaus/AM (Oliveira, 2012).

A atual população de peixes ornamentais no Brasil é estimada em 25,5 milhões de exemplares (MPA, 2015). Os peixes ornamentais só perdem em quantidade – entre os animais de estimação - para a população canina, de 37,1 milhões. Muitas espécies

destinadas à alimentação podem ser comercializadas também como ornamentais, cujo os preços obtidos são mais elevados. Na região Norte, por exemplo, um peixe Aruanã Preto é vendido a dois reais o quilo em feiras, quando um único exemplar, comercializado como peixe ornamental, alcança R\$ 800,00 no mercado internacional. O mesmo ocorre com o Jaraqui, da Amazônia, que vale trinta centavos de reais o quilo e R\$20,00 a unidade como ornamental (MPA, 2015).

Em volume as principais espécies comercializadas no Brasil são: Molinésia (*Poecilia latipina*), Japonês (*Carassius auratus*), Acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*) e Plati (*Xiphophorus maculatus*), que corresponderam a mais de 50% do total. Estas espécies, juntamente com Espada (*Xiphophorus helleri*), Guppy (*Poecilia reticulata*), Neon (*Paracheirodon axelrodi*) e Tetras (*Characidae* sp.), são considerados os peixes mais vendidos. Os peixes de maior valor comercial apontados pelos aquaristas foram: Cirurgião Amarelo (*Zebrasoma flavescens*), Gobi (*Nemateleotris magnifica*), Donzela (*Chrysiptera parasema*) e Peixe Palhaço (*Amphirion* spp.) (Freitas, 2009). Um exemplo de peixe ornamental brasileiro desejado no mercado internacional é o Aruanã (*Osteoglossum* sp.), que é capturado em média com 5 cm de comprimento. A pesca desses animais é realizada por meio da captura e óbito do macho, que guarda os alevinos em sua boca, até serem capazes de sobreviver sem o devido cuidado parental (IBAMA, 2008).

A criação de peixes ornamentais é um dos segmentos mais promissores para a geração de trabalho e de renda (FAO, 2012) e é notável o potencial do país em aumentar a produção no mercado do aquarismo. A Amazônia, com a sua grande biodiversidade, possui espécies variadas e de interesse para aquaristas como, por exemplo, o Aruanã Preto (*Osteoglossum ferreirai*) e o Jaraqui (*Semaprochilodus insignis*) (MPA, 2015).

Os peixes sempre foram o principal grupo trabalhado dentro do aquarismo, mas existem outras espécies envolvidas com frequência em aquários de água doce como crustáceos, moluscos e anfíbios. Existe também uma variedade ainda maior para aquários marinhos, como poliquetas, cnidários e equinodermos, além de crustáceos e moluscos marinhos. Na grande maioria destes grupos, principalmente nos marinhos, os animais são oriundos do extrativismo (Oliveira, 2012).

Padrone (2004), afirma que o tráfico de animais, incluindo o de peixes ornamentais, é a terceira atividade ilícita mais lucrativa no mundo, perdendo apenas para tráfico de drogas e armas. Neste caso, os animais são tratados de maneira cruel e

desrespeitosa gerando, em muitos casos, a morte dos animais. Apesar de existir no Brasil uma lei que criminaliza o comércio ilegal da fauna silvestre (Lei nº 5.197/67 - IBAMA), esta prática ainda é muito comum. Isso se deve principalmente pela falta de conhecimento da população sobre o risco de criação de animais silvestres como domésticos, como a propagação de eventuais doenças entre os animais ou a transmissão de doenças aos humanos.

2.2. Identificação de espécies

A diversidade de espécies de seres vivos no mundo sempre motivou o intelecto humano e embora não saibamos o número exato de seres vivos no planeta. Melhores estimativas variam de 2 a 10 milhões de espécies (May, 2011), uma informação muito ampla que não transmite a realidade do nosso planeta. A fim de compreender e estudar os seres vivos, pesquisadores classificam em diversos níveis taxonômicos, com base nas semelhanças e diferenças morfológicas.

Paradoxalmente à necessidade de um taxonomista, há um declínio do número destes profissionais em uma escala mundial (Hopkins e Freckleton, 2012), o que dificulta o desenvolvimento de todas as outras áreas de estudo em biodiversidade. Este processo foi denominado de "impedimento taxonômico", ou seja, a impossibilidade de cumprir a tarefa de descrever a biodiversidade devido ao baixo número de sistematas (Carvalho *et al.*, 2005).

Para a descrição de uma espécie, um binômio é fornecido a um espécime-tipo encontrado, esse espécime recebe um nome específico e de forma contínua outros indivíduos pertencem a essa espécie quando compartilham uma série de características essenciais com esse espécime-tipo e não com outras (Puillandre *et al.*, 2011). Apesar do conceito de espécie não ter um consenso entre a comunidade acadêmica, a atividade de associar nomes científicos a grupos de indivíduos é crucial para os mais diversos campos da biologia por ser a unidade fundamental da biologia dos organismos e crucial para definir ações na conservação da biodiversidade (Balakrishnan, 2005).

O ser humano se relaciona com o ambiente principalmente pela visão e adquire informações pelas características morfológicas de cada espécie. Com estes dados, é possível realizar a classificação da diversidade. No entanto, a utilização apenas de caracteres morfológicos pode gerar informações imprecisas, isso porque a metodologia possui limitações próprias - a plasticidade fenotípica e a variabilidade genética podem

disfarçar os caracteres empregados, espécies crípticas- aquelas que são muito semelhantes morfológicamente e diferentes molecularmente - podem não ser detectadas corretamente, as chaves de identificação não contemplam todos os estágios de vida e demandam da experiência de profissionais especializados cada vez mais escassos no mercado (Hebert *et al.*, 2003a).

Embora a classificação taxonômica tradicional seja a ferramenta mais utilizada e continuará a ser em muitos casos, existe uma necessidade de novas abordagens tecnológicas para facilitar o trabalho de identificação e caracterização. Tanto para a classificação e também no aparecimento de novas espécies, incorporando diferentes propriedades - morfológicas, moleculares, ecológicas, evolutivas, comportamental, etc. De modo a fornecer um grande número de subsídios para delimitação da entidade “espécie” (Padial *et al.*, 2010).

2.3. DNA Barcode

A análise de eletroforese de proteínas foi utilizada durante anos para identificação de espécies e, a partir da década de 60, diversas ferramentas moleculares foram incorporadas aos estudos da biodiversidade (Manwell e Baker, 1963). Os métodos baseados em análise de DNA ganharam grande notoriedade entre a comunidade científica, devido ao fato do DNA ser uma molécula relativamente estável, poder ser obtida em qualquer estágio de vida a partir de pequenas amostras de material e ser altamente reprodutível (Ward *et al.*, 2005).

A perda da diversidade em todo planeta gera uma necessidade de obtenção de dados informativos sobre a biodiversidade ainda existente (Savage, 1995). A taxonomia tradicional, baseada em características morfológicas, não será substituída pelos métodos moleculares, os quais aumentam a credibilidade dos dados gerados. Surge assim uma nova abordagem para identificação e caracterização de espécies a “taxonomia integrativa” (Padial *et al.*, 2010).

Diversos genes e regiões do DNA já foram usados como marcadores moleculares para a identificação de diferentes espécies de seres vivos, com base em suas diferenças genéticas. Por exemplo, a região 16S-rDNA e o gene Citocromo b do genoma mitocondrial, e as regiões ITS1-rDNA, ITS2-rDNA e 18S-rDNA do núcleo celular (Hajibabaei *et al.*, 2007). Ward (2009) afirma que para o desenvolvimento de um

sistema unificado de identificação molecular, um marcador padrão deve ser estabelecido para que os dados obtidos sejam comparáveis intra e inter espécies.

Com esta ideia, Hebert *et al.* (2003b) desenvolveram a metodologia de DNA *Barcode*, que constitui uma das técnicas mais adequadas para a identificação rotineira de espécies, baseado no sequenciamento de parte do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI). Por ter origem mitocondrial, é facilmente amplificado em qualquer indivíduo. Além disso, possui ausência de íntrons, herança haplóide, exposição limitada para recombinação genética e evolução rápida, o que permite uma alta semelhança intraespecífica e alta divergência interespecífica, caracterizando-o assim como um bom gene de identificação (May, 2010).

O DNA *Barcode* configura uma sequência de aproximadamente 650 pares de bases, entre as posições 58 e 705 da extremidade 5' do gene COI, funcionando como um sistema universal para catalogar e identificar espécies animais. Para isso, as quatro possibilidades de nucleotídeos - adenina, citosina, guanina e timina – combinam-se de forma aleatória gerando um padrão de identidade único para cada espécie. Ilustrativamente, uma combinação aleatória de 15 desses nucleotídeos criaria um bilhão de códigos únicos, um número muito maior do que o de espécies de seres vivos conhecidos. Isso permite que cada táxon seja identificado por apresentar uma sequência única de DNA e, conseqüentemente, uma série exclusiva de DNA *Barcode*. (Hebert *et al.*, 2003b)

As espécies são representadas por uma sequência particular ou por um grupo de sequências muito semelhantes, o que é conhecido como o DNA *Barcode* daquela espécie, e o acúmulo de mutações entre as sequências de DNA de duas espécies fornece a distância genética entre elas. Uma vez que as sequências de COI tendem a variar entre espécies, mas é relativamente constante entre indivíduos de mesma espécie, um espécime desconhecido - como ovos, larvas juvenis ou restos fragmentados – pode ser identificado comparando sua sequência com sequências disponíveis em uma biblioteca de referência derivada de material identificado por especialistas (Hebert *et al.*, 2003a; Hebert *et al.* 2003b).

Cada espécime caracterizado geneticamente passa por identificação taxonômica e tem que cumprir alguns critérios de qualidade para serem depositados no banco de dados do BOLD (*Barcode of Life Database*). Que auxilia a aquisição, armazenamento, análise e publicação de registros do DNA barcode de cada espécie. Promove a reunião

de dados moleculares, morfológicos e de distribuição, constrói uma ponte sobre um abismo bioinformática tradicionais. Disponível gratuitamente para qualquer pesquisador em DNA barcoding Com interesses. Esse banco já possui quase 5 milhões de sequências depositadas e disponíveis para visualização (BOLD, 2016).

Com a criação desta metodologia de identificação, a eficácia do fragmento do DNA *Barcode* foi posta em teste em diversos grupos, como invertebrados (Barrett e Hebert, 2005), aves (Ward, 2009) e peixes (Ward *et al.*, 2005; Steinke *et al.*, 2009; Collins *et al.*, 2012), com resultados positivos em todos os trabalhos.

Até o momento a região escolhida mostrou grande capacidade em discriminar espécies e em revelar diversidade críptica (Becker *et al.*, 2011). Apesar de o COI ser eficaz na identificação da maioria das espécies de animais, este gene não foi totalmente eficaz para trabalhos com plantas e fungos. Para plantas o COI frequentemente apresenta íntrons derivados de transferências genéticas horizontais e, assim como genoma mitocondrial de plantas como um todo, apresenta baixas taxas de substituição (Begerow, *et al.*, 2010). Pesquisadores tentam o uso de outros loci, entre eles, os de genoma de plastídeos para identificação molecular de plantas, embora não tenham chegado a um consenso, os pesquisadores indicam o uso dos marcadores *rbcl* e *matK*. Para fungos, a região ITS (*internal transcribed spacer*) tem sido amplamente utilizada e parece ter melhor eficácia que outros marcadores propostos (Begerow *et al.*, 2010).

Huang *et al.* (2012) relatam que a alta taxa de evolução do COI - uma característica da maioria dos metazoários - seja mais baixa em animais basais (Anthozoa e Porifera) do que em animais mais complexos. Assim a alta taxa evolutiva do genoma mitocondrial seria uma característica sinapomórfica para os animais e não seria compartilhada com plantas e fungos.

Para aumentar e manter a credibilidade do sistema global de identificação dos seres vivos, uma metodologia única deve ser utilizada a fim de minimizar as variáveis técnicas dos métodos de análise, as quais podem sofrer variação ao estudar diferentes grupos, mas devem ser as mais constantes possíveis. Enquanto que para algumas espécies o desenho de *primers* específicos para um determinado grupo é a melhor solução, a proposta do DNA *Barcode* indica que os *primers* que amplificam o fragmento do gene COI para a maioria das espécies de um grupo são preferidos aos específicos. Também por questão de padronização, as análises de dados de *Barcode* usam o algoritmo de *Neighbor-Joining* (NJ) para representação das distâncias genéticas

entre os grupos estudados e o *Kimura-2-parameter* (K2P) como modelo de substituição de nucleotídeos (Steinke e Hanner, 2011).

Em 2009, Ward realizou uma grande pesquisa, analisando sequências do COI de mais de mil espécies de peixes e mais de 600 espécies de aves. Concluiu que pares de sequências com divergências baixas entre si, são de indivíduos coespecíficos. A uma taxa de 2% de divergência entre duas sequências, suas chances de pertencerem à mesma espécie caem a 1%, enquanto elas passam a ter 99% de chance de serem congênicas.

