

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

GABRIELA PERES DOS REIS SANTOS

Banco referencial molecular para a ictiofauna da bacia hidrográfica do Alto Paraná

UBERLÂNDIA

2024

GABRIELA PERES DOS REIS SANTOS

Banco referencial molecular para a ictiofauna da bacia hidrográfica do Alto Paraná

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biologia da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial
para obtenção do título de bacharel em
Ciências Biológicas

Orientador: Victor Alberto Tagliacollo

UBERLÂNDIA

2024

GABRIELA PERES DOS REIS SANTOS

Banco referencial molecular para a ictiofauna da bacia hidrográfica do Alto Paraná

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas

Uberlândia, 12 de abril de 2024

Banca Examinadora:

Victor Alberto Tagliacollo-Docente (UFU)

Vanessa Stefani Sul Moreira- Docente (UFU)

Junior Alberto Chuctaya Vasquez- Doutor (UFU)

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo estímulo, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais e a minha irmã que me apoiaram desde o início nesta jornada. Agradeço ao professor e amigo Victor pelo incentivo, motivação e orientação nesta caminhada acadêmica.

Aos amigos, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a este trabalho.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa concedida durante os anos do curso.

À instituição de ensino Universidade Federal de Uberlândia, essencial no meu processo de formação profissional, pela dedicação, e por tudo o que aprendi ao longo dos anos do curso.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota” (Madre Teresa de Calcuta)”

Sumário

RESUMO	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO	14
3. JUSTIFICATIVA	14
4. METODOLOGIA	15
4.1 Organização da lista de espécies bacia Alto Paraná	15
4.2 Coleta de sequências do GenBank	15
4.3 Estatística descritiva	15
REFERÊNCIAS	32

RESUMO

A ictiofauna dos ambientes dulcícolas neotropicais é a mais especiosa do planeta, incluindo mais de 6.200 espécies com aproximadamente 340 delas ocorrendo na bacia do Alto Paraná, no bioma Cerrado. Esta drenagem engloba rios da região centro-sul do Brasil e possui uma das ictiofaunas mais ameaçadas da América do Sul, devido em grande parte, à existência de barragens hidrelétricas que isolam populações de múltiplos organismos. Dado algumas exceções, as distribuições dos peixes no Alto Paraná são pobremente delimitadas, o que dificulta ações efetivas e políticas públicas de conservação dos sistemas aquáticos do Cerrado. Técnicas de sequenciamento de DNA ambiental têm se mostrado promissoras na identificação das espécies, com levantamentos precisos e sem a necessidade de uma abordagem invasiva. Tais técnicas utilizam o material genético presente no ambiente, especialmente o DNA mitocondrial e o sequenciamento de nova geração (NGS) para inventariar comunidades locais. A precisão das identificações de sequências de DNA ambiental depende da organização de um banco referencial genômico confiável, onde as mesmas possam ser comparadas com o DNA *barcoding* oriundas de espécimes testemunhos depositados em coleções científicas. Entretanto, não existe atualmente um banco referencial de sequências de DNA suficientemente abrangente para os peixes da bacia do Alto Paraná que possibilite a identificação da ictiofauna residente e transiente dessa região. Devido a essa problemática, este estudo organizou uma lista com sequências depositadas em repositórios como o *GenBank* e *BOLD* para o gene COI, considerando os indivíduos amostrados na bacia. Além disso, será organizado um banco referencial inédito composto por genomas mitocondriais completos para facilitar a identificação de sequências provenientes de outros marcadores mitocondriais, portanto contribuindo para viabilizar estudos sobre conservação da ictiofauna e seus padrões espaciais na bacia do Alto Paraná.

Palavras-chave: banco genômico, peixes, bacia do Alto rio Paraná, eDNA

Abstract:

The ichthyofauna of neotropical freshwater environments is the most specious on the planet, including more than 6,200 species, with approximately 340 of them occurring in the Alto Paraná basin, in the Cerrado biome. This drainage encompasses rivers in the south-central region of Brazil and has one of the most endangered ichthyofaunas in South America, largely due to the existence of hydroelectric dams that isolate populations of multiple organisms. Given some exceptions, fish distributions in the Upper Paraná are poorly defined, which makes effective actions and public policies for the conservation of the Cerrado aquatic systems difficult. Environmental DNA sequencing techniques have shown promise in identifying species, with accurate surveys and without the need for an invasive approach. Such techniques use the genetic material present in the environment, especially mitochondrial DNA and next generation sequencing (NGS) to inventory local communities. The accuracy of identification of environmental DNA sequences depends on the organization of a reliable genomic reference bank, where they can be compared with DNA barcoding from test specimens deposited in scientific collections. However, there is currently no sufficiently comprehensive reference bank of DNA sequences for fish in the Upper Paraná Basin to enable the identification of resident and transient ichthyofauna in this region. Due to this problem, this study will organize a list with sequences deposited in repositories such as GenBank and BOLD for the COI gene, considering the individuals sampled in the basin. In addition, an unpublished reference bank composed of complete mitochondrial genomes will be organized to facilitate the identification of sequences from other mitochondrial markers, thus contributing to enable studies on the conservation of ichthyofauna and their spatial patterns in the Upper Paraná basin.

Keywords: reference bank, fish, Alto Paraná, eDNA

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, com uma área equivalente a 2 milhões de quilômetros quadrados atrás em extensão apenas do bioma Amazônico (RIBEIRO; WALTER, 1998; SILVA NETO et al., 2016). Seu território abrange nascentes de bacias hidrográficas da América do Sul favorecendo a biodiversidade e ampliando o potencial aquífero do domínio Cerrado. Entre as fitofisionomias do Cerrado estão as veredas, áreas de nascentes derivadas de lençóis freáticos, caracterizadas por drenagem profusa que permanece inundada durante o ano todo, até mesmo em estações secas. As veredas estão localizadas próximas a nascentes, em áreas com inclinação branda formando vales e regiões côncavas que acompanham uma linha de escoamento contínuo com muitos quilômetros de extensão, antes da junção dos canais de drenagem a mata de galeria (RIBEIRO; WALTER, 1998; DA SILVA; LACHER, 2020). O solo das veredas é do tipo hidromórfico com uma maciça camada de matéria orgânica. Sua extensão abrange todo o domínio Cerrado, principalmente o Triângulo Mineiro e as regiões Norte e Noroeste do estado de Minas Gerais. A concentração aquífera das veredas está distribuída nas bacias dos rios São Francisco, Paranaíba e Grande (SCOLFORO; CARVALHO, 2006), os dois últimos representando tributários da bacia do Alto do Paraná. A importância ecológica das veredas verifica-se por abrigar espécies endêmicas, por abastecer três bacias hidrográficas do Brasil e por ser local de abrigo, alimentação e reprodução para animais e plantas do Cerrado, principalmente na estação seca, atuando na manutenção e sobrevivência das espécies do bioma (BASTOS; FERREIRA, 2010). Além disso, sua formação jusante cria corredores naturais permitindo a migração de organismos aquáticos contribuindo para a diversificação local (BASTOS; FERREIRA, 2010).

Estimativas sobre a ictiofauna de água doce na região Neotropical indicam que mais 6.200 espécies habitam essa faixa de extensão, abrigando a maior diversidade de peixes dulcícolas do planeta (REIS et al., 2016; ALBERT; TAGLIACOLLO; DAGOSTA, 2020). No último decênio aproximadamente 100 espécies foram descritas (REIS et al., 2016) com esse avanço progressivo as estimativas finais sobre diversidade da ictiofauna neotropical giram em torno de 9.000 (REIS et al., 2016). A diversidade é maior em altitudes abaixo de 250m, com a taxa de endemismo maior em terras altas como Planalto Central Mexicano e florestas subpolares da Argentina (ALBERT; TAGLIACOLLO; DAGOSTA, 2020). A ictiofauna da

região do Alto Paraná possui aproximadamente 300 espécies descritas e outras em fase de caracterização (LANGEANI et al., 2007).

O rio Paraná é o segundo maior da América do Sul (AGOSTINHO et al., 1995), grande parte permanece ocupado pelas populações urbanas e para fins de atividades comerciais. Estima-se que seja rico em termos de biodiversidade, principalmente por conter habitats diferentes ao longo dos trechos de distribuição da bacia do Alto Paraná (AGOSTINHO et al., 1995; AGOSTINHO et al., 2007; AGOSTINHO et al., 2018). As espécies mais ameaçadas são as espécies anuais (ex. rivulídeos e poecilídeos)(TAGLIACOLLO et al., 2021). Com a intensificação da destruição do Cerrado para conversão em áreas de pastagens, lavouras e construções urbanas, ainda são poucos os estudos que avaliaram os efeitos de ações antropogênicas na diversidade das veredas, principalmente nas populações aquáticas.

Os métodos tradicionais de coletas de peixes envolvem coletas manuais de adultos, jovens, larvas e ovos (ALVES et al.,2021). Em geral, a metodologia é baseada na captura e observação de indivíduos, pelo uso de armadilhas, pesca convencional, pesca elétrica, hidroacústica e redes (ALVES et al.,2021). Tais métodos convencionais de coleta fornecem informações parciais devido a dificuldades de amostragem (EVANS; LAMBERTI, 2018). Devido a necessidade de aprimorar o monitoramento dos peixes para a preservação dos ecossistemas, estão surgindo novas metodologias de amostragem sem a utilização de métodos invasivos de captura, que apresentam alta sensibilidade quando comparada a demais técnicas e de baixo custo (EVANS; LAMBERTI, 2018). Entre os métodos atuais usados como uma alternativa viável para avaliação de comunidades e detecção de peixes está a técnica baseada em DNA ambiental ou eDNA aliado ao sequenciamento de última geração (CRISTESCU; HEBERT, 2018; KUMAR; EBLE; GAITHER, 2020).

O eDNA corresponde ao material genético que provém de amostras ambientais como solo, água e ar (BARNES; TURNER, 2016), os quais são derivados de fontes variáveis como secreções corporais (por exemplo, gametas, fezes, urina, escamas) e/ou organismos em decomposição (BARNES; TURNER, 2016). Aplicações atuais com o uso de eDNA para o manejo e conservação de ecossistemas aquáticos utilizando uma abordagem menos invasiva tem favorecido a criação de ferramentas que auxiliam na conservação e manutenção da fauna aquática (GLEESON, 2021). Sua alta sensibilidade de detecção, baixos custos financeiros e menor demanda temporal, apresentam uma alternativa promissora para o levantamento e mapeamento da diversidade (STEWART, 2019). A utilização do material genético ambiental

possibilita o monitoramento espaço-temporal de comunidades de peixes e a determinação da riqueza de espécies em um dado local. Ademais fornece dados relevantes sobre influência antropogênica nos habitats através da determinação da diversidade nos ecossistemas aquáticos (MIYA, 2022).

Nos primeiros estudos baseados em eDNA para vertebrados aquáticos, a técnica do *barcoding* foi utilizado na determinação de espécies-alvo obtida de uma amostra sequenciada a partir de marcadores padrões como COI e/ou 12S (DEINER et al., 2017, p. 201; QURASHIA et al., 2015). Com o avanço do sequenciamento de última geração (NGS) novas técnicas foram empregadas em análises de múltiplas espécies, amplificadas e sequenciadas em plataformas que permitem a análise simultânea de milhares de sequências (DEINER et al., 2017, p. 201; MEHINTO et al., 2012). Esse avanço tornou possível a análise de uma grande quantidade de dados em uma mesma amostra ambiental. O *metabarcoding* pode ser utilizado como uma ferramenta de apoio para dados obtidos por métodos convencionais, auxiliando na detecção de espécies e na determinação da distribuição espaço-temporal (DEINER et al., 2017, p. 201; BESSEY et al., 2020).

A eficiência de estudos baseados em eDNA foi testada em rios e riachos da Guiana Francesa com o objetivo de descrever a diversidade de peixes de água doce nessa região e obter dados sobre as comunidades aquáticas (CILLEROS et al., 2019). Foram aplicadas as técnicas baseadas em DNA ambiental e métodos tradicionais de captura e os resultados indicam que a estimativa da diversidade pelos dois métodos possui similaridades. Entretanto a discriminação da ictiofauna dos rios e riachos em análise foi maior em relação aos métodos tradicionais (CILLEROS et al., 2019). Estudos com o objetivo de detecção da presença de *Gambusia affinis* na Nova Zelândia, com base em DNA ambiental foram promissores, comprovando sua eficácia na detecção de espécies invasoras (BANKS et al., 2021). Outra abordagem eficiente baseada em eDNA, foi realizada no Canadá, com base no monitoramento de espécies invasoras. Nesse estudo pode-se observar a sensibilidade dessa técnica na detecção de organismos aquáticos (ROY et al., 2018). No Brasil, foi avaliada o potencial do eDNA como parâmetro de distribuição de peixes dulcícolas na bacia do Rio Jequitinhonha, foram recuperadas 252 unidades taxonômicas operacionais moleculares (MOTUs) e 34 espécies de peixes, sendo que o perfil da ictiofauna local corresponde a espécies não registradas, espécies endêmicas e introduzidas (SALES et al., 2021).

A construção de um banco referencial genômico é fundamental para possibilitar a atualização da lista de espécies, além de permitir a demarcação de áreas de ocorrência das espécies identificadas, que podem auxiliar estudos de monitoramento e conservação. Com um banco de dados referencial elaborado podemos comparar em termos de diversidade, as coletas mais antigas com as amostras coletadas recentemente com a aplicação da metodologia baseada em eDNA, de modo a identificar padrões entre as mesmas e organizá-las de acordo com os grupos taxonômicos (ex. família, gênero, entre outros). Poucos dados abordam as diferenças moleculares entre espécies presentes na bacia, por isso a construção de um banco de dados genômico faz-se necessário. Para realizar o levantamento de espécies presentes nesse habitat, precisamos de dados já referenciados em coleções científicas para comparar com os dados sequenciados a partir dos marcadores mitocondriais específicos.

2. OBJETIVO

Este estudo organiza um banco referencial de DNA *barcoding* para o gene COI das espécies de peixes da bacia do Alto Paraná para viabilizar os estudos de conservação dos ambientes dulcícolas do bioma Cerrado, especialmente as veredas, através do DNA ambiental. Portanto, o projeto possibilitará estudos sobre a conservação e biomonitoramento da ictiofauna das veredas, além de permitir a aplicação do DNA ambiental em outras áreas do Triângulo Mineiro para estimular medidas preventivas evitando a perda de biodiversidade aquática.

3. JUSTIFICATIVA

O monitoramento contínuo dos peixes residentes na bacia do Alto Paraná é importante para conservar os recursos pesqueiros para as gerações futuras, assim como identificar as microrregiões do Alto Paraná que possuam poucas informações. Com esses resultados, poderá ser apontado quais regiões necessitam de coletas prioritárias nas atividades de campo e quais espécies não possuem sequências marcadas a partir do gene COI e, portanto, precisarão ser sequenciadas para posteriormente serem inseridas em repositórios de dados como BOLD e *GenBank*.

4. METODOLOGIA

4.1 Organização da lista de espécies bacia Alto Paraná

Inicialmente atualizamos o banco de dados com identificações taxonômicas das espécies mais recentemente descritas ou reconhecidas como nativas da bacia do Alto rio Paraná. Essa atualização foi realizada através da consulta de referências científicas disponíveis, publicações, catálogos online e análise de espécimes depositados em coleções científicas. Em casos específicos, contatamos especialistas em grupos taxonômicos mais complexos para confirmar a presença de algumas espécies na região.

4.2 Coleta de sequências do GenBank

Em seguida, buscamos atualizar os dados de sequências de referência do gene *barcoding* COI, disponíveis em repositórios públicos como o GenBank. Considerando a constante atualização desses repositórios, é possível que novas sequências tenham sido adicionadas desde a última consulta. Após analisar a lista das espécies que já tinham sequências de referência e aquelas que ainda careciam delas, identificamos os táxons com lacunas amostrais a serem preenchidas.

O GenBank é uma ferramenta valiosa para pesquisadores em genética e biologia molecular, oferecendo um vasto repositório de sequências de DNA e RNA. Para utilizá-lo de forma simples, comecei acessando o site do GenBank e utilizei a barra de busca para encontrar sequências específicas usando palavras-chave ou números de acesso. Assim pude visualizar registros completos de GenBank, que fornecem informações detalhadas sobre as sequências, incluindo anotações e referências bibliográficas. Além disso, é possível baixar sequências no formato FASTA para análise local ou utilizar ferramentas integradas como o BLAST para comparar sequências e encontrar regiões de similaridade.