Para espécies crípticas, Hebert *et al.* (2004) propuseram que um limite 10 vezes superior à divergência média intraespecífica é um indicativo de descoberta de novas espécies *-barcode gap-*. Entretanto trabalhos posteriores questionaram a veracidade ou a existência da universalidade deste conceito, sugerem que possam ser artefatos ou *gaps* de amostragem do grupo (Meyer e Paulay, 2005; Meier *et al.*, 2006; Wiemers e Fiedler, 2007).

A criação de uma biblioteca de referência contendo toda essa informação gerada pelos grupos de pesquisa do DNA *Barcode* é coordenada por um consórcio internacional, o *Consortium for the Barcode of Life* (www.barcodeoflife.org/). Este consórcio foi dividido em grupos específicos para cada campanha, como por exemplo o *Mammalia Barcode of Life* (www.mammaliabol.org/) e o *Fish Barcode of Life* (www.fishbol.org/) e em outros diversos grupos. A proposta destes grupos é reunir todas as sequências de mamíferos e peixes respectivamente em uma biblioteca de sequências *Barcode*.

O objetivo do DNA *Barcode* em termos práticos é construir um banco de dados com maior número de espécies sendo o mais representativo possível. As sequências depositadas também devem conter informações sobre o espécime sequenciado, como classificação, local de coleta, responsável pela identificação, depósito em museu, uma fotografia e os eletroferogramas que deram origem a sequência das espécies. O DNA *Barcode* constitui-se assim um banco de dados com evidências da espécie, diferente de outros bancos de dados genéticos onde a sequência depositada é relacionada a uma espécie, e impossibilita que outros grupos de pesquisa reexaminem aquela informação e faça correções cabíveis caso sejam necessárias (Steinke e Hanner, 2011).

Desde a introdução do DNA *Barcode* no meio científico, diversos autores têm enfatizam a importância de contextualizar os dados gerados dentro de um espaço científico mais amplo, somando o conteúdo obtido do DNA *Barcode* e a taxonomia

tradicional (Wheeler, 2005). Alguns autores utilizam a prática da “taxonomia integrativa”, sugerindo que os dados de DNA *Barcode* são usados com mais sucesso para complementar outras fontes de informação taxonômica (Carvalho *et al.*, 2011 e Whitworth *et al.*, 2012).

Muitos estudos demonstraram a capacidade da ferramenta do DNA *Barcode* para identificação de peixes de água doce (Hubert, *et al.*, 2008, April *et al.*, 2011) e peixes marinhos (*Actinopterygii* e *Chondrichthyes*) a partir de diferentes regiões geográficas (Zhang e Hanner, 2012; McCusker, *et al.*, 2013). Além disso, o DNA *Barcode* foi usado para identificar tecidos de diferentes origens tais como larvas de peixes (Hubert *et al.* 2008), barbatanas (Holmes, 2009) e de pescados industrializados (Wong *et al.* 2011). Steinke *et al.* (2009) mostraram a eficiência do DNA barcode para identificação de peixes ornamentais.

Trabalhos de identificação de peixes constataram uma delimitação em mais de 98% das espécies analisadas, demonstrando uma baixa variação intraespecífica e alta semelhança interespecífica (Ward, 2005; Zang e Hanner, 2012). Para algumas espécies de peixes, níveis elevados de variação intraespecífica podem ser evidências para existência de uma diversidade críptica (Puckridge *et al.*, 2013). Apesar de não ser um problema significativo para peixes (Ward *et al.* 2009), pode ocorrer uma superestimação do número de espécies devido à amplificação de cópias nucleares de genes mitocondriais (NUMTs) (Song *et al.*, 2013).

Quanto maior o número de sequências depositadas no banco de dados, maior será a credibilidade do programa e maior a utilização desta metodologia para identificar e autenticar espécies livres ou comercializadas, para a detecção de fraudes intencionais ou não, para a identificação de bioprodutos e auxílio no monitoramento da exploração ilegal de espécies em risco de extinção (Barbuto *et al.*, 2010). Além disso, o DNA *Barcode* fornece subsídios para estudos posteriores envolvendo a fauna, aumenta a capacidade de identificar espécies a partir de formas larvais, restos de fragmentos de indivíduos encontrados em conteúdos estomacais ou outras partes do corpo deixados no ambiente, permite compreender sobre como as espécies interagem e fornece melhores estimativas da composição e diversidade de espécies em um ecossistema (Valentini *et al.*, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O presente estudo teve como objetivo principal identificar de maneira molecular, diferentes espécies de peixes ornamentais, utilizando a técnica de DNA Barcode.

3.2. Objetivos específicos

Considerando os resultados positivos da utilização do DNA *Barcode* em identificar e caracterizar diferentes espécies de animais e a necessidade de informações moleculares sobre a diversidade de peixes ornamentais, este trabalho teve como objetivos específicos:

- Sequenciar o fragmento do gene mitocondrial COI de espécies de peixes ornamentais comercializados na região de Belo Horizonte e Muriaé ambas no estado de Minas Gerais.
- Avaliar a utilização destas sequências na discriminação das diferentes espécies amostradas.
- Revelar possíveis casos de espécies crípticas, procurando expandir o conhecimento sobre a ictiofauna ornamental.
- Disponibilizar as sequências obtidas no BOLD, com base no sistema de identificação do gene COI das espécies analisadas.

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE DNA *BARCODE* PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE PEIXES DE ÁGUA DOCE COMERCIALIZADOS NAS REGIÕES DE BELO HORIZONTE E MURIAÉ

Glauber Batista Góis

Bacharel em Aquacultura e Mestrando em Zootecnia, Escola de Veterinária da UFMG

Resumo

Impactos antropogênicos são uma ameaça crescente para a diversidade de peixes, especialmente em áreas em torno de grandes centros urbanos, e muitas ações efetivas de conservação dependem de identificação precisa das espécies. Considerando a utilidade do DNA *Barcode* como um sistema global de identificação e descoberta de espécies, este estudo tem como objetivo caracterizar molecularmente algumas espécies de peixes ornamentais e depositar sequências parciais do gene COI em uma biblioteca de referência. Seguindo essa metodologia, um fragmento da sub-unidade I da citocromo oxidase foi amplificado e sequenciado bidirecionalmente e a partir de 298 indivíduos. Uma análise de *Neighbor-Joining* revelou que esta abordagem pode discriminar inequivocamente todas as espécies pesquisadas. A maioria das espécies exibiu baixa distâncias genéticas intraespecíficas (1,53%), cerca de 9 vezes menor do que a distância entre as espécies dentro de um gênero. A biblioteca elaborada nesse estudo é um primeiro passo para conhecer melhor a diversidade molecular de peixes ornamentais, fornecendo uma base para futuros estudos sobre essa fauna - estendendo a capacidade de identificá-los em todas as fases da vida e até mesmo em restos ou fragmentos, fornecendo dados para uma melhor compreensão das interações entre as espécies, gerando estimativas sobre a composição de espécies e riqueza em um ecossistema, provendo ferramentas de autenticação de bioprodutos e monitoramento exploração ilegal de espécies.

Palavras chaves: Biodiversidade, Citocromo Oxidase Subunidade 1, DNA mitocondrial.

Abstract

Anthropogenic impacts are a rising threat to the diversity of fish, especially in areas around urban centers, and many effective conservation actions depend on accurate identification of species. Considering the usefulness of DNA Barcode as a global system of identification and discovery of species, this study aims to molecularly characterize the species of ornamental fish and provide partial COI gene sequences in a reference library. Following this methodology, a fragment of the subunit I of cytochrome oxidase gene was amplified and sequenced bidirectionally from 298. A Neighbor-Joining analysis showed that this approach can clearly discriminate all the surveyed species. Most of the species showed low intraspecific genetic distances (1.53%), about 9-fold less than the distance between species within a genus. The library developed in this study is a first step to better understand the molecular diversity of ornamental fish, providing a basis for future studies on this fauna - extending the ability to identify them in all life stages and even remnants or fragments, providing data for a better understanding of the interactions between species, generating estimates of the species composition and richness in an ecosystem, providing bioproducts authentication tools and monitoring illegal exploitation of species.

Keywords: Biodiversity, Cytochrome Oxidase Subunit I, Mitochondrial DNA.

Introdução

A identificação de espécies é fundamental para estudar a biologia dos organismos, embora o conceito de espécie não tenha atingido um consenso, o trabalho da comunidade científica em associar nomes com grupos de indivíduos é rotineira e crucial para definir prioridades na conservação da biodiversidade (Balakrishnan, 2005). Tradicionalmente, a descrição e identificação de espécies sempre foram realizadas com base nas características morfológicas. No entanto, a análise morfológica possui limitações próprias: plasticidade fenotípica e variabilidade genética podem disfarçar caracteres utilizados na identificação; *taxa* críptico pode não ser facilmente detectado; chaves de identificação, normalmente, não conseguem abranger todos os estágios de vida e sexos e o uso de chaves taxonômicas que tornam o sistema extremamente dependente de pessoal treinado (Hebert *et al.*, 2003b).

Diversas ferramentas moleculares foram utilizadas e avaliadas a fim de aumentar a credibilidade e confiabilidade das análises morfológicas de identificação e descoberta de novas espécies. Os métodos que baseiam-se em marcadores moleculares ganharam popularidade porque moléculas de DNA são relativamente estáveis, podem ser acessadas a partir de todos os estágios de vida, pequenas quantidades de tecido são suficientes para identificação e, além disso, as sequências de DNA são altamente reprodutíveis (Ward *et al.*, 2009). A redução na biodiversidade do planeta, exige aceleração da taxa em que o conhecimento sobre a biodiversidade é obtido (Savage, 1995) e embora não tenha a intenção de substituir a taxonomia morfológica tradicional, os métodos moleculares surgem como uma nova coluna para sustentar uma abordagem de “taxonomia integrativa” (Padial *et al.*, 2010).

Mesmo com ampla utilidade, a grande variabilidade de marcadores moleculares utilizados por diferentes pesquisadores dificulta o desenvolvimento de um sistema de identificação molecular unificador. Neste contexto, Hebert *et al.*, (2003a) propuseram o uso de um marcador padronizado que consiste em aproximadamente 650 pares de bases a partir da extremidade 5' do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) como um marcador universal de identificação adequado para a maioria das espécies de animais. Neste fragmento de gene, espécies possuem uma única sequência ou um conjunto limitado de sequências muito semelhantes e altamente divergentes dos de outras espécies congêneres. Essa metodologia ficou conhecida como "*DNA Barcode*" e

pode ser utilizada tanto para a identificação de espécies conhecidas como na descoberta de novas. As sequências de COI tendem a variar entre as espécies diferentes, mas são relativamente constantes dentro da mesma espécie. Assim, um espécime ou amostra qualquer - incluindo ovos, larvas, juvenis e tecido fragmentado - pode ser identificado pela combinação da sua sequência com uma sequência da biblioteca de referência BOLD (*Barcode of life Database*), que são derivadas de amostras previamente identificadas por especialistas. A eficácia do *DNA Barcode* foi testada em diversos grupos de animais e seu sucesso na delimitação das espécies se deve à adesão aos padrões estipulados pelo programa (Teletchea, 2010).

Quanto maior e mais completa for a biblioteca de referência, aumenta-se o uso destas informações para estudos em ecologia molecular e de investigação forense (Valdez-Moreno *et al.*, 2010). A capacidade de identificar espécies a partir de todas as fases da vida e mesmo a partir de restos ou fragmentos (Holmes *et al.*, 2009) permite uma melhor compreensão das interações entre as espécies e também pode ser utilizada para calibrar estimativas sobre a composição de espécies e riqueza em um ecossistema (Valentini *et al.*, 2012). Uma biblioteca de *DNA Barcode* possibilita a certificação de produtos comerciais e a detecção de fraudes intencionais ou não, envolvendo bioprodutos (Barbuto *et al.*, 2010), além de fornecer uma ferramenta de monitoramento da exploração ilegal de espécies (Baker, 2013).

Uma das áreas de necessária aplicação da técnica de *DNA Barcode* é o aquarismo. Essa é uma atividade de entretenimento e lazer, que movimenta de milhões de dólares (FAO, 2014). Porém, a atividade de aquarismo apresenta algumas consequências problemáticas, que demandam soluções estratégicas para o crescimento sustentável da área. O esgotamento de populações de peixes ou quaisquer organismos aquáticos capturados pode ocorrer quando a coleta é feita de forma desordenada (Pinheiro, 2010). A introdução de espécies de locais diferentes de sua distribuição natural, por descartes dos aquaristas ou por criadouros que não possuem boa estrutura e permitem a fuga dos animais para o meio ambiente, é outro risco (Rixon, 2005). Segundo Lasso-Alcala e Posada (2010), essa introdução de espécies exóticas em ecossistemas naturais é um dos principais motivos da perda da biodiversidade.

Neste contexto, torna-se evidente a importância do estudo da identificação de espécies de peixes ornamentais para o conhecimento da ictiofauna e, a partir disso,

determinar as atitudes oportunas. Considerando o uso promissor de DNA *Barcode* para identificar as espécies, este estudo tem como objetivo disponibilizar sequências do gene COI de peixes ornamentais nas bibliotecas de referência, aumentando a eficácia desta ferramenta para identificação de espécies.

Material e Métodos

Amostras

As amostras analisadas no presente estudo foram obtidas por meio de animais doados por produtores ou lojas de aquarismo (média de 5,68 espécimes por espécie). Os animais foram coletados mortos, nas cidades de Belo Horizonte, grande polo consumidor e atacadista de aquarismo, e Muriaé, principal polo fornecedor neste mercado (Cardoso, 2012).

Um fragmento de tecido muscular, branquial ou da nadadeira foi removido de cada indivíduo e preservado em etanol 95% sob temperatura de -20°C. Todos os espécimes foram identificados, com informações sobre o local e data da coleta e provável espécie, com base em suas características morfológicas. Após a retirada do tecido para análise molecular, os espécimes foram conservados em formol 10% ou congelados a -20°C. Foram, ainda, realizadas imagens digitais dos espécimes e de acordo com as recomendações do protocolo para colaboradores do *Fish Barcode of Life* (FISHBOL) (Steink e Hanner, 2011).

Dados dos espécimes, como local de coleta e classificação, estão registrados no BOLD, sob o projeto Banco de Dados dos Peixes do Laboratório de Genética - UFMG. As sequências analisadas foram depositadas conforme o recomendado para a criação de bibliotecas de DNA *Barcode* (Ward *et al.*, 2009). As amostras serão enviadas para laboratório após passar por análise taxonômica específica.

Extração de DNA

O DNA total de cada espécime foi isolado utilizando um kit comercial de extração de DNA (DNeasy Blood & Tissue kit, Quiagen) ou método de extração “*Salting Out*”, descrito por Aljanabi e Martinez (1997).

Amplificação do COI por PCR

Para amplificação do fragmento de 650 pares de bases do gene Citocromo Oxidase (COI) foram utilizados os *primers* FishF1, FishF2, FishR1 e FishR2 (Ward *et al.*, 2005). Para amplificação gênica por PCR utilizou-se para cada reação: 2,5 µl de dNTP na concentração inicial de 1nM, 5 µl de Tampão 5X (Promega™), 0,24 µl de cada iniciador na concentração inicial de 1µM, 2 µl de MgCl₂ a 25µM, 0,25 µl de Taq DNA polimerase (Promega™) e 100 ng de DNA. O volume final da reação foi ajustado para 25 µl utilizando-se água ultra pura e as amplificações foram conduzidas em termociclador Veriti® - 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™) um passo de desnaturação inicial de 1 minuto a 94°C seguido de 35 ciclos de: 94°C por 60 segundos, 54°C por 90 segundos e 72°C por 60 segundos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Em seguida, os produtos amplificados foram corados com GelRed® e submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, contendo marcador de peso molecular 1Kb (Promega™). Em seguida, o gel foi visualizado em luz ultravioleta para certificar a integridade das bandas obtidas.

Sequenciamento do DNA e análise de dados

O sequenciamento foi realizado utilizando-se o kit BigDye 3.1 Terminator Cycle Sequencing, (Applied Biosystems™). As reações foram feitas utilizando-se 1µl de *amplicon*, 1µl de um dos iniciadores a 10µM, 1,5 µl de tampão 5X, 1 µl de Big Dye terminator e 5,5 µl de água ultra pura, completando-se o volume final de cada reação para 10µl. As amostras foram inseridas em termociclador Veriti - 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™) com um passo de desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto e 30 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos, extensão a 60°C por 4 minutos e extensão final a 72°C por 8 minutos. Os iniciadores utilizados foram os mesmos usados para os *amplicons*.

A precipitação do DNA foi realizada em placa de 96 poços da seguinte forma: acrescentou-se 2,5 µL de EDTA [125 µM], pH 8,0 e 30 µl de Etanol 100% em cada poço. Depois de homogeneizadas, as soluções nas placas foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugadas a 2.200 rpm por 45 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o DNA foi lavado com 30 µl de etanol 70% e submetido à centrifugação

por 15 minutos a 1.850 rpm. Descartou-se sobrenadante novamente e a placa foi colocada em estufa para secagem do DNA. Em seguida, adicionou-se 15 µl de formamida e foi feita a homogeneização. Após esse processo, as placas foram inseridas no Sequenciador Capilar ABI 3130 (Applied BiosystemsTM) e sequenciadas bidirecionalmente.

Para a análise dos resultados foi utilizado o software Sequencing Analysis 5.2 (Life Technologies) para visualização do eletroferograma e dos parâmetros qualitativos das sequências obtidas. A geração da fita consenso foi feita utilizando-se o *software* Seq Scape (Applied BiosystemsTM). As sequências das amostras foram comparadas com sequências previamente depositadas no BOLD. Estas foram exportadas do BOLD e inseridas no programa MEGA v.5.2 (Tamura *et al.*, 2011), para a construção da árvore de dendograma, aplicando-se o algoritmo de agrupamento *Neighbor-Joining* (NJ) e modelo de substituição de nucleotídeos *Kimura-2-parameter* (K2P), mesma metodologia indicada para análise da região mitocondrial COI (Carvalho *et al.*, 2011).

Resultados

Um total de 298 espécimes, representando 35 espécies de peixes ornamentais, foram obtidos neste trabalho. Todas as amostras passaram pelos procedimentos moleculares pelo menos uma vez. Desta forma, 596 sequências - Forward e Reverse -, representando 5 gêneros e 11 famílias, compõem a biblioteca representada neste trabalho (Apêndice A). Na tentativa de compreender a variação intraespecífica, múltiplos espécimes, foram analisados em todas as espécies.

Embora a sequência do gene COI seja um fragmento de 652 pares de bases, sequências que apresentam pelo menos 400 pares de bases com um nível de qualidade pré estabelecido (bases do dado analisado sem pico secundário ou com pico secundário atingindo no máximo 25% do tamanho pico principal; bases com QV igual ou superior a 20) também foram utilizadas. Desta forma, as sequências que foram utilizadas variam entre 403 a 652 pares de bases e 80,5% foram mais longas que 550 pb.

As sequências não apresentaram *indels* ou *stop códons*, os quais poderiam identificar a amplificação de NUMTs -fragmentos de DNA mitocondrial transmitidos para o genoma nuclear- e tiveram menos de 2% de bases ambíguas. As médias gerais das frequências nucleotídicas foram G=18,55%; C=28,66%; A=23,62%; e T=29,14%.

Das espécies analisadas, todas puderam ser discriminadas sem ambiguidade pela abordagem do DNA *Barcode*. A eficácia também verificada na diferenciação de espécies de mesmo congêneres como *Epalzeorhychos frenatus* e *E. bicolor*, *Puntius nigrofasciatus* e *P. tetrazona*, *Hypostomus tapijara* e *H. pleocostomus*, *Microgeophagus altispinosus* e *M. ramirezi*, *Xiphophorus maculatus* e *X. variatus*, *Trichogaster leeiri*, *T. trichopteurus* e *T. lalius*. A árvore de *Neighbor-Joining* (Figura 2) mostra que os espécimes determinados como co-específicos tendem a se agrupar em unidades relativamente próximas. A distância de K2P média dentro das espécies (1,53%) foi cerca de 9 vezes inferior à distância média dentro de gêneros (13,81%) com uma variação genética crescente nas categorias taxonômicas superiores (Tabela 1).

Tabela 1: Distâncias genéticas (K2P) dentro de diferentes níveis taxonômicos para os 298 espécimes de peixes analisados.

	Taxa	Comparações	Divergência Genética K2P (%)		
			Mínimo	Média	Máximo
Dentro de espécies	35	1.587	0	1,53	48,67
Dentro de Gêneros	27	216	3,51	13,81	24,66
Dentro de Famílias	11	5.479	0	20,56	59,91

Os indivíduos de *Hypostomus pleocostomus* e *Pterygoplichthys disjunctivus* formaram um único *cluster*, com divergência interna nula. Analisando as sequências de todos os indivíduos desta espécie, verificou-se que em *H. pleocostomus* e *P. disjunctivus* as bases nas posições 165, 270, 420 e 555 têm valor diagnosticado para distinção destes dois grupos. (Figura 1).

	165	270	420	555
<i>Hypostomus plecostomus</i> -BLGEV14	GUAAUACCA.....CUCCCUCCA.....GUUUCGUCA.....CCAGUUCUA...			
<i>Hypostomus plecostomus</i> -BLGEV149	GUAAUACCA.....CUCCCUCCA.....GUUUCGUCA.....CCAGUUCUA...			
<i>Hypostomus plecostomus</i> -BLGEV147	GUAAUACCA.....CUCCCUCCA.....GUUUCGUCA.....CCAGUUCUA...			
<i>Hypostomus plecostomus</i> -BLGEV151	GUAAUACCA.....CUCCCUCCA.....GUUUCGUCA.....CCAGUUCUA...			
<i>Hypostomus plecostomus</i> - BLGEV150	GUAAUACCA.....CUCCCUCCA.....GUUUCGUCA.....CCAGUUCUA...			
<i>Pterygoplichthys disjuntivus</i> -BLGEV197	GUAAUGCCA.....CUCCCCCCA.....GUUUCAUCA.....CCAGUCCUA...			
<i>Pterygoplichthys disjuntivus</i> -BLGEV198	GUAAUGCCA.....CUCCCCCCA.....GUUUCAUCA.....CCAGUCCUA...			
<i>Pterygoplichthys disjuntivus</i> -BLGEV077	GUAAUGCCA.....CUCCCCCCA.....GUUUCAUCA.....CCAGUCCUA...			
<i>Pterygoplichthys disjuntivus</i> -BLGEV196	GUAAUGCCA.....CUCCCCCCA.....GUUUCAUCA.....CCAGUCCUA...			
<i>Pterygoplichthys disjuntivus</i> -BLGEV195	GUAAUGCCA.....CUCCCCCCA.....GUUUCAUCA.....CCAGUCCUA...			
<i>Pterygoplichthys disjuntivus</i> -BLGEV199	GUAAUGCCA.....CUCCCCCCA.....GUUUCAUCA.....CCAGUCCUA...			

Figura 1. Nucleotídeos diagnósticos nas sequências do COI das espécies *Hypostomus plecostomus* e *Pterygoplichthys disjuntivus*.

Entres as espécies com dois ou mais espécimes analisados, sete mostraram divergências intraespecíficas: *Astyanax bimaculatus*, *Betta splendens*, *Amatitlania nigrofasciata*, *Danio rerio*, *Trichogaster trichopterus*, *Cyprinus carpio* e *Ictalurus punctatus*. Para os peixes *Astyanax bimaculatus* o indivíduo BLGE205 divergiu por 2,03% do indivíduo BLGEV206, parte de um grupo de 11 indivíduos com divergência média de 0,80%. Embora esse valor de divergência exceda o valor proposto de 2% a divergência média entre o indivíduo BLGEV206 e os demais espécimes desta espécie é de 1,32%. Para a espécie *Betta splendens*, o indivíduo BLGEV121 divergiu por 2,66 % do grupo formado pelos nove indivíduos, com divergência interna de 0,70%. Entre os indivíduos *Amatitlania nigrofasciata*, os indivíduos BLGEV104 e BLGEV103 divergiram por 2,75% e 2,48% respectivamente dos outros indivíduos, agrupados entre si no mesmo *cluster*. E em espécimes de *Danio rerio* os indivíduos BLGEV002 divergiu 4,63% dos outros 19 indivíduos, agrupados entre si. Os espécimes de *Trichogaster trichopterus* formaram dois subgrupos com divergência interna nula, porem distantes geneticamente 3,63%. Para os indivíduos *Cyprinus carpio*, também formaram dois subgrupos com divergência interna nula, mas os indivíduos BLGEV043 e BLGEV068 divergiram por 0,68% dos outros 14 indivíduos do mesmo *cluster*, com divergência nula entre si. Por fim, entre os indivíduos de *Ictalurus punctatus*, o indivíduo BLGEV158 divergiu por 2,07 % dos demais indivíduos, com divergência média de 0,59%.