4.3 Estatística descritiva

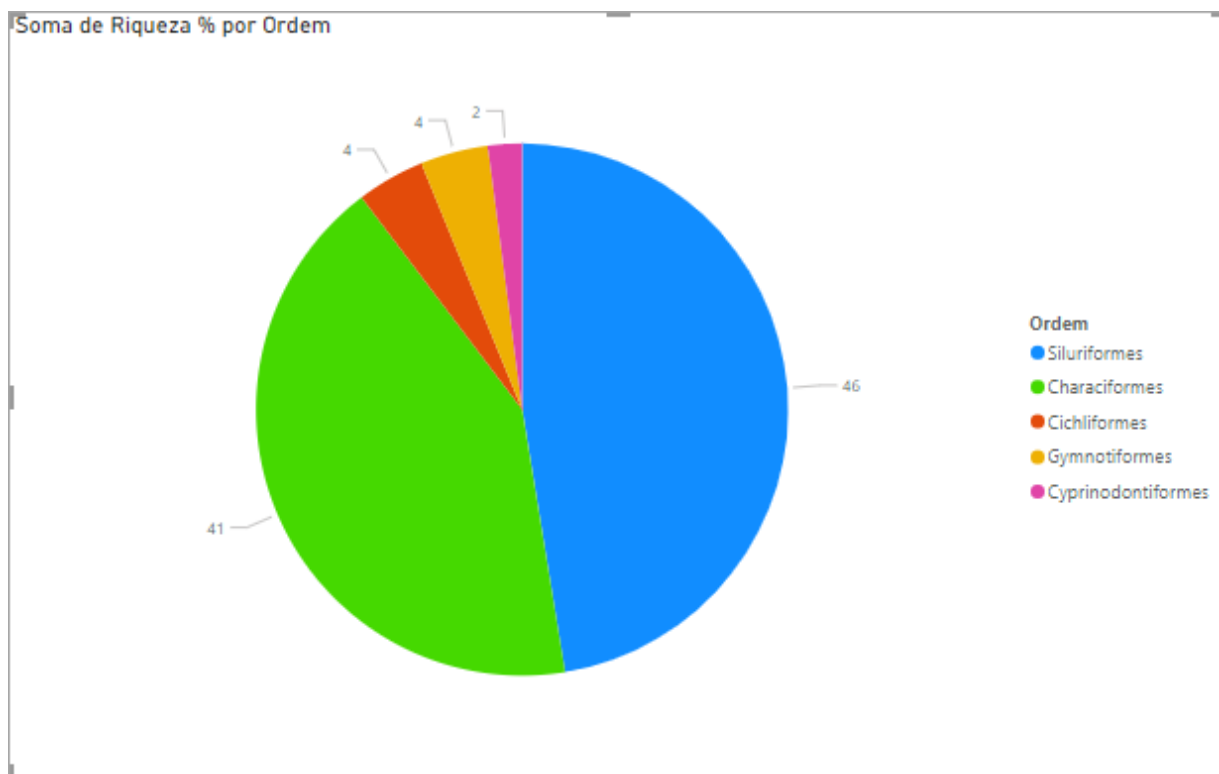
Na etapa final, conduzimos análises estatísticas para determinar as frequências de ocorrência das sequências do gene COI em diferentes níveis taxonômicos. Identificamos as ordens e famílias do Alto rio Paraná que careciam de informações sobre as comunidades de peixes.

5. RESULTADOS

5.1 - Riqueza de espécies alocadas nas principais ordens de peixes presentes na bacia do Alto Rio Paraná

Comparando os dados a respeito da riqueza por ordem, observa-se que a ordem dos Siluriformes é a mais vasta, seguida da ordem dos Characiformes, Gymnotiformes e demais ordens (Cichliformes e Cyprinodontiformes) com baixo valor representativo de riqueza (Figura 1). As três primeiras ordens mais ricas em diversidade correspondem a 91% das espécies presentes na bacia do Alto Paraná e as duas últimas ordens 6% da diversidade de espécies. Em relação a diversidade por ordem com o gene COI as ordens com maiores taxas de riqueza pertencem a ordem dos Siluriformes, Characiformes e Gymnotiformes, os demais (Cichliformes e Cyprinodontiformes) apresentam este marcador molecular em uma escala reduzida. Através da organização a tabela com os dados sobre a riqueza de espécies, observa-se que no total 141 espécies fazem parte da bacia do Alto Paraná e foram identificadas nessa região.

Figura 1 - Soma da riqueza por ordem de peixes na bacia do Alto Rio Paraná. O gráfico ilustra a distribuição percentual de espécies da bacia do Alto Paraná por ordens taxonômicas. As ordens mais

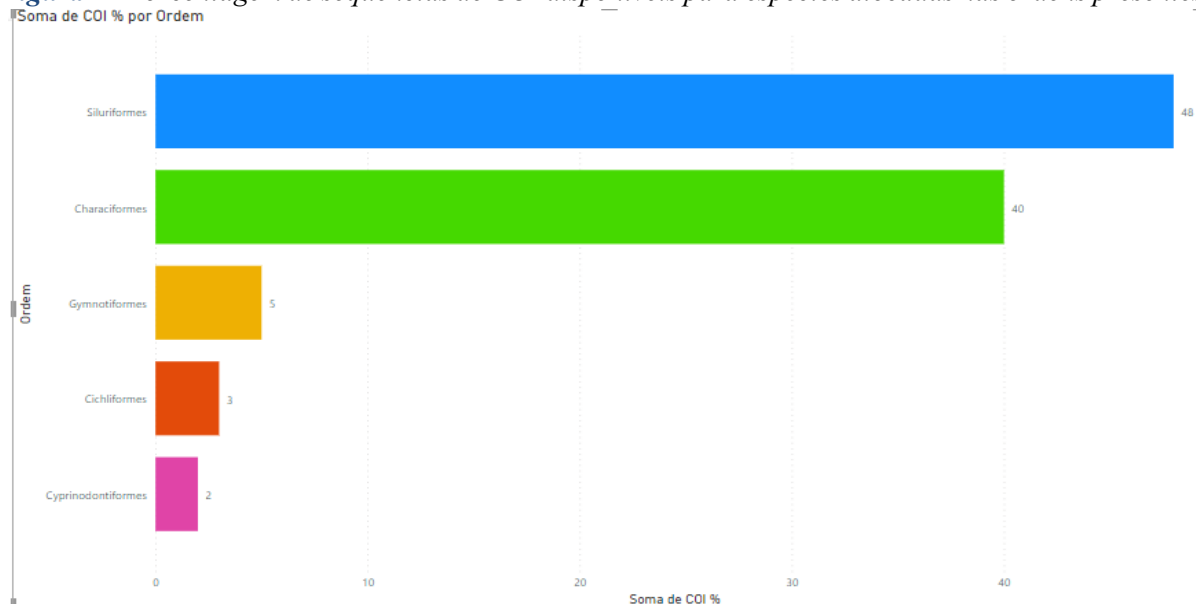


diversas correspondem: Siluriformes (azul) com 46%; Characiformes (verde) com 41%; Gymnotiformes (laranja) com 4% e demais ordens totalizando 6% do total.

5.2 - Riqueza das ordens de peixes com dados sequenciados na bacia do Alto Paraná

A Figura 2 apresenta os dados sobre a diversidade da ictiofauna na Bacia do Alto Rio Paraná, com uma subdivisão por ordem. Entre as ordens com mais espécies sequenciadas estão Characiformes com 40%, Siluriformes com 48% e Gymnotiformes com 5%. As demais ordens compreendem apenas 5% da diversidade de peixes da região.

Figura 2 - Porcentagem de sequências de COI disponíveis para espécies alocadas nas ordens presentes



na bacia do Alto Rio Paraná. As ordens mais espécies sequenciadas correspondem: Siluriformes (azul) com 48%; Characiformes (verde) com 40%; Gymnotiformes (laranja) com 5% e demais ordens totalizando 5% do total.

5.3 - Characiformes

5.3.1 - Riqueza de espécies de peixes Characiformes na bacia do Alto Rio Paraná

No grupo dos Characiformes, as famílias mais proeminentes foram Characidae 44% da riqueza, seguida por Crenuchidae, com 10,39%, e Anostomidae, com 9,09%. As outras famílias tiveram uma representatividade menor, totalizando cerca de 35% das espécies de Characiformes na ictiofauna da bacia (Figura 3).

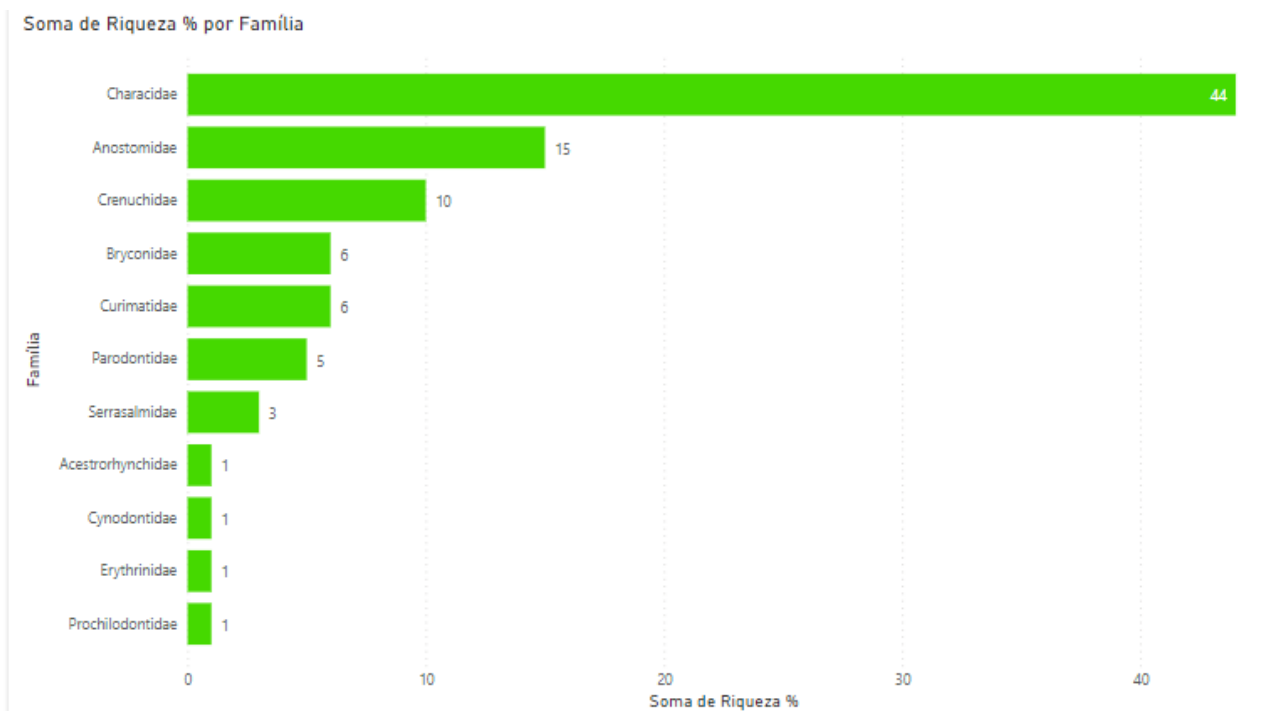


Figura 3 - Soma da riqueza de peixes Characiformes na bacia do Alto Rio Paraná. O gráfico ilustra a distribuição percentual de espécies da bacia do Alto Paraná por famílias taxonômicas. As famílias mais diversas correspondem: Characidae com 44%, Anostomidae com 15% e Crenuchidae com 10%. A soma da diversidade das demais família totalizam 24% do total.

5.3.2 - Riqueza das famílias de peixes Characiformes com dados sequenciados na bacia do Alto Paraná

Em relação a riqueza dessa família de actinoptérgeos, constituída de espécies como, lambaris, piranhas, entre outros; quando avaliada com o marcador COI, observa-se que a diversidade é maior nas seguintes famílias: Characidae (lambaris) 46%, Anostomidae (piabas) 12%, Crenuchidae (charutinho, mocinha) 10%, demais famílias correspondem a apenas 26% dos dados sequenciados nessa bacia.

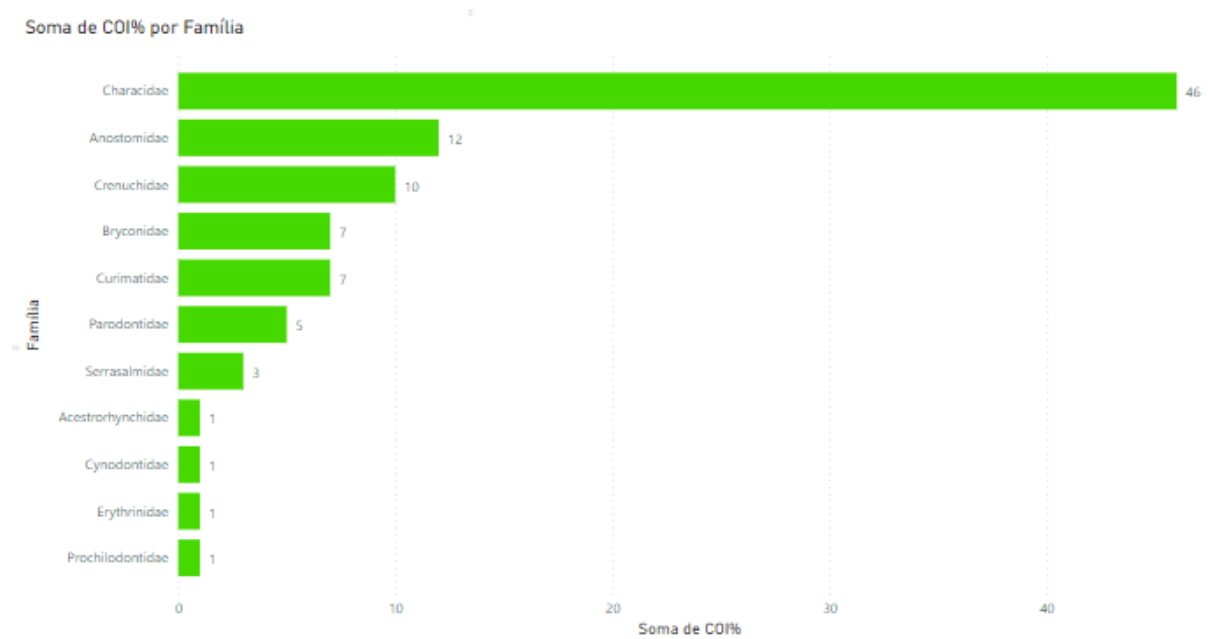


Figura 4. - Porcentagem de sequências de COI disponíveis para espécies alocadas nas famílias de Characiformes. As famílias com mais espécies sequenciadas correspondem: Characidae com 46%; Anostomidae com 12%; Crenuchidae com 10% e demais ordens totalizando 26% do total.

5.4 - Siluriformes

5.4.1 - Riqueza de espécies de peixes Siluriformes na bacia do Alto Rio Paraná

Dentro da ordem dos Siluriformes, tipicamente conhecidos como a ordem dos peixes-gato, bagres ou cascudos. Nota-se que as famílias com maior porcentagem de riqueza pertencem a Loricariidae (família dos cascudos) 41%, Trichomycteridae (peixe-gato, cambeva) 17%, Heptapteridae (bagrinhos, mandi) 16%, demais famílias correspondem a 19% da diversidade de peixes dentro da bacia.