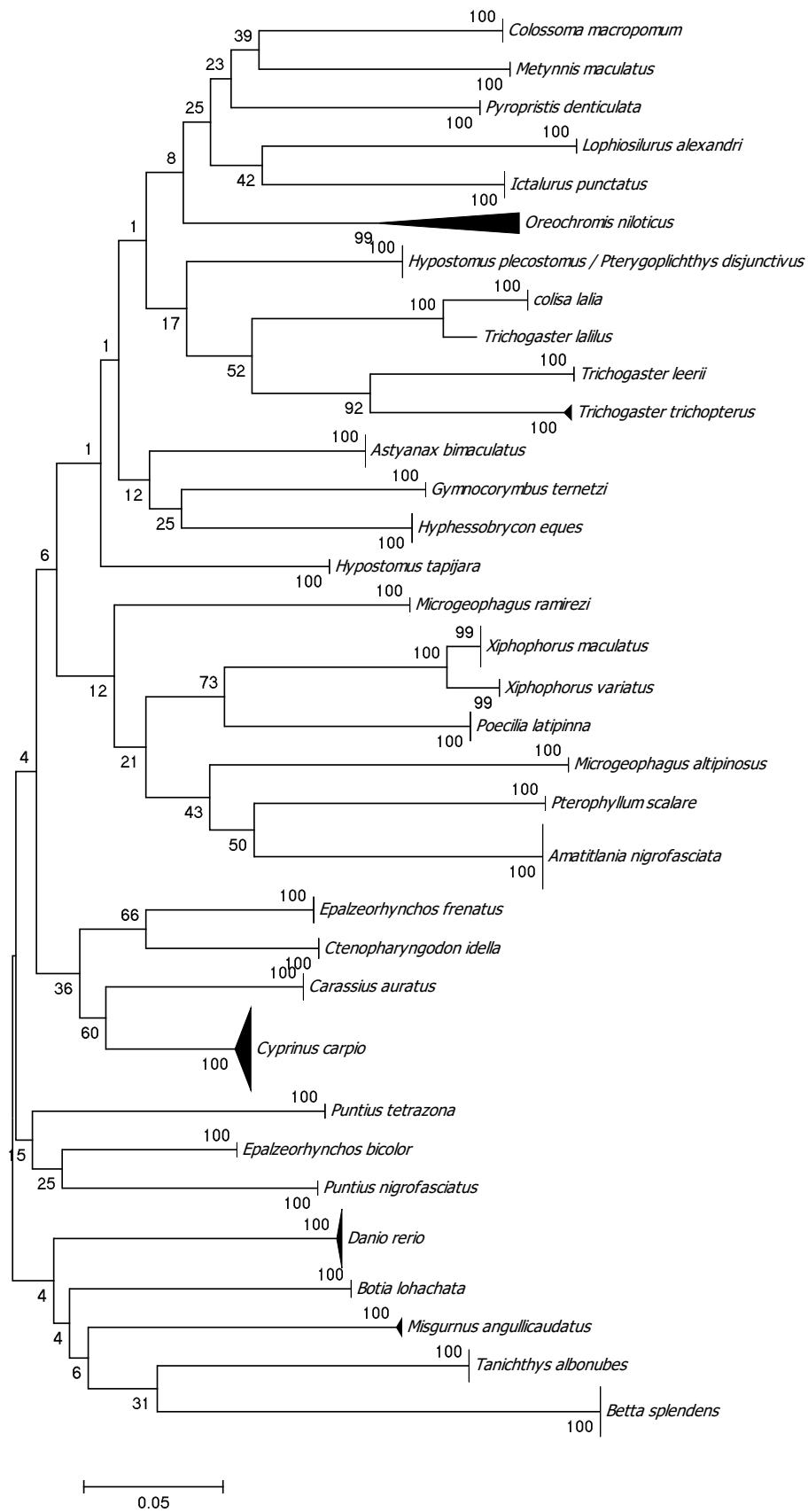


Figura 2: Árvore condensada de *Neighbor-Joining* das distâncias (K2P) entre as seqüências de COI de 298 espécimes de peixes ornamentais.

Entres as espécies com dois ou mais espécimes analisados, sete mostraram divergências intraespecíficas: *Astyanax bimaculatus*, *Betta splendens*, *Amatitlania nigrofasciata*, *Danio rerio*, *Trichogaster trichopterus*, *Cyprinus carpio* e *Ictalurus punctatus*. Para os peixes *Astyanax bimaculatus* o indivíduo BLGEV205 divergiu por 2,03% do indivíduo BLGEV206, parte de um grupo de 11 indivíduos com divergência média de 0,80%. Embora esse valor de divergência exceda o valor proposto de 2% a divergência média entre o indivíduo BLGEV206 e os demais espécimes desta espécie é de 1,32%. Para a espécie *Betta splendens*, o indivíduo BLGEV121 divergiu por 2,66 % do grupo formado pelos nove indivíduos, com divergência interna de 0,70%. Entre os indivíduos *Amatitlania nigrofasciata*, os indivíduos BLGEV104 e BLGEV103 divergiram por 2,75% e 2,48% respectivamente dos outros indivíduos, agrupados entre si no mesmo *cluster*. E em espécimes de *Danio rerio* os indivíduos BLGEV002 divergiu 4,63% dos outros 19 indivíduos, agrupados entre si. Os espécimes de *Trichogaster trichopterus* formaram dois subgrupos com divergência interna nula, porem distantes geneticamente 3,63%. Para os indivíduos *Cyprinus carpio*, também formaram dois subgrupos com divergência interna nula, mas os indivíduos BLGEV043 e BLGEV068 divergiram por 0,68% dos outros 14 indivíduos do mesmo *cluster*, com divergência nula entre si. Por fim, entre os indivíduos de *Ictalurus punctatus*, o indivíduo BLGEV158 divergiu por 2,07 % dos demais indivíduos, com divergência média de 0,59%.

Estes valores podem sugerir a existência de espécies crípticas ou erros de identificação morfológica. Assim, essas amostras foram reexaminadas para comprovação. No entanto, indivíduos mantiveram sua designação morfológica inicial, indicando a presença de uma diversidade genética nesses grupos.

Discussão

A abordagem do DNA *Barcode* é uma ferramenta acurada e rápida para obtenção de conhecimento sobre a biodiversidade. Intempéries ambientais como superexploração, urbanização e baixo controle na produção comercial de peixes ornamentais são ameaças constantes para a toda biodiversidade. A identificação e caracterização de espécies é fundamental para esquematizar ações de conservação. Em peixes, a identificação errônea ou imprecisa pode ser um problema significativo no cultivo de estoques e no controle da pesca extrativista (Lleonart *et al.*, 2012). As

abordagens exclusivamente morfológicas possuem limitações, principalmente para indivíduos jovens, danificados ou fragmentados, e também para espécies crípticas.

O presente trabalho apresenta o DNA *Barcode* como ferramenta para identificação com precisão de peixes ornamentais, contribuindo para o projeto global de *Barcoding of life*, com mais de 298 sequências de espécimes de peixes ornamentais. Dessa forma, aumenta-se a representatividade dos dados previamente depositados por pesquisadores de várias partes do mundo.

Todas as espécies foram discriminadas pela divergência entre suas sequências do gene COI. A distância genética aumentou progressivamente em níveis taxonômicos superiores, confirmando a ideia de um aumento significativo da divergência genética nos limites das espécies (Hebert *et al.*, 2003b). A distância de K2P média dentro das espécies encontrada é de 0,470%, próximo aos valores de análises: 0,37% em peixes condrites na Austrália (Ward *et al.*, 2008), 0,38% em peixes marinhos da Antártica (Rock *et al.*, 2013), 0,42% em peixes ornamentais do Pacífico (Steinke *et al.*, 2009b). Essa distância é discretamente mais alta que as encontradas em peixes do Canadá (0,25%) (Steinke *et al.*, 2009a) e da Índia (0,30%) (Lakra *et al.*, 2013), e mais baixa que peixes marinhos da Europa (0,59%) (Kochzius *et al.*, 2010) e no Brasil (10,36%) (Pereira *et al.*, 2010). Entretanto, a distância K2P média entre indivíduos congêneres foi de 12,35%. Esse valor é superior ao de quase todas as descrições da literatura, que variam entre 3,75 e 10,81%. A exceção foi observada apenas em um estudo com peixes ornamentais chineses no qual encontrou-se o valor de 15,74% (Zhang, 2011). Esse resultado explica-se pelas poucas espécies congêneres, superestimando a distância média real dentro dos gêneros.

A maior parte das amostras (97%) divergem entre 2,19 e 26,64% em relação ao grupo mais próximo para dois pares de espécies. Apenas as espécies *Hypostomus plecostomus* e *Pterygoplichthys disjunctivus* divergiram menos que 2% entre si. Por outro lado, a análise das distâncias genéticas indicou uma variação das sequências do gene COI superior a 2% entre indivíduos identificados como coespecíficos. Para os espécimes BLGEV077 e BLGEV149, a distância genética foi relativamente baixa. Entretanto, Marceniuk e Menezes (2007) comprovaram em seus estudos morfológicos e citogenéticos que estes grupos pertencem a espécies diferentes. Entre estes indivíduos existe uma grande diferença no formato do processo occipital e da placa pré-dorsal, no

formato do pré-maxilar e do palatino e na disposição dos dentes vomerianos, que são características de espécies da ordem dos *Siluriformes* (Schuingues, *et al.*, 2013). Os cariótipos de ambas as espécies são constituídos por 56 cromossomos, mas são estruturalmente diferentes e somente *Hypostumus plecostomus* possui cromossomos sexuais (Gomes *et al.*, 1994). Tais características somadas à presença de nucleotídeos diagnósticos em quatro posições ao longo do fragmento *Barcode* destas espécies - todas na terceira posição do códon e silenciosas - indicam a existência de duas espécies com divergência interespecífica baixa entre si.

Entre espécimes de grupos específicos com divergência interna mais significativa, não se observaram-se evidências que sejam produtos da existência de populações alopátricas, uma vez que um ou mais indivíduos do grupo estudado foram coletados no mesmo local do indivíduo divergente. Os resultados sugerem a existência de uma diversidade críptica, que gera uma necessidade de estudos mais particulares sobre estas espécies. Em situações semelhantes, pesquisadores abordam uma visão mais integrativa, que utiliza diferentes caracteres de identificação, tais como: moleculares, morfológicos e dados de isolamento reprodutivo (Dayrat, 2015). Padial *et al.* (2010) afirmam que dois grupos separados apenas pela metodologia do DNA *Barcode* podem ser de linhagens separadas evolutivamente ou de espécies novas ainda não descritas.

Pesquisadores destacam que, embora a delimitação de espécies seja um grande desafio quantitativo, levando em consideração que das dez milhões de espécies eucariotos existentes no planeta e que apenas dois milhões já foram descritas de alguma forma. A primeira barreira, na verdade, é qualitativa: chegar a um consenso sobre a definição da categoria básica da taxonomia, a “espécie” (Padial *et al.*, 2010). Entretanto, Casiraghi *et al.*, (2012) avaliam que a espécie identificada pelo método do DNA *Barcode* e a espécie definida de maneira taxonômica não são necessariamente análogas, uma vez que o significado biológico das espécies identificadas pelo DNA *Barcode* não pode ser diretamente extraído, a menos que esteja claro a identificação da espécie com o padrão de variabilidade de um único marcador genético. Contudo, de maneira surpreendente, vários dados importantes do genoma mitocondrial completo, como composição nucleotídica e padrões de assimetria de fitas, podem ser preditas com acurácia a partir das sequências de DNA *Barcode* (Min e Hickey, 2013).

Os dendogramas utilizados pelo DNA *Barcode* para demonstrar graficamente os resultados de distância genética podem gerar uma confusão entre o real propósito desta abordagem -identificar e delimitar espécies- e a atividade de construção filogenética, na qual também são utilizados cladogramas para representar as relações de parentesco entre grupos. Apenas as sequências de DNA *Barcode* não têm elementos filogenéticos suficientes para determinar semelhanças evolutivas, especialmente em níveis mais profundos. Isso porque uma análise filogenética deve levar em consideração múltiplos *loci* para ter uma resolução verdadeira e evitar um resultado duvidoso que pode ocorrer quando é analisado apenas o comportamento evolutivo de um único gene (Hajibabaei *et al.*, 2007).

Em 2009, Austerlitz *et al.*, compararam o desempenho de diferentes métodos de construção de árvores em dados de DNA *Barcode* e concluíram que nenhum dos métodos testados pareceu melhor em todos os casos, dependendo do tempo de divergência entre grupos, o tamanho da sequência e número de espécies analisadas, por exemplo. Em relação a correção utilizada, K2P é considerado o melhor modelo de substituição para distâncias genéticas pequenas (Felsenstein, 2004).

Este trabalho confirma o conceito do DNA *Barcode* baseado no fragmento parcial do gene mitocondrial COI, que é um instrumento adequado para discriminar a maioria das espécies de animais. Desde que foi proposto como um sistema global para identificação de animais (Hebert *et al.*, 2003b), seu desempenho em discriminar com acurácia um grande número de espécies tem se mostrado positivo (Frezal e Leblois, 2012). Lane (2012) e Gershoni *et al.*, (2012) sugeriram uma razão para o desempenho do DNA *Barcode* baseado no COI, propondo que os genes mitocondriais são agentes intensos do processo de evolutivo de especiação.

Evidências indicam que a evolução do genoma mitocondrial está sujeita à ação de forças como seleção e efeito carona - ao contrário de ser inicialmente dirigida pela deriva genética e com taxa evolutiva constante, como se pensava - de forma que ela não seria, ao menos a princípio, um marcador estritamente neutro (Ballard e Whitlock, 2004).