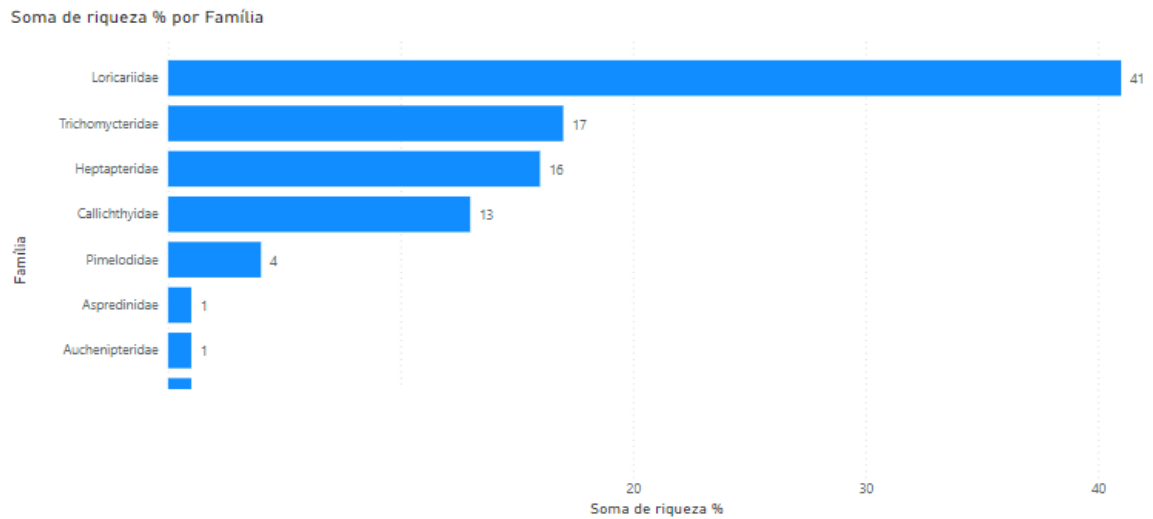


Figura 5 - Soma da riqueza de peixes Siluriformes na bacia do Alto Rio Paraná. As famílias com maior distribuição de riqueza são: Loricariidae 41%, seguido de Trichomycteridae 17%, seguido de Heptapteridae 16%, demais famílias correspondem a 19%.

5.4.2 - Riqueza das famílias de peixes Siluriformes com dados sequenciados na bacia do Alto Paraná

Dentro desse grupo de peixes neotropicais a riqueza de gene COI por família, como visto no gráfico exposto na figura 6, a representatividade é maior em Loricariidae 41%, seguido Trichomycteridae 17% e Heptapteridae 16%, demais famílias correspondem a 19%.

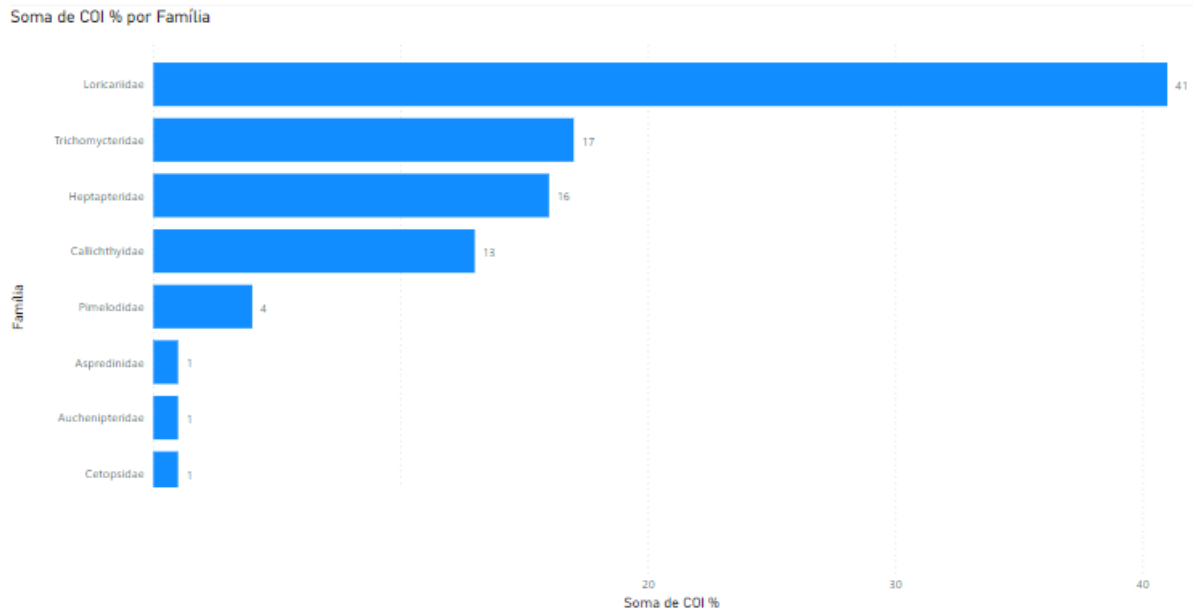


Figura. 6 - Porcentagem de seqüências de COI disponíveis para espécies alocadas nas famílias de Siluriformes. A família Loricariidae prevalece com a maior riqueza avaliada em 41%, seguido de Trichomycteridae 17% e Heptapteridae 16%.

5.5 - Gymnotiformes

5.5.1 - Riqueza de espécies de peixes Gymnotiformes na bacia do Alto Rio Paraná

Nessa ordem composta por indivíduos conhecidos popularmente como gimnotos ou sarapós. Observa-se no gráfico apresentado na figura 7, que a família com maior riqueza é a Gymnotidae (tuvira, sarapó) 57%, Sternopygidae (peixes-faca) 42%.

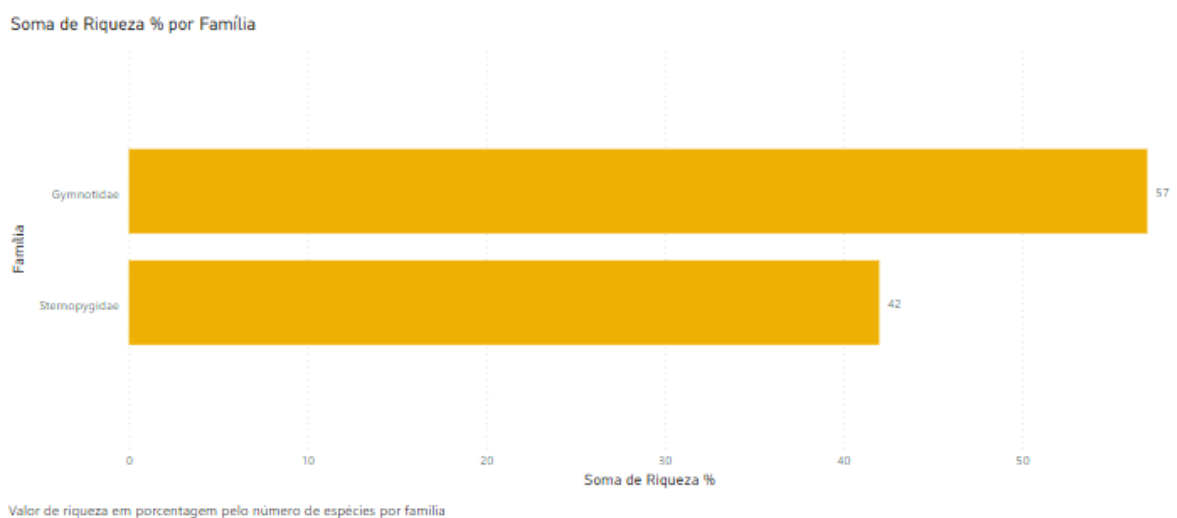


Figura 7 - Soma da riqueza de peixes Gymnotiformes na bacia do Alto Rio Paraná. A família com maior diversidade corresponde a Gymnotidae com 57% das espécies, seguido de Sternopygidae 42%.

5.5.2 - Riqueza das famílias de peixes Gymnotiformes com dados sequenciados na bacia do Alto Paraná

Nesse grupo, as famílias Gymnotidae e Sternopygidae, foram sequenciadas com o marcador COI, sendo que a primeira família apresenta uma riqueza maior com uma taxa de 57%, seguido de Sternopygidae 42%.

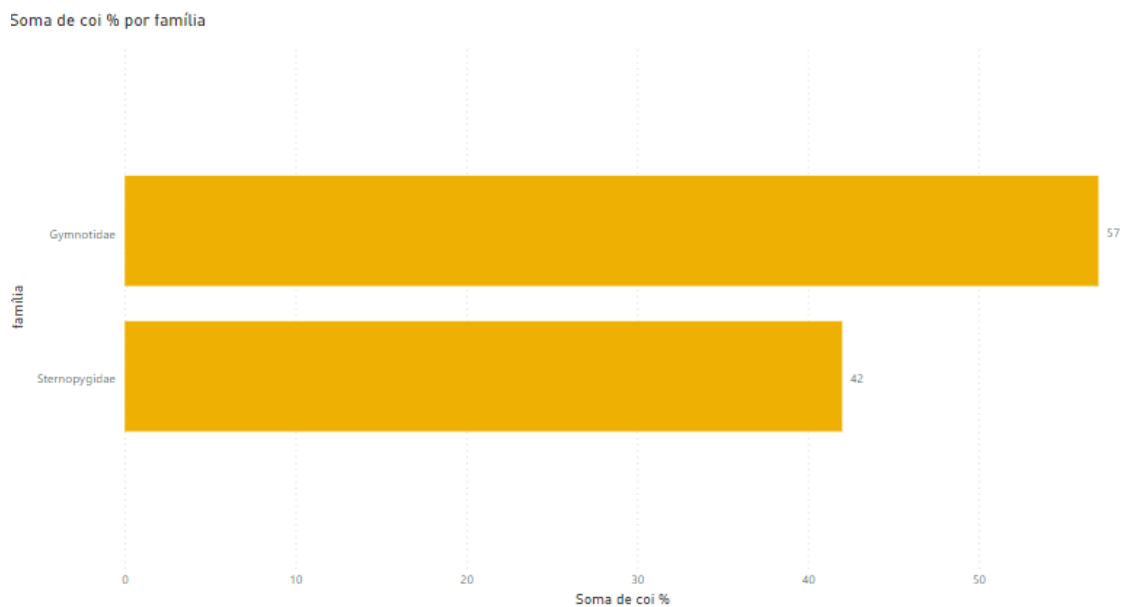


Figura 8 - Porcentagem de sequências de COI disponíveis para espécies alocadas nas famílias de Gymnotiformes. Na família Gymnotidae observa-se que a porcentagem equivale a 57%, enquanto a família Sternopygidae possui 42% das espécies.

5.6 - Cyprinodontiformes

5.6.1 - Riqueza de espécies de peixes Cyprinodontiformes na bacia do Alto Rio Paraná

Nesse grupo, estão os peixes popularmente conhecidos como guppy, barrigudinho, entre outros. A família Poecillidae (guppy) com 75% é a maior em riqueza quando comparada a Rivulidae 25%.

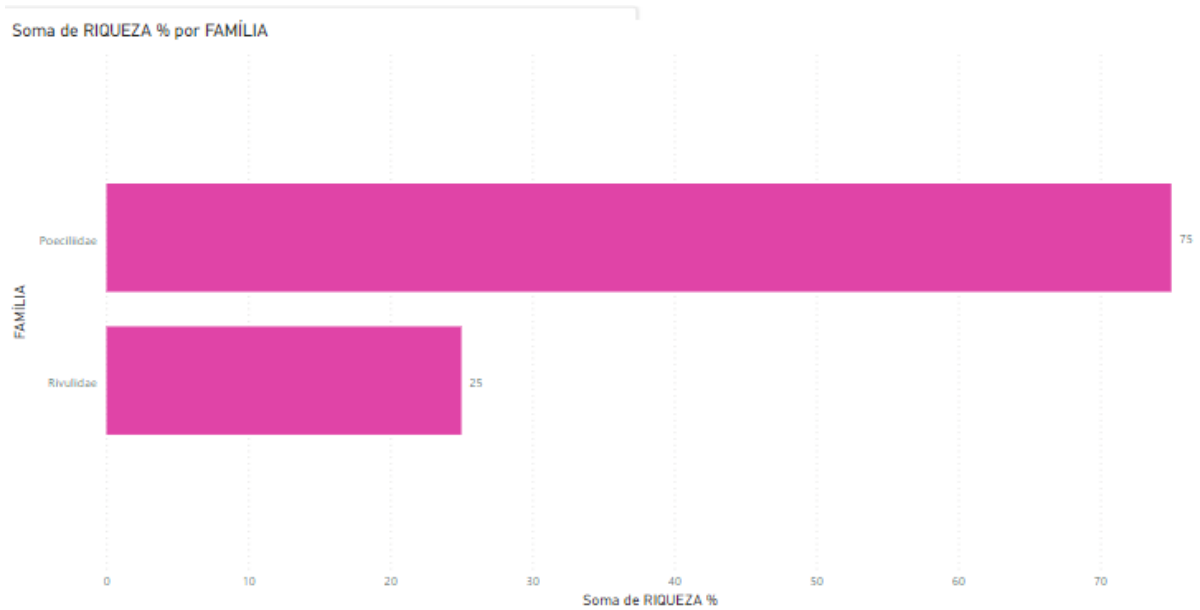


Figura 9 - Soma da riqueza de peixes Gymnotiformes na bacia do Alto Rio Paraná. A família mais rica em espécies é Poeciliidae 75%, seguido de Rivulidae com 25%.

5.6.2 - Riqueza das famílias de peixes Cyprinodontiformes com dados sequenciados na bacia do Alto Paraná

Quando comparado a riqueza com o marcador molecular COI, observa-se que a família que mais se destaca é a Poeciliidae com 75% das espécies, seguido de Rivulidae 25%.

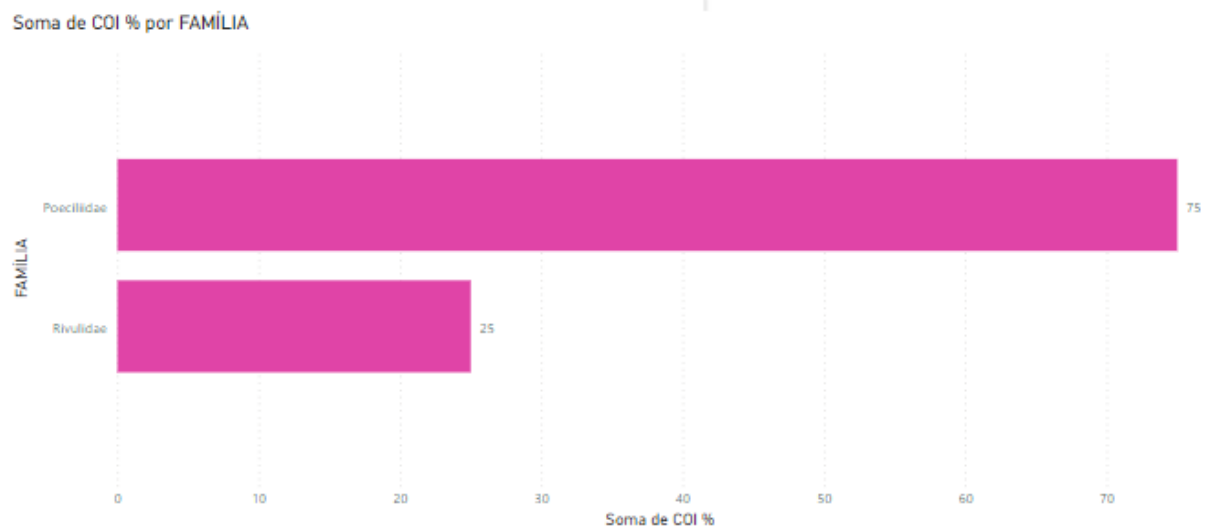


Figura 10 - Porcentagem de sequências de COI disponíveis para espécies alocadas nas famílias de Cyprinodontiformes. A família Poeciliidae tem a maior porcentagem de dados sequenciados, representando 75%, seguido de Rivulidae com 25% das espécies nessa bacia.

5.7 - Cichliformes

5.7.1 - Riqueza de espécies de peixes Cichliformes na bacia do Alto Rio Paraná

Nesse grupo observamos os indivíduos conhecidos popularmente como carás e joaninhas. A família com a maior riqueza é Cichlidae correspondendo a 100% da diversidade dentro da bacia.