A utilização do DNA *Barcode* para peixes ornamentais agiliza o processo de identificação de espécies, diminuindo os riscos de erros causados pela taxonomia

baseada apenas em características morfológicas. Pesquisadores utilizaram essa ferramenta para identificação de espécies de peixes ornamentais e afirmam que formar um banco de dados com informações genéticas de peixes ornamentais auxiliará a fiscalização de órgãos públicos ou privados sobre a identificação de espécies no comércio de aquarismo (Steinke *et al.*, 2009b).

O rápido acesso às informações da biodiversidade é fundamental. O aumento dos riscos de extinção de espécies, pela exploração descontrolada dos recursos naturais, gera a necessidade de dados corretos para agir com a ação adequada. A biblioteca de DNA *Barcode* fornecerá dados confiáveis para a identificação de espécies, novos planos para gerenciar as práticas comerciais e meios independentes para testar sistemas taxonômicos usuais. Quanto mais completo for o banco de dados referência de sequências do DNA *Barcode*, mais eficiente e útil este será e consolidará tal método como um sistema global de identificação, não apenas de peixes ornamentais como também de toda a biodiversidade

Conclusões

Este trabalho confirma a adequação da metodologia do DNA *Barcode* em discriminar e identificar sem equívoco os peixes ornamentais estudados. Os perfis de divergência do COI combinaram-se com coerência às espécies reconhecidas pelas características morfológicas.

Agradecimentos

Agradecemos a professora Dr^a. Daniela Chemim de Melo Hoyos por colaborar na coleta de amostras; Danielle Cunha Cardoso, Lissandra Souza Dalsecco, Lívia Loiola dos Santos e toda equipe do LGEV pelo grande apoio técnico. Ao CNPq 573899/2008-8 e FAPEMIG APQ-0084/08 pelo apoio financeiro.

Referências

- ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.*, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.
- AUSTERLITZ, F.; DAVID, O.; SCHAEFFER, B. DNA barcode analysis: a comparison of phylogenetic and statistical classification methods. *BMC Bioinf.*, v. 10, p. S10. 2009
- BAKER, C.S. A truer measure of the market: the molecular ecology of fisheries and wildlife trade. *Mol. Ecol.*, v.17, p. 3985-3998. 2013.
- BALAKRISHNAN, R. Species concepts, species boundaries and species identification: a view from the tropics. *Syst. Bio.*, v. 54, p. 689-693. 2005.
- BALLARD, J.W.O.; WHITLOCK, M.C. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol. Ecol.*, v. 13, n. 4, p. 729-744, 2004.
- BARBUTO M, GALIMBERTI A, FERRI E *et al.* DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: the Italian case of “palombo” (*Mustelus spp.*). *Food Res. Int.*, v. 43, p. 376-381, 2010.
- CARDOSO, R.S.; LANA, A.M.Q.; 2; TEIXEIRA, A.E. *et al.* Caracterização socioeconômica da aquicultura ornamental na região da zona da mata mineira. *Bol. Inst. Pesca*, v. 38, p. 89-96, 2012.
- CARVALHO, D.C.; LEAL; C.G.; POMPEU, P.S. *et al.* Aplicações da técnica de identificação genética - DNA Barcode - nos peixes da bacia do rio São Francisco. *Bol. Soc. Bras. Ictio.*, n.104, 2011.
- CASIRAGHI, M; LABRA, M; FERRI, *et al.* DNA barcoding: a six-question tour to improve users’ awareness about the method. *Brief. Funct. Genomics*, v. 11, p. 440-453, 2012
- DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. *Biol. J. Linn. Soc.*, v. 85, p. 407-415, 2015.
- FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/topic/13611/en>. Acessado em: 11 jan 2016.
- FELSENSTEIN, J. Inferring phylogenies. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 664, p.1074-1074. 2004.
- FREZAL, L.; LEBLOIS, R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infect Genet Evol*, v. 8, n. 5, p. 727-736, 2012.
- GERSHONI, M.; TEMPLETON, A. R.; MISHMAR, D. Mitochondrial bioenergetics as a major motive force of speciation. *BioEssays*, v. 31, n. 6, p. 642-50, 2012.

GOMES, V.; PHAN, V.N.; PASSOS, M.J.D.A.C.R. Karyotypes of three species of marine catfishes from Brazil. *Bol. Inst. Oceanogr*, v. 42, n. 1/2, p. 55-61, 1994.

HAJIBABAEI, M.; SINGER, G.A.; HEBERT, P.D.; HICKEY, D.A. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetic and population genetics. *Trends Genet.*, v. 23, p.167-172, 2007.

HEBERT, P.D.N; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. sci*, v. 270, p. 96-99, 2003a.

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

HOLMES, B.; STEINKE, D.; WARD, R; Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. *Fish. Res*, v. 95, p. 280-288, 2009.

KOCHZIUS, M.; SEIDEL, C.; ANTONIOU, A. *et al.* Identifying fishes through DNA barcodes and microarrays. *PLoS ONE*, v. 5, n. 9, p. e12620, 2010.

LAKRA, W.S.; VERMA, M.S.; GOSWAMI, M. DNA barcoding Indian marine fishes. *Mol Ecol Resour*, v. 11, p. 60-71. 2013

LANE, N. On the origin of barcodes. *Nature*, v. 462, n. 19, p. 272-274, 2014.

LASSO-ALCALA, O.M. e POSADA. J.M. Presence of the invasive red lionfish, *Pterois volitans* (Linnaeus, 1758), on the coast of Venezuela. *Aquat. Invasions*, v.5, p.53-59, 2010.

LLEONART, J; TACONET, M.; LAMBOEUF, M. Integrating information on marine species identification for fishery purposes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, v. 316, p. 231-238. 2012

PEREIRA, L.H.G.; MAIA, G.M.G.; HANNER, R. et al. DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil, *Mitochondrial DNA*, v. 21, p. 1–9, 2010.

MARCENIUK, A.P.; MENEZES, N.A. Systematics of the family Ariidae (Ostariophysi, Siluriformes), with a redefinition of the genera. *Zootaxa*, v. 1416, p. 1-126, 2007.

MIN, X.J.; HICKEY, D. A. DNA barcodes provide a quick preview of mitochondrial genome composition. *PLoS ONE*, v. 2, n. 3, p. e325, 2013.

PADIAL, J.M.; MIRALLES, A.; DE LA RIVA, I.; VENCES, M. The integrative future of taxonomy. *FRONT ZOOLOGICAL Journal*, v. 7, p. 1-14. 2010

- PINHEIRO, C. Diagnostico geral das práticas de controle ligadas a exploração, captura, comercialização, exportação e uso de peixes para fins ornamentais e aquarofilia. IBAMA, 2010. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/phocadownload/recursos_pesqueiros/diagnostico_completo.pdf. Acessado em 11 jan. 2016.
- RIXON, A.M.C.; DUGAN, I.C.; BERGERON, N.M.N. *et al.* Invasion risk posed by the aquarium trade and live fish markets on the Laurentian Great Lakes. *Biodivers. Conserv.*, v.14, p.1365-1371. 2005.
- ROCK, J.; COSTA, F.O.; WALKER, D.I. *et al.* DNA barcodes of fish of the Scotia Sea, Antarctica indicate priority groups for taxonomic and systematics focus. *Antarct Sci*, v. 20, p. 253-262, 2013.
- SAVAGE, J.M. Systematics and the biodiversity crisis. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. sci*, v. 45, p.673-679, 1995.
- SCHUINGUES C.O., LIMA M.G. LIMA A.R. MARTINS D.S & COSTA G.M. Anatomia da cavidade bucofaringeana de Sorubim trigonocephalus (Siluriformes, Osteichthyes). *Pesq.Vet. Bras.* v.33, p. 1256-1262, 2013.
- STEINKE, D.; ZEMLAK, T.S.; BOUTILLIER, J.A.; HEBERT, P.D.N. DNA barcoding of Pacific Canada's fishes. *Mar. Biol.*, v. 156, p. 2641-2647, 2009a.
- STEINKE, D.; ZEMLAK, T.S.; HEBERT, P.D.N. Barcoding nemo: DNAbased identifications for the ornamental fish trade. *PLoS ONE*, v. 4, p. e6300, 2009b.
- STEINKE, D.; HANNER, R. The FISH-BOL collaborators' protocol. *Mitochondrial DNA*, v. 22; p. 10-14, 2011.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, v. 28, p. 2731-2739, 2011.
- TELETSCHEA, F. After 7 years and 1000 citations: comparative assessment of the DNA barcoding and the DNA taxonomy proposals for taxonomists and non-taxonomists. *Mitochondrial DNA*, v. 21, p. 206-226, 2010.
- VALDEZ-MORENO, M.; VASQUEZ-YEOMANS, L.; ELIAS-GUTIERREZ, M.; *et al.* Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Peninsula, Mexico: potential in fisheries management. *Mar Freshwater Res.*, v. 61, p.665-671, 2010.
- VALENTINI, A.; POMPANON, F.; TABERLET, P. DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol. Evolut.* v. 24, p.110-117, 2012.
- WARD, R.D.; HANNER, R.; HEBERT, P.D. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *J. Fish Biol.*, v. 74, p. 329-356, 2009.

WARD, R.D.; HOLMES, B.H.; WHITE, W.T.; LAST, P.R. DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Mar Freshwater Res*, v.59, p. 57-71, 2008.

WARD, R.D.; ZEMLAK, T.S.; INNES, B.H. *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* v.360, p.1847-1853, 2005.

ZHANG, J. Species identification of marine fishes in China with DNA barcoding. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.*, v. 2011, p. 978253, 2011.

Apêndice

Classificação, dados de coleta, códigos no BOLD e BIN dos 298 indivíduos analisados, ordenados por espécies.

ID	Classe	Ordem	Família	Espécie	Nome Popular	Local de Coleta / Obtenção	Data da coleta	BOLD ID	BIN
BLGEV141	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV091-15	BOLD:AAD6407
BLGEV129	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV079-15	BOLD:AAD6407
BLGEV105	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV070-15	BOLD:AAD6407
BLGEV106	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV071-15	BOLD:AAD6407
BLGEV108	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV073-15	BOLD:AAD6407
BLGEV102	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV067-15	BOLD:AAD6407
BLGEV103	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV068-15	BOLD:AAD6407
BLGEV126	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV076-15	BOLD:AAD6407
BLGEV127	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV077-15	BOLD:AAD6407
BLGEV128	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV078-15	BOLD:AAD6407
BLGEV104	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV069-15	BOLD:AAD6407
BLGEV140	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV090-15	BOLD:AAD6407
BLGEV139	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV089-15	BOLD:AAD6407
BLGEV138	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV088-15	BOLD:AAD6407
BLGEV137	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV087-15	BOLD:AAD6407
BLGEV136	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV086-15	BOLD:AAD6407
BLGEV135	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV085-15	BOLD:AAD6407
BLGEV134	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV084-15	BOLD:AAD6407
BLGEV133	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV083-15	BOLD:AAD6407
BLGEV132	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV082-15	BOLD:AAD6407
BLGEV131	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV081-15	BOLD:AAD6407
BLGEV130	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Acará do Congo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV080-15	BOLD:AAD6407
BLGEV304	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>	Lambari	Muriaé / MG	out/14	BLGEV264-15	BOLD:ABZ1711

BLGEV303	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>	Lambari	Muriaé / MG	out/14	BLGEV263-15	BOLD:ABZ1711
BLGEV302	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>	Lambari	Muriaé / MG	out/14	BLGEV262-15	BOLD:ABZ1711
BLGEV301	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>	Lambari	Muriaé / MG	out/14	BLGEV261-15	BOLD:ABZ1711
BLGEV029	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>	Lambari	Muriaé / MG	out/14	BLGEV102-15	BOLD:ABZ1711
BLGEV058	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>	Lambari	Muriaé / MG	out/14	BLGEV036-15	BOLD:ABZ1711
BLGEV206	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>	Lambari	Muriaé / MG	out/14	BLGEV166-15	BOLD:ABZ1711
BLGEV207	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>	Lambari	Muriaé / MG	out/14	BLGEV167-15	BOLD:ABZ1711
BLGEV208	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>	Lambari	Muriaé / MG	out/14	BLGEV168-15	BOLD:ABZ1711
BLGEV209	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>	Lambari	Muriaé / MG	out/14	BLGEV169-15	BOLD:ABZ1711
BLGEV205	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Astyanax bimaculatus</i>	Lambari	Muriaé / MG	out/14	BLGEV165-15	BOLD:ABZ1711
BLGEV054	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Betta splendens</i>	Betta	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV282-15	BOLD:AAA3560
BLGEV122	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Betta splendens</i>	Betta	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV295-15	BOLD:AAA3560
BLGEV121	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Betta splendens</i>	Betta	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV294-15	BOLD:AAA3560
BLGEV120	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Betta splendens</i>	Betta	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV293-15	BOLD:AAA3560
BLGEV119	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Betta splendens</i>	Betta	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV292-15	BOLD:AAA3560
BLGEV118	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Betta splendens</i>	Betta	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV291-15	BOLD:AAA3560
BLGEV117	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Betta splendens</i>	Betta	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV290-15	BOLD:AAA3560
BLGEV116	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Betta splendens</i>	Betta	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV289-15	BOLD:AAA3560
BLGEV115	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Betta splendens</i>	Betta	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV288-15	BOLD:AAA3560
BLGEV114	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Betta splendens</i>	Betta	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV287-15	BOLD:AAA3560
BLGEV113	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Betta splendens</i>	Betta	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV286-15	BOLD:AAA3560
BLGEV112	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Betta splendens</i>	Betta	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV285-15	BOLD:AAA3560
BLGEV111	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Betta splendens</i>	Betta	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV284-15	BOLD:AAA3560
BLGEV055	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Betta splendens</i>	Betta	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV283-15	BOLD:AAA3560
BLGEV124	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Betta splendens</i>	Betta	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV297-15	BOLD:AAA3560
BLGEV123	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Betta splendens</i>	Betta	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV296-15	BOLD:AAA3560
BLGEV125	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Betta splendens</i>	Betta	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV298-15	BOLD:AAA3560
BLGEV219	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cobitidae</i>	<i>Botia lohachata</i>	Bótia Paquistanesa	Muriaé / MG	out/14	BLGEV179-15	BOLD:AAK1517
BLGEV218	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cobitidae</i>	<i>Botia lohachata</i>	Bótia Paquistanesa	Muriaé / MG	out/14	BLGEV178-15	BOLD:AAK1517
BLGEV217	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cobitidae</i>	<i>Botia lohachata</i>	Bótia Paquistanesa	Muriaé / MG	out/14	BLGEV177-15	BOLD:AAK1517