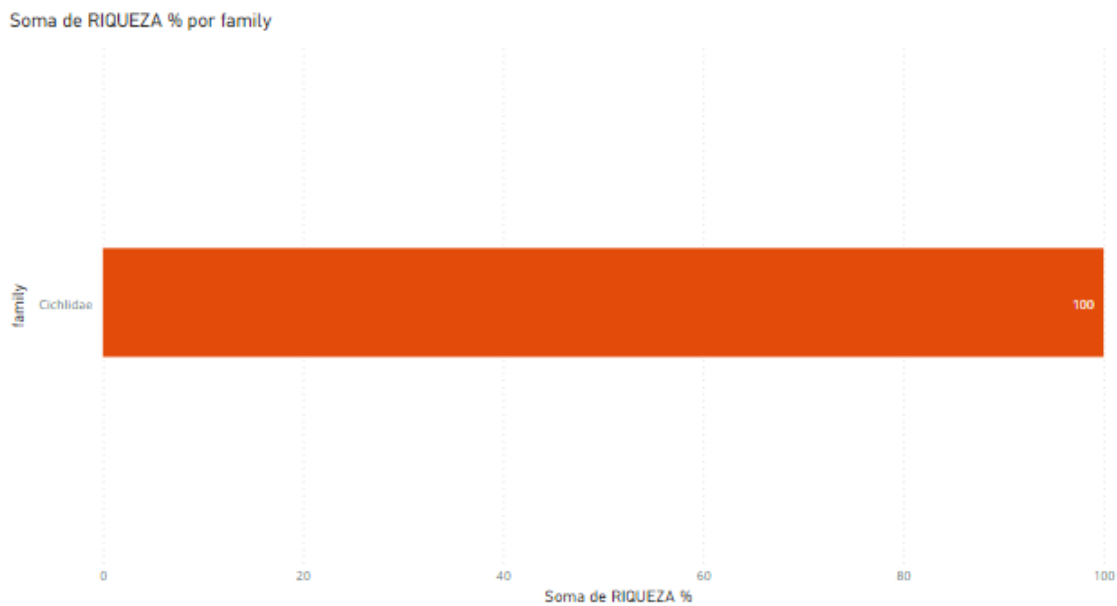


Figura 11 - Soma da riqueza de peixes Cichliformes na bacia do Alto Rio Paraná. Como ilustrado no gráfico, a família identificada corresponde a Cichlidae, que representa em porcentagem o total de espécies dessa família

5.7.2 - Riqueza das famílias de peixes Cichliformes com dados sequenciados na bacia do Alto Paraná

Ao compararmos a riqueza de Cichliformes na bacia, utilizando o marcador COI observa-se exclusivamente a presença da família Cichlidae, totalizando 100% da riqueza de espécies do grupo.

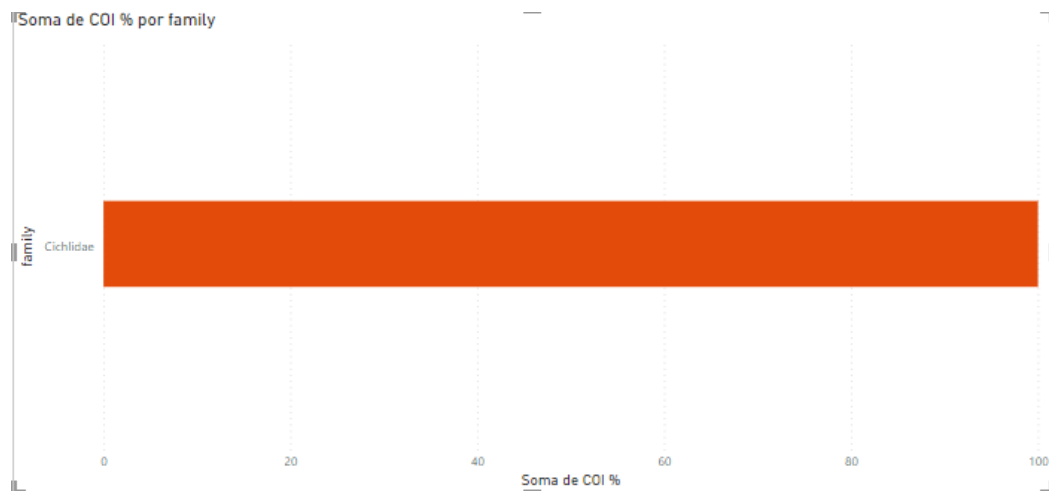


Figura 12 - Porcentagem de sequências de COI disponíveis para espécies alocadas nas famílias de Cyprinodontiformes. A riqueza de espécies está totalmente distribuída em uma única família, a Cichlidae com 100% da diversidade

6 - DISCUSSÃO

Com base nos resultados podemos inferir que a ordem dos Siluriformes é a mais rica em número de espécies com 66 das espécies (46,8%), seguido da ordem dos Characiformes com 58 das espécies (41,13%); Gymnotiformes com 7 espécies (4,97%) e outros totalizando 10 espécies (7,1%). Na ordem dos Siluriformes a família mais rica é a Loricariidae, seguido de Trichomycteridae e Heptaridae. Como observado em outras bacias neotropicais as ordens mais ricas são de Siluriformes e Characiformes (ALBERT; TAGLIACOLLO; DAGOSTA, 2020).

A riqueza de espécies da ordem Characiformes na bacia do Alto Paraná pode ser atribuída a vários fatores, como a diversidade de habitats (FERREIRA; CASATTI, 2006) diversas espécies de Characidae se ajustaram as condições da bacia do Alto Paraná (LIZAMA; AMBRÓSIO, 1999). A família Characidae é a mais significativa dessa bacia com 44% da diversidade, enquanto Anostomidae corresponde a 15%, seguido de Crenuchidae 10% e demais famílias com 24%.

A riqueza de espécies na ordem Gymnotiformes é representada pela família Gymnotidae com 57% e Sternopygidae com 42%. Observa-se que a diversidade de espécies de

Gymnotiformes na bacia do Alto Paraná ainda não é bem conhecida e mais levantamentos são necessários para entender a diversidade e a distribuição dessas espécies. Essa problemática se repete também em outras ordens com baixo valor representativo de riqueza na bacia, como é o caso das ordens Cyprinodontiformes e Cichliformes.

A análise molecular com o marcador COI reproduz o mesmo padrão de distribuição por famílias, indicando também que a adesão aos estudos moleculares para a detecção de espécies na bacia faz-se necessária.

Este trabalho teve como objetivo organizar a lista com dados moleculares sobre a diversidade de espécies por ordens e famílias. Com esse estudo foi possível identificar lacunas entre os grupos, como em Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Cichliformes, que são as que possuem poucos dados disponibilizados a respeito do padrão de diversidade. Espera-se que com este estudo possamos auxiliar o desenvolvimento de novos projetos para a recuperação de dados moleculares e o mapeamento da diversidade na bacia do Alto Paraná.

ANEXO – Planilha com dados de espécies da bacia do Alto Paraná para o marcador molecular COI