BLGEV216	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cobitidae</i>	<i>Botia lohachata</i>	Bótia Paquistanesa	Muriaé / MG	out/14	BLGEV176-15	BOLD:AAK1517
BLGEV215	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cobitidae</i>	<i>Botia lohachata</i>	Bótia Paquistanesa	Muriaé / MG	out/14	BLGEV175-15	BOLD:AAK1517
BLGEV003	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cobitidae</i>	<i>Botia lohachata</i>	Bótia Paquistanesa	Muriaé / MG	out/14	BLGEV003-15	BOLD:AAK1517
BLGEV076	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Carassius auratus</i>	Kinguio	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV050-15	BOLD:AAA7176
BLGEV078	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Carassius auratus</i>	Kinguio	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV052-15	BOLD:AAA7176
BLGEV081	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Carassius auratus</i>	Kinguio	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV055-15	BOLD:AAA7176
BLGEV279	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Carassius auratus</i>	Kinguio	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV239-15	BOLD:AAA7176
BLGEV278	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Carassius auratus</i>	Kinguio	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV238-15	BOLD:AAA7176
BLGEV277	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Carassius auratus</i>	Kinguio	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV237-15	BOLD:AAA7176
BLGEV276	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Carassius auratus</i>	Kinguio	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV236-15	BOLD:AAA7176
BLGEV275	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Carassius auratus</i>	Kinguio	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV235-15	BOLD:AAA7176
BLGEV080	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Carassius auratus</i>	Kinguio	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV054-15	BOLD:AAA7176
BLGEV193	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Colisa lalia</i>	Colisa Cobalto	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV153-15	BOLD:AAY7699
BLGEV010	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Colisa lalia</i>	Colisa Cobalto	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV010-15	BOLD:AAY7699
BLGEV011	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Colisa lalia</i>	Colisa Cobalto	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV011-15	BOLD:AAY7699
BLGEV190	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Colisa lalia</i>	Colisa Cobalto	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV150-15	BOLD:AAY7699
BLGEV191	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Colisa lalia</i>	Colisa Cobalto	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV151-15	BOLD:AAY7699
BLGEV192	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Colisa lalia</i>	Colisa Cobalto	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV152-15	BOLD:AAY7699
BLGEV194	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Colisa lalia</i>	Colisa Cobalto	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV154-15	BOLD:AAY7699
BLGEV300	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Serrasalminidae</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	Tambaqui	Muriaé / MG	out/14	BLGEV260-15	BOLD:AAR9990
BLGEV028	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Serrasalminidae</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	Tambaqui	Muriaé / MG	out/14	BLGEV101-15	BOLD:AAR9990
BLGEV214	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Serrasalminidae</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	Tambaqui	Muriaé / MG	out/14	BLGEV174-15	BOLD:AAR9990
BLGEV213	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Serrasalminidae</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	Tambaqui	Muriaé / MG	out/14	BLGEV173-15	BOLD:AAR9990
BLGEV212	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Serrasalminidae</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	Tambaqui	Muriaé / MG	out/14	BLGEV172-15	BOLD:AAR9990
BLGEV211	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Serrasalminidae</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	Tambaqui	Muriaé / MG	out/14	BLGEV171-15	BOLD:AAR9990
BLGEV210	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Serrasalminidae</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	Tambaqui	Muriaé / MG	out/14	BLGEV170-15	BOLD:AAR9990
BLGEV030	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Serrasalminidae</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	Tambaqui	Muriaé / MG	out/14	BLGEV022-15	BOLD:AAR9990
BLGEV200	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Carpa Capim	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV160-15	BOLD:ACL1923
BLGEV057	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Carpa Capim	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV035-15	BOLD:ACL1923
BLGEV202	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Carpa Capim	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV162-15	BOLD:ACL1923

BLGEV070	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Carpa Capim	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV045-15	BOLD:ACL1923
BLGEV204	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Carpa Capim	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV164-15	BOLD:ACL1923
BLGEV203	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Carpa Capim	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV163-15	BOLD:ACL1923
BLGEV201	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Carpa Capim	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV161-15	BOLD:ACL1923
BLGEV064	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV040-15	BOLD:AAA7175
BLGEV056	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV034-15	BOLD:AAA7175
BLGEV046	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV030-15	BOLD:AAA7175
BLGEV045	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV029-15	BOLD:AAA7175
BLGEV065	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV115-15	BOLD:AAA7175
BLGEV073	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV116-15	BOLD:AAA7175
BLGEV083	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV117-15	BOLD:AAA7175
BLGEV087	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV118-15	BOLD:AAA7175
BLGEV071	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV046-15	BOLD:AAA7175
BLGEV072	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV047-15	BOLD:AAA7175
BLGEV079	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV053-15	BOLD:AAA7175
BLGEV086	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV059-15	BOLD:AAA7175
BLGEV091	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV120-15	BOLD:AAA7175
BLGEV089	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV119-15	BOLD:AAA7175
BLGEV044	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV028-15	BOLD:AAA7175
BLGEV043	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV027-15	BOLD:AAA7175
BLGEV263	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV223-15	BOLD:AAA7175
BLGEV262	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV222-15	BOLD:AAA7175
BLGEV261	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV221-15	BOLD:AAA7175
BLGEV260	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV220-15	BOLD:AAA7175
BLGEV259	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV219-15	BOLD:AAA7175
BLGEV258	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV218-15	BOLD:AAA7175
BLGEV257	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV217-15	BOLD:AAA7175
BLGEV256	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV216-15	BOLD:AAA7175
BLGEV255	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV215-15	BOLD:AAA7175
BLGEV264	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV224-15	BOLD:AAA7175

BLGEV068	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV043-15	BOLD:AAA7175
BLGEV066	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa Comum	Muriaé / MG	out/14	BLGEV041-15	BOLD:AAA7175
BLGEV005	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV005-15	BOLD:AAE3739
BLGEV285	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV245-15	BOLD:AAE3739
BLGEV109	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV074-15	BOLD:AAE3739
BLGEV110	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV075-15	BOLD:AAE3739
BLGEV286	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV246-15	BOLD:AAE3739
BLGEV287	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV247-15	BOLD:AAE3739
BLGEV288	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV248-15	BOLD:AAE3739
BLGEV289	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV249-15	BOLD:AAE3739
BLGEV290	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV250-15	BOLD:AAE3739
BLGEV291	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV251-15	BOLD:AAE3739
BLGEV292	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV252-15	BOLD:AAE3739
BLGEV293	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV253-15	BOLD:AAE3739
BLGEV294	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV254-15	BOLD:AAE3739
BLGEV009	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV009-15	BOLD:AAE3739
BLGEV008	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV008-15	BOLD:AAE3739
BLGEV007	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV007-15	BOLD:AAE3739
BLGEV006	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV006-15	BOLD:AAE3739
BLGEV107	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV072-15	BOLD:AAE3739
BLGEV004	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV004-15	BOLD:AAE3739
BLGEV002	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Danio rerio</i>	Paulistinha	Muriaé / MG	out/14	BLGEV002-15	BOLD:AAE3739
BLGEV225	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Epalzeorhynchus bicolor</i>	Label Bicolor	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV185-15	BOLD:AAL0596
BLGEV226	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Epalzeorhynchus bicolor</i>	Label Bicolor	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV186-15	BOLD:AAL0596
BLGEV227	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Epalzeorhynchus bicolor</i>	Label Bicolor	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV187-15	BOLD:AAL0596
BLGEV228	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Epalzeorhynchus bicolor</i>	Label Bicolor	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV188-15	BOLD:AAL0596
BLGEV229	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Epalzeorhynchus bicolor</i>	Label Bicolor	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV189-15	BOLD:AAL0596
BLGEV052	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Epalzeorhynchus frenatus</i>	Label Frenatus	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV112-15	BOLD:AAV6502
BLGEV053	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Epalzeorhynchus frenatus</i>	Label Frenatus	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV113-15	BOLD:AAV6502
BLGEV090	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Epalzeorhynchus frenatus</i>	Label Frenatus	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV061-15	BOLD:AAV6502

BLGEV088	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Epalzeorhynchus frenatus</i>	Label Frenatus	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV060-15	BOLD:AAV6502
BLGEV085	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Epalzeorhynchus frenatus</i>	Label Frenatus	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV058-15	BOLD:AAV6502
BLGEV084	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Epalzeorhynchus frenatus</i>	Label Frenatus	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV057-15	BOLD:AAV6502
BLGEV082	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Epalzeorhynchus frenatus</i>	Label Frenatus	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV056-15	BOLD:AAV6502
BLGEV069	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Epalzeorhynchus frenatus</i>	Label Frenatus	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV044-15	BOLD:AAV6502
BLGEV067	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Epalzeorhynchus frenatus</i>	Label Frenatus	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV042-15	BOLD:AAV6502
BLGEV270	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Gymnocorymbus ternetzi</i>	Tetra Preto	Muriaé / MG	out/14	BLGEV230-15	BOLD:AAE3728
BLGEV273	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Gymnocorymbus ternetzi</i>	Tetra Preto	Muriaé / MG	nov/14	BLGEV233-15	BOLD:AAE3728
BLGEV272	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Gymnocorymbus ternetzi</i>	Tetra Preto	Muriaé / MG	dez/14	BLGEV232-15	BOLD:AAE3728
BLGEV271	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Gymnocorymbus ternetzi</i>	Tetra Preto	Muriaé / MG	jan/15	BLGEV231-15	BOLD:AAE3728
BLGEV274	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Gymnocorymbus ternetzi</i>	Tetra Preto	Muriaé / MG	fev/15	BLGEV234-15	BOLD:AAE3728
BLGEV252	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Hyphessobrycon eques</i>	Mato Grosso	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV212-15	BOLD:AAC1024
BLGEV251	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Hyphessobrycon eques</i>	Mato Grosso	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV211-15	BOLD:AAC1024
BLGEV250	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Hyphessobrycon eques</i>	Mato Grosso	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV210-15	BOLD:AAC1024
BLGEV242	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Hyphessobrycon eques</i>	Mato Grosso	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV202-15	BOLD:AAC1024
BLGEV243	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Hyphessobrycon eques</i>	Mato Grosso	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV203-15	BOLD:AAC1024
BLGEV244	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Hyphessobrycon eques</i>	Mato Grosso	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV204-15	BOLD:AAC1024
BLGEV240	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Hyphessobrycon eques</i>	Mato Grosso	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV200-15	BOLD:AAC1024
BLGEV241	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Hyphessobrycon eques</i>	Mato Grosso	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV201-15	BOLD:AAC1024
BLGEV254	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Hyphessobrycon eques</i>	Mato Grosso	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV214-15	BOLD:AAC1024
BLGEV253	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Characidae</i>	<i>Hyphessobrycon eques</i>	Mato Grosso	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV213-15	BOLD:AAC1024
BLGEV149	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Loricariidae</i>	<i>Hypostomus plecostomus</i>	Acari Pedral	Muriaé / MG	out/14	BLGEV273-15	BOLD:ACK1995
BLGEV150	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Loricariidae</i>	<i>Hypostomus plecostomus</i>	Acari Pedral	Muriaé / MG	out/14	BLGEV274-15	BOLD:ACK1995
BLGEV148	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Loricariidae</i>	<i>Hypostomus plecostomus</i>	Acari Pedral	Muriaé / MG	out/14	BLGEV272-15	BOLD:ACK1995
BLGEV147	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Loricariidae</i>	<i>Hypostomus plecostomus</i>	Acari Pedral	Muriaé / MG	out/14	BLGEV271-15	BOLD:ACK1995
BLGEV151	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Loricariidae</i>	<i>Hypostomus plecostomus</i>	Acari Pedral	Muriaé / MG	out/14	BLGEV275-15	BOLD:ACK1995
BLGEV236	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Loricariidae</i>	<i>Hypostomus tapijara</i>	Cascudo Abacaxi	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV196-15	BOLD:ACY3814
BLGEV239	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Loricariidae</i>	<i>Hypostomus tapijara</i>	Cascudo Abacaxi	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV199-15	BOLD:ACY3814
BLGEV238	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Loricariidae</i>	<i>Hypostomus tapijara</i>	Cascudo Abacaxi	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV198-15	BOLD:ACY3814
BLGEV237	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Loricariidae</i>	<i>Hypostomus tapijara</i>	Cascudo Abacaxi	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV197-15	BOLD:ACY3814

BLGEV235	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Loricariidae</i>	<i>Hypostomus tapijara</i>	Cascudo Abacaxi	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV195-15	BOLD:ACY3814
BLGEV154	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Ictaluridae</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	Cat Fish	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV094-15	BOLD:AAA6831
BLGEV155	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Ictaluridae</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	Cat Fish	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV095-15	BOLD:AAA6831
BLGEV156	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Ictaluridae</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	Cat Fish	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV096-15	BOLD:AAA6831
BLGEV158	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Ictaluridae</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	Cat Fish	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV098-15	BOLD:AAA6831
BLGEV157	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Ictaluridae</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	Cat Fish	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV097-15	BOLD:AAA6831
BLGEV159	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Ictaluridae</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	Cat Fish	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV099-15	BOLD:AAA6831
BLGEV160	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Ictaluridae</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	Cat Fish	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV100-15	BOLD:AAA6831
BLGEV152	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Ictaluridae</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	Cat Fish	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV092-15	BOLD:AAA6831
BLGEV153	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Ictaluridae</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	Cat Fish	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV093-15	BOLD:AAA6831
BLGEV145	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Pseudopimelodidae</i>	<i>Lophiosilurus alexandri</i>	Pacamã	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV269-15	BOLD:AAE4855
BLGEV143	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Pseudopimelodidae</i>	<i>Lophiosilurus alexandri</i>	Pacamã	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV267-15	BOLD:AAE4855
BLGEV142	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Pseudopimelodidae</i>	<i>Lophiosilurus alexandri</i>	Pacamã	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV266-15	BOLD:AAE4855
BLGEV146	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Pseudopimelodidae</i>	<i>Lophiosilurus alexandri</i>	Pacamã	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV270-15	BOLD:AAE4855
BLGEV144	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Pseudopimelodidae</i>	<i>Lophiosilurus alexandri</i>	Pacamã	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV268-15	BOLD:AAE4855
BLGEV245	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Serrasalmidae</i>	<i>Metynnis maculatus</i>	Pacu Prata	Muriaé / MG	out/14	BLGEV205-15	BOLD:AAE7443
BLGEV248	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Serrasalmidae</i>	<i>Metynnis maculatus</i>	Pacu Prata	Muriaé / MG	out/14	BLGEV208-15	BOLD:AAE7443
BLGEV249	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Serrasalmidae</i>	<i>Metynnis maculatus</i>	Pacu Prata	Muriaé / MG	out/14	BLGEV209-15	BOLD:AAE7443
BLGEV246	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Serrasalmidae</i>	<i>Metynnis maculatus</i>	Pacu Prata	Muriaé / MG	out/14	BLGEV206-15	BOLD:AAE7443
BLGEV247	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Serrasalmidae</i>	<i>Metynnis maculatus</i>	Pacu Prata	Muriaé / MG	out/14	BLGEV207-15	BOLD:AAE7443
BLGEV281	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Microgeophagus altispinosus</i>	Microgeophagus	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV241-15	BOLD:AAX3907
BLGEV282	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Microgeophagus altispinosus</i>	Microgeophagus	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV242-15	BOLD:AAX3907
BLGEV284	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Microgeophagus altispinosus</i>	Microgeophagus	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV244-15	BOLD:AAX3907
BLGEV283	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Microgeophagus altispinosus</i>	Microgeophagus	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV243-15	BOLD:AAX3907
BLGEV280	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Microgeophagus altispinosus</i>	Microgeophagus	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV240-15	BOLD:AAX3907
BLGEV269	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Microgeophagus ramirezi</i>	Ramirezi	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV229-15	BOLD:AAD0746
BLGEV265	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Microgeophagus ramirezi</i>	Ramirezi	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV225-15	BOLD:AAD0746
BLGEV266	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Microgeophagus ramirezi</i>	Ramirezi	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV226-15	BOLD:AAD0746
BLGEV267	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Microgeophagus ramirezi</i>	Ramirezi	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV227-15	BOLD:AAD0746
BLGEV268	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Microgeophagus ramirezi</i>	Ramirezi	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV228-15	BOLD:AAD0746

BLGEV308	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cobitidae</i>	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Dojô	Muriaé / MG	out/14	BLGEV278-15	BOLD:AAA5527
BLGEV307	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cobitidae</i>	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Dojô	Muriaé / MG	out/14	BLGEV277-15	BOLD:AAA5528
BLGEV306	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cobitidae</i>	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Dojô	Muriaé / MG	out/14	BLGEV276-15	BOLD:AAA5529
BLGEV063	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cobitidae</i>	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Dojô	Muriaé / MG	out/14	BLGEV281-15	BOLD:AAA5530
BLGEV310	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cobitidae</i>	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Dojô	Muriaé / MG	out/14	BLGEV280-15	BOLD:AAA5531
BLGEV309	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cobitidae</i>	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Dojô	Muriaé / MG	out/14	BLGEV279-15	BOLD:AAA5532
BLGEV075	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia do Nilo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV049-15	BOLD:AAA6536
BLGEV092	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia do Nilo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV062-15	BOLD:AAA6537
BLGEV096	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia do Nilo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV066-15	BOLD:AAA6537
BLGEV095	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia do Nilo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV065-15	BOLD:AAA6537
BLGEV094	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia do Nilo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV064-15	BOLD:AAA6537
BLGEV093	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia do Nilo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV063-15	BOLD:AAA6537
BLGEV074	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia do Nilo	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV048-15	BOLD:AAA6537
BLGEV023	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Poecilia latipinna</i>	Molinesia Latipina	Muriaé / MG	out/14	BLGEV017-15	BOLD:AAD1756
BLGEV027	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Poecilia latipinna</i>	Molinesia Latipina	Muriaé / MG	out/14	BLGEV021-15	BOLD:AAD1756
BLGEV026	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Poecilia latipinna</i>	Molinesia Latipina	Muriaé / MG	out/14	BLGEV020-15	BOLD:AAD1756
BLGEV025	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Poecilia latipinna</i>	Molinesia Latipina	Muriaé / MG	out/14	BLGEV019-15	BOLD:AAD1756
BLGEV024	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Poecilia latipinna</i>	Molinesia Latipina	Muriaé / MG	out/14	BLGEV018-15	BOLD:AAD1756
BLGEV022	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Poecilia latipinna</i>	Molinesia Latipina	Muriaé / MG	out/14	BLGEV016-15	BOLD:AAD1756
BLGEV021	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Poecilia latipinna</i>	Molinesia Latipina	Muriaé / MG	out/14	BLGEV015-15	BOLD:AAD1756
BLGEV020	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Poecilia latipinna</i>	Molinesia Latipina	Muriaé / MG	out/14	BLGEV014-15	BOLD:AAD1756
BLGEV019	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Poecilia latipinna</i>	Molinesia Latipina	Muriaé / MG	out/14	BLGEV013-15	BOLD:AAD1756
BLGEV018	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Poecilia latipinna</i>	Molinesia Latipina	Muriaé / MG	out/14	BLGEV012-15	BOLD:AAD1756
BLGEV184	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Pterophyllum scalare</i>	Acará Bandeira	Muriaé / MG	out/14	BLGEV144-15	BOLD:ABX4647
BLGEV181	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Pterophyllum scalare</i>	Acará Bandeira	Muriaé / MG	out/14	BLGEV141-15	BOLD:ABX4647
BLGEV180	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Pterophyllum scalare</i>	Acará Bandeira	Muriaé / MG	out/14	BLGEV140-15	BOLD:ABX4647
BLGEV182	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Pterophyllum scalare</i>	Acará Bandeira	Muriaé / MG	out/14	BLGEV142-15	BOLD:ABX4647
BLGEV183	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Cichlidae</i>	<i>Pterophyllum scalare</i>	Acará Bandeira	Muriaé / MG	out/14	BLGEV143-15	BOLD:ABX4647
BLGEV197	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Loricariidae</i>	<i>Pterygoplichthys disjunctivus</i>	Cascudinho	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV157-15	BOLD:ACK1995
BLGEV196	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Loricariidae</i>	<i>Pterygoplichthys disjunctivus</i>	Cascudinho	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV156-15	BOLD:ACK1995

BLGEV199	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Loricariidae</i>	<i>Pterygoplichthys disjunctivus</i>	Cascudinho	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV159-15	BOLD:ACK1995
BLGEV195	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Loricariidae</i>	<i>Pterygoplichthys disjunctivus</i>	Cascudinho	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV155-15	BOLD:ACK1995
BLGEV198	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Loricariidae</i>	<i>Pterygoplichthys disjunctivus</i>	Cascudinho	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV158-15	BOLD:ACK1995
BLGEV077	<i>Actinopterygii</i>	<i>Siluriformes</i>	<i>Loricariidae</i>	<i>Pterygoplichthys disjunctivus</i>	Cascudinho	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV051-15	BOLD:ACK1995
BLGEV164	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Puntius nigrofasciatus</i>	Rubi Preto	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV124-15	BOLD:AAU2014
BLGEV163	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Puntius nigrofasciatus</i>	Rubi Preto	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV123-15	BOLD:AAU2014
BLGEV305	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Puntius nigrofasciatus</i>	Rubi Preto	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV265-15	BOLD:AAU2014
BLGEV162	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Puntius nigrofasciatus</i>	Rubi Preto	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV122-15	BOLD:AAU2014
BLGEV161	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Puntius nigrofasciatus</i>	Rubi Preto	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV121-15	BOLD:AAU2014
BLGEV178	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Puntius tetrazona</i>	Sumatra	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV138-15	BOLD:AAD9761
BLGEV177	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Puntius tetrazona</i>	Sumatra	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV137-15	BOLD:AAD9761
BLGEV176	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Puntius tetrazona</i>	Sumatra	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV136-15	BOLD:AAD9761
BLGEV175	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Puntius tetrazona</i>	Sumatra	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV135-15	BOLD:AAD9761
BLGEV179	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Puntius tetrazona</i>	Sumatra	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV139-15	BOLD:AAD9761
BLGEV222	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Serrasalminidae</i>	<i>Pygopristis denticulata</i>	Piranha Marapá	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV182-15	BOLD:AAC1084
BLGEV223	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Serrasalminidae</i>	<i>Pygopristis denticulata</i>	Piranha Marapá	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV183-15	BOLD:AAC1084
BLGEV224	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Serrasalminidae</i>	<i>Pygopristis denticulata</i>	Piranha Marapá	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV184-15	BOLD:AAC1084
BLGEV220	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Serrasalminidae</i>	<i>Pygopristis denticulata</i>	Piranha Marapá	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV180-15	BOLD:AAC1084
BLGEV221	<i>Actinopterygii</i>	<i>Characiformes</i>	<i>Serrasalminidae</i>	<i>Pygopristis denticulata</i>	Piranha Marapá	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV181-15	BOLD:AAC1084
BLGEV185	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Tanichthys albonubes</i>	Tanictis	Muriaé / MG	out/14	BLGEV145-15	BOLD:AAV7040
BLGEV295	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Tanichthys albonubes</i>	Tanictis	Muriaé / MG	out/14	BLGEV255-15	BOLD:AAV7040
BLGEV189	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Tanichthys albonubes</i>	Tanictis	Muriaé / MG	out/14	BLGEV149-15	BOLD:AAV7040
BLGEV296	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Tanichthys albonubes</i>	Tanictis	Muriaé / MG	out/14	BLGEV256-15	BOLD:AAV7040
BLGEV001	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Tanichthys albonubes</i>	Tanictis	Muriaé / MG	out/14	BLGEV001-15	BOLD:AAV7040
BLGEV297	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Tanichthys albonubes</i>	Tanictis	Muriaé / MG	out/14	BLGEV257-15	BOLD:AAV7040
BLGEV298	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Tanichthys albonubes</i>	Tanictis	Muriaé / MG	out/14	BLGEV258-15	BOLD:AAV7040
BLGEV188	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Tanichthys albonubes</i>	Tanictis	Muriaé / MG	out/14	BLGEV148-15	BOLD:AAV7040
BLGEV187	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Tanichthys albonubes</i>	Tanictis	Muriaé / MG	out/14	BLGEV147-15	BOLD:AAV7040
BLGEV186	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Tanichthys albonubes</i>	Tanictis	Muriaé / MG	out/14	BLGEV146-15	BOLD:AAV7040
BLGEV299	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cypriniformes</i>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Tanichthys albonubes</i>	Tanictis	Muriaé / MG	out/14	BLGEV259-15	BOLD:AAV7040

BLGEV171	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Trichogaster leerii</i>	Lêri	Muriaé / MG	out/14	BLGEV131-15	BOLD:AAJ8448
BLGEV170	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Trichogaster leerii</i>	Lêri	Muriaé / MG	out/14	BLGEV130-15	BOLD:AAJ8448
BLGEV172	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Trichogaster leerii</i>	Lêri	Muriaé / MG	out/14	BLGEV132-15	BOLD:AAJ8448
BLGEV173	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Trichogaster leerii</i>	Lêri	Muriaé / MG	out/14	BLGEV133-15	BOLD:AAJ8448
BLGEV174	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Trichogaster leerii</i>	Lêri	Muriaé / MG	out/14	BLGEV134-15	BOLD:AAJ8448
BLGEV233	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Trichogaster lalius</i>	Colisa	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV193-15	BOLD:ACY4492
BLGEV231	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Trichogaster lalius</i>	Colisa	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV191-15	BOLD:ACY4493
BLGEV230	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Trichogaster lalius</i>	Colisa	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV190-15	BOLD:ACY4494
BLGEV234	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Trichogaster lalius</i>	Colisa	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV194-15	BOLD:ACY4495
BLGEV232	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Trichogaster lalius</i>	Colisa	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV192-15	BOLD:ACY4496
BLGEV169	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Trichogaster trichopterus</i>	Trichogaster Azul	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV129-15	BOLD:ACJ2507
BLGEV168	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Trichogaster trichopterus</i>	Trichogaster Azul	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV128-15	BOLD:ACJ2508
BLGEV167	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Trichogaster trichopterus</i>	Trichogaster Azul	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV127-15	BOLD:ACJ2509
BLGEV165	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Trichogaster trichopterus</i>	Trichogaster Azul	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV125-15	BOLD:ACJ2510
BLGEV166	<i>Actinopterygii</i>	<i>Perciformes</i>	<i>Osphronemidae</i>	<i>Trichogaster trichopterus</i>	Trichogaster Azul	Belo Horizonte / MG	fev/15	BLGEV126-15	BOLD:ACJ2511
BLGEV048	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV031-15	BOLD:AAB7239
BLGEV042	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV110-15	BOLD:AAB7239
BLGEV051	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV111-15	BOLD:AAB7239
BLGEV036	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV025-15	BOLD:AAB7239
BLGEV061	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV114-15	BOLD:AAB7239
BLGEV038	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV107-15	BOLD:AAB7239
BLGEV060	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV038-15	BOLD:AAB7239
BLGEV039	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV108-15	BOLD:AAB7239
BLGEV050	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV033-15	BOLD:AAB7239
BLGEV049	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV032-15	BOLD:AAB7239
BLGEV040	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV109-15	BOLD:AAB7239
BLGEV062	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV039-15	BOLD:AAB7239
BLGEV031	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV103-15	BOLD:AAB7239
BLGEV032	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV104-15	BOLD:AAB7239
BLGEV033	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus variatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV023-15	BOLD:AAB7240

BLGEV035	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus variatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV024-15	BOLD:AAB7240
BLGEV041	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus variatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV026-15	BOLD:AAB7240
BLGEV059	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus variatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV037-15	BOLD:AAB7240
BLGEV034	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus variatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV105-15	BOLD:AAB7240
BLGEV037	<i>Actinopterygii</i>	<i>Cyprinodontiformes</i>	<i>Poeciliidae</i>	<i>Xiphophorus variatus</i>	Platy	Muriaé / MG	out/14	BLGEV106-15	BOLD:AAB7240

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo apoia a adequação da abordagem do DNA *Barcode* em discriminar e identificar sem ambiguidade espécies de peixes ornamentais. Os padrões de divergência do COI combinaram-se com consistência às espécies reconhecidas pelas características morfológicas. Para os propósitos do *consortium for the Barcode of Life*, quanto mais completa for a biblioteca referência de sequências de DNA *Barcode*, mais eficiente e útil ela será. Assim, este tipo de contribuição é importante para consolidar o DNA *Barcode* como uma ferramenta global de identificação da biodiversidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDERTON, D. *Encyclopedia of Aquarium & Pond Fish*. Dorling Kindersley Limited. London: 2008. p.400.

APRIL, J.; MAYDEN, R. L.; HANNER, R. H.; BERNATCHEZ, L. Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 108. p.10602-10607. 2011.

BALAKRISHNAN, R. Species concepts, species boundaries and species identification: a view from the tropics. *Syst. Bio.*, v. 54, n. 4, p. 689-93,. 2005

BARBUTO, M.; GALIMBERTI, A.; FERRI, E. et al. M. DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of "palombo" (*Mustelus* spp.). *Food Res. Int.*, v. 43, n. 1, p. 376-381, 2011.

BARRETT, R. D. H.; HEBERT, P. D. N. Identifying spiders through DNA barcodes. *Can. J. Zoo.*, v.83 p. 481-491, 2005

BECKER, S.; HANNER, R.; STEINKE, D. Five years of FISH-BOL: brief status report. *Mitochondrial DNA*. v.22, p.3-9, 2011.

BEGEROW, D.; NILSSON, H.; UNTERSEHER, M.; MAIER, W. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Apl. M. Biotec.*, v. 87, n. 1, p. 99-108, 2010.

BOLD, Barcode of Life Data Systems. Disponível em <www.barcodinglife.org> Acessado: 11 de janeiro. 2016

CARVALHO, D. C.; LEAL; C. G.; POMPEU, P. S. et al. Aplicações da técnica de identificação genética - DNA Barcode - nos peixes da bacia do rio São Francisco. *Bol. Soc. Bras. Ictio.*, n.104, 2011.

CARVALHO, M.R.; BOCKMANN, F.A.; AMORIM, D.S. et al. Revisiting the taxonomic impediment. *Science*, v. 307, p.e5708, 2005.

COLLINS R.A.; ARMSTRONG K.F.; MEIER R.; YI, Y. et al. Barcoding and border biosecurity: Identifying cyprinid fishes in the aquarium trade. *PLoS ONE*, v.7, p.e28381, 2012.

DYKMAN, M. The Environmental and Economic Benefits of Eco-Certification within the Ornamental Fish Trade. *IJTEF*, v.3, n.1, 2012.

FREITAS, M.O. Pesca artesanal e biologia reprodutiva do ariocó *Lutjanus synagris* (*Lutjanidae*) no Banco dos Abrolhos. 2009. 44f. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus.

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. 2012. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/topic/13611/en>. Acessado em: 11 jan 2016.

HAJIBABAEI, M.; SINGER, G. A.; HEBERT, P. D.; HICKEY, D. A. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet.*, v. 23, n. 4, p. 167-72, 2007.

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

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. sci.*, v. 270, p. 96-99, 2003b.

HENNIG, W. *Phylogenetic Systematics*. Illinois: URBANA, 1966, 500p.

HOLMES, B.H.; STEINKE, D.; WARD, R.D. Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. *Fish. Res.*, v. 95, p. 280-288, 2009.

HOPKINS, G.W. e FRECKLETON, R.P. Declines in the numbers of amateurs and professional taxonomists: implications for conservation. *Animal Conservation*, v. 5, p. 245-249, 2012.

HUANG, D.; MEIER, R.; TODD, P. A.; CHOU, L. M. Slow mitochondrial COI sequence evolution at the base of the metazoan tree and its implications for DNA barcoding. *J. Mol. Evol.*, v. 66, n. 2, p. 167-74, 2012.

HUBERT, N.; HANNER, R.; HOLM, E. et al. Identifying canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoS ONE*, v. 3, p. e2490, 2008.

IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2008. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/publicadas/operacao-combate-traffic-internacional-de-alevinos-de-arua-na-amazonia>. Acesso dia: 08 de mar 2016.

MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R. P. et al. *Neotropical ichthyology: An overview editors. Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2011, p 1-11.

MANWELL, C.; BAKER, C.M. A sibling species of sea cucumber discovered by starch gel electrophoresis. *Com. B. Physi.*, v.10, p. 39-53, 1963.

MAY, R. Tropical arthropod species, more or less? *Science*, v.329, p.41-42, 2010.

MAY, R. Why worry about how many species and their loss? *PLoS Bio.*, v. 9, n. 8, p. e1001130, 2011.

MCCUSKER, M.R.; DENTI, D.; VAN GUELPEN, L. Barcoding Atlantic Canada's commonly encountered marine fishes. *Mol Ecol Resour.*, v. 13, p. 177–188. 2013.

MEIER, R.; SHIYANG, K.; VAIDYA, G.; NIG, P.K.L. DNA barcoding and taxonomy in diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Syst. Bio.*, v. 55, n. 5, p. 715-728, 2006.

MEYER, C.P.; PAULAY, G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Bio.*, v. 3, n. 12, p. e422, 2005.

NOTTINGHAM, M.C.; BARROS, G.M.L. GT Espécies Invasoras. IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis Diretoria de Fauna e Recursos Pesqueiros, 2006. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/processos/6333F3D1/POrnamentaisV2BaseGT.pdf> . Acessado em 11 jan. 2016.

MPA, Ministério da Pesca e Aquicultura, 2015. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/component/content/article?id=457:agenda-semoc-100412>. Acessado em :11 jan 2016.

OLIVEIRA, M.A.R. *Comércio de Peixes Ornamentais na Cidade de Porto Alegre, RS*. 2012 Trabalho de Conclusão de Curso Pós-Graduação Latu Sensu, (Especialização em

Diversidade e Conservação da Fauna) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PADIAL, J.M.; MIRALLES, A.; DE LA RIVA, I.; VENCES, M. The integrative future of taxonomy. *Fron. Zoo.*, v. 7, n. 16, 2010.

PADRONE, J.M.B. *O comercio ilegal de Animais Silvestres: Avaliação da Questão Ambiental no estado do Rio de Janeiro*. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. p.115-119.

IBAMA, 2014. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/phocadownload/recursos_pesqueiros/diagnostico_completo.pdf. Acessado em 11 jan. 2016.

PUCKRIDGE, M.; ANDREAKIS, N.; APPLEYARD, S.; WARD, R.D. Cryptic diversity in flathead fishes (Scorpaeniformes: Platycephalidae) across the Indo-West Pacific uncovered by DNA barcoding. *Mol. Ecol. Resour.*, v.13, p.32-42, 2013.

PULLANDRE, N.; MACPHERSON, E.; LAMBOURDIÈRE, J. et al. Barcoding type specimens helps to identify synonyms and an unnamed new species in Eumunida - Smith, 1883 (Decapoda: Eumunidae). *Inv. Sys.* v. 25, n. 4, p. 322, 2011.

RIBEIRO, F.A.S.; LIMA, M.T.; FERNANDES, J.B.K. Panorama mundial no mercado de peixes ornamentais. *Pan. da Aqui.*, p.32-37, 2008.

SAVAGE, J. M. Systematics and the biodiversity crisis. *Bio Sci.*, v. 45, n. 10, p. 673-679, 1995.

SONG, H.; BUHAY, J. E.; WHITING, M. F.; CRANDALL, K. A. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 105, n. 36, p. 13486-91, 2013.

STEINKE, D.; HANNER, R. The FISH-BOL collaborators' protocol. *Mitochondrial DNA*, v. 22; p 10-14, 2011.

STEINKE, D.; ZEMLAK, T.S.; BOUTILLIER, J.A.; HEBERT, P.D.N. DNA barcoding of Pacific Canada's fishes. *Mar. Biol.*, v. 156, n. 12, p. 2641-2647, 2009.

VALENTINI, A.; POMPANON, F.; TABERLET, P. DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol. Evol.*, v. 24, n. 2, p. 110-117, 2009.

WARD, R.D. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Mol. Ecol. Res.*, v. 9, n. 4, p. 1077-1085, 2009.

WARD, R.D.; ZEMLAK, T.S.; INNES, B.H.; LAST, P.R.; HEBERT, P.D. DNA barcoding Australia's fish species. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.*, v. 360, n. 1462, p. 1847-1857, 2005.

WHEELER, Q.D. Losing the plot: DNA “barcodes” and taxonomy. *Cladistics*, v.21, p.405-409, 2005.

WHITTINGTON, R.J.; CHONG, R. Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: The case for revised import risk analysis and management strategies. *Prev. Vet. Med.*, v.81, p. 92-97, 2007.

WHITWORTH, T.L.; DAWSON, R.D.; MAGALON, H.; BAUDRY, E. DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.*, v.274, p.1731-1739, 2012.

WIEMERS, M.; FIEDLER, K. Does the DNA barcoding gap exist? - a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *FRONT ZOOLOGICAL Journal.*, v. 4, p. 8, 2007.

WONG, L.L.; PEATMAN, E.; LU, J. et al. DNA barcoding of catfish: species authentication and phylogenetic assessment. *PLoS ONE*, v. 6, p. e17812, 2011.

ZHANG, J.; HANNER, R. Molecular approach to the identification of fish in the South China Sea. *PLoS ONE*, v. 7, p. e30621, 2012.