order	family	valid	ac number COI	voucher
Characiformes	Acestrorhynchidae	<i>Acestrorhynchus lacustris</i>	JN988661.1	LBPV 15173
Characiformes	Anostomidae	<i>Leporellus vittatus</i>	GU701943.1	LBP 31749
Characiformes	Anostomidae	<i>Leporinus amblyrhynchus</i>		
Characiformes	Anostomidae	<i>Leporinus friderici</i>	JN812980.1	Lefri16
Characiformes	Anostomidae	<i>Leporinus lacustris</i>	EU185565.1	LBP 857 9059
Characiformes	Anostomidae	<i>Leporinus tigrinus</i>	KF568997.1	L 176
Characiformes	Anostomidae	<i>Schizodon altoparanae</i>		
Characiformes	Anostomidae	<i>Schizodon borellii</i>	JN813011.1	Schbo08
Characiformes	Anostomidae	<i>Schizodon intermedius</i>	EU185605.1	LBP 3305 19845
Characiformes	Anostomidae	<i>Schizodon nasutus</i>	JN813018.1	Schana05
Characiformes	Bryconidae	<i>Brycon nattereri</i>	GU701946.1	LBP-37543
Characiformes	Bryconidae	<i>Brycon orbignyanus</i>	JN988764.1	LBPV-18007
Characiformes	Bryconidae	<i>Salminus brasiliensis</i>	GU701516.1	LBP-9033
Characiformes	Bryconidae	<i>Salminus hilarii</i>	JN813056.1	Sal-hi06
Characiformes	Characidae	<i>Astyanax trierythropterus</i>	JN988747.1	LBPV-26027
Characiformes	Characidae	<i>Hasemania crenuchoides</i>	JN988883.1	LBPV-33197
Characiformes	Characidae	<i>Hasemania hanseni</i>	MK464097.1	JCB121
Characiformes	Characidae	<i>Hyphessobrycon balbus</i>	JN988916.1	LBPV-44771
Characiformes	Characidae	<i>Hyphessobrycon bifasciatus</i>	JN988920.1	LBPV-22646
Characiformes	Characidae	<i>Moenkhausia bonita</i>	KU532799.1	BC-5
Characiformes	Characidae	<i>Moenkhausia forestii</i>	JN989039.1	LBPV-24755
Characiformes	Characidae	<i>Moenkhausia intermedia</i>	JN989045.1	LBPV-20180
Characiformes	Characidae	<i>Oligosarcus paranensis</i>	GU701611.1	LBP-34773
Characiformes	Characidae	<i>Oligosarcus pintoii</i>	GU701613.1	LBP-24852
Characiformes	Characidae	<i>Oligosarcus planaltinae</i>	MN119442.1	UNESP68455
Characiformes	Characidae	<i>Aphyocharax dentatus</i>	JN988681.1	LBPV-45712
Characiformes	Characidae	<i>Galeocharax gulo</i>	JN988862.1	LBPV-20164
Characiformes	Characidae	<i>Roeboides descalyvadensis</i>	JN989201.1	LBPV-43166
Characiformes	Characidae	<i>Cheirodon stenodon</i>	JN988794.1	LBPV-26119
Characiformes	Characidae	<i>Bryconamericus iheringii</i>	KM897554.1	PDtaq31
Characiformes	Characidae	<i>Glandulocauda melanopleura</i>	MG967569.1	LBP24542
Characiformes	Characidae	<i>Lophiobrycon weitzmani</i>	GU701436.1	LBP-38090
Characiformes	Characidae	<i>Mimagoniates microlepis</i>	GU701927.1	LBP-40279
Characiformes	Characidae	<i>Piabarchus stramineus</i>	JN988762.1	LBPV-14156
Characiformes	Characidae	<i>Piabina anhemi</i>	HM144049.1	LBP-20821
Characiformes	Characidae	<i>Planaltina myersi</i>	MK464051.1	CIUnB906 1
Characiformes	Characidae	<i>Psalidodon bockmanni</i>	KM897373.1	PDtaq36
Characiformes	Characidae	<i>Psalidodon fasciatus</i>	JN988731.1	LBPV-35867
Characiformes	Characidae	<i>Psalidodon paranae</i>	JN988736.1	LBPV-35972
Characiformes	Characidae	<i>Psalidodon schubarti</i>	JN988743.1	LBPV-31725
Characiformes	Serrasalminidae	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	GU701417.1	LBP-23806
Characiformes	Serrasalminidae	<i>Serrasalmus maculatus</i>	JN989228.1	LBPV-20168
Characiformes	Crenuchidae	<i>Characidium fasciatum</i>	MK464034.1	JCB28
Characiformes	Crenuchidae	<i>Characidium gomesi</i>	GU701425.1	LBP-33607
Characiformes	Crenuchidae	<i>Characidium oiticicai</i>	GU701447.1	LBP-31214

Characiformes	Crenuchidae	<i>Characidium schubarti</i>	GU701440.1	LBP-31492
Characiformes	Crenuchidae	<i>Characidium xanthopteron</i>	GU701835.1	LBP-34896
Characiformes	Crenuchidae	<i>Characidium zebra</i>	JN988789.1	LBPV-19561
Characiformes	Curimatidae	<i>Cyphocharax modestus</i>	GU701807.1	LBP-32086
Characiformes	Curimatidae	<i>Cyphocharax naegeliai</i>	JN988841.1	LBPV-31730
Characiformes	Curimatidae	<i>Cyphocharax vanderi</i>	GU701804.1	LBP-37591
Characiformes	Curimatidae	<i>Steindachnerina insculpta</i>	JN813066.1	St-ip05
Characiformes	Cynodontidae	<i>Rhaphiodon vulpinus</i>	GU701528.1	LBP-22942
Characiformes	Erythrinidae	<i>Hoplias intermedius</i>	JN988906.1	LBPV-21847
Characiformes	Parodontidae	<i>Apareiodon affinis</i>	JN988674	LBPV-25976
Characiformes	Parodontidae	<i>Apareiodon ibitiensis</i>	KM897614	PDtaq02
Characiformes	Parodontidae	<i>Parodon nasus</i>	GU701584.1	LBP-20439
Characiformes	Prochilodontidae	<i>Prochilodus lineatus</i>	JN989161.1	LBPV-26740
Gymnotiformes	Gymnotidae	<i>Gymnotus inaequilabiatus</i>	GU701781.1	LBP-34744
Gymnotiformes	Gymnotidae	<i>Gymnotus pantanal</i>	GU701777	LBP-31928
Gymnotiformes	Gymnotidae	<i>Gymnotus pantherinus</i>	GU701772	LBP-22562
Gymnotiformes	Gymnotidae	<i>Gymnotus sylvius</i>	GU701782	LBP-8831
Gymnotiformes	Sternopygidae	<i>Eigenmannia trilineata</i>	GU701797.1	LBP-24746
Gymnotiformes	Sternopygidae	<i>Eigenmannia virescens</i>	GU701793.1	LBP-17144
Gymnotiformes	Sternopygidae	<i>Sternopygus macrurus</i>	GU701499.1	LBP-17273
Siluriformes	Aspredinidae	<i>Bunocephalus larai</i>	MF489395.1	LBP11730 LBP5
Siluriformes	Auchenipteridae	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	GU701490	LBP-21934
Siluriformes	Callichthyidae	<i>Callichthys callichthys</i>	JN988768	LBPV-32364
Siluriformes	Callichthyidae	<i>Hoplosternum littorale</i>	KM897583	PDcon37
Siluriformes	Callichthyidae	<i>Aspidoras fuscoguttatus</i>	JN988691.1	LBPV-17399
Siluriformes	Callichthyidae	<i>Corydoras aeneus</i>	JN988813	LBPV-31945
Siluriformes	Callichthyidae	<i>Corydoras diffluviatilis</i>	GU701932.1	LBP-40008
Siluriformes	Callichthyidae	<i>Corydoras ehrhardti</i>	GU701816.1	LBP-32756
Siluriformes	Callichthyidae	<i>Corydoras flaveolus</i>	JN988816.1	LBPV-17226
Siluriformes	Callichthyidae	<i>Corydoras nattereri</i>	JN988819.1	LBPV-32331
Siluriformes	Callichthyidae	<i>Corydoras paleatus</i>	GU701811.1	LBP-36117
Siluriformes	Cetopsidae	<i>Cetopsis gobioides</i>	KM897213.1	PDcII82
Siluriformes	Heptapteridae	<i>Cetopsorhamdia iheringi</i>	GU701841.1	LBP-37806
Siluriformes	Heptapteridae	<i>Chasmocranus brachynemus</i>	GU701897.1	LBP-29948
Siluriformes	Heptapteridae	<i>Heptapterus multiradiatus</i>	GU701751.1	LBP-37224
Siluriformes	Heptapteridae	<i>Heptapterus mustelinus</i>	MK217377.1	UFRGS:17557
Siluriformes	Heptapteridae	<i>Imparfinis mirini</i>	GU701649.1	LBP-26417
Siluriformes	Heptapteridae	<i>Phenacorhamdia tenebrosa</i>	GU701578.1	LBP-32267
Siluriformes	Heptapteridae	<i>Phenacorhamdia unifasciata</i>	MK464077.1	CIUnB953 2
Siluriformes	Heptapteridae	<i>Pimelodella avanhandavae</i>	GU701574.1	LBP-31970
Siluriformes	Heptapteridae	<i>Pimelodella meeki</i>	JN989126.1	LBPV-9130

Siluriformes	Heptapteridae	<i>Rhamdia quelen</i>	GU701543.1	LBP-35807
Siluriformes	Heptapteridae	<i>Rhamdiopsis microcephala</i>	GU701539.1	LBP-29187
Siluriformes	Loricariidae	<i>Corumbataia britskii</i>	JN988808.1	LBPV-44923
Siluriformes	Loricariidae	<i>Corumbataia cuetae</i>	GU701821.1	LBP-18716
Siluriformes	Loricariidae	<i>Curculionichthys insperatus</i>	GU701748.1	LBP-13770
Siluriformes	Loricariidae	<i>Microlepidogaster dimorpha</i>	KM104457.1	LBP4854 25626
Siluriformes	Loricariidae	<i>Microlepidogaster longicolla</i>	MK464070.1	CIUnB942 1
Siluriformes	Loricariidae	<i>Pseudotocinclus tietensis</i>	JN089799	LBP2931 18994
Siluriformes	Loricariidae	<i>Ancistrus cirrhosus</i>	JN988666.1	LBPV-34759
Siluriformes	Loricariidae	<i>Hypostomus albopunctatus</i>	GU701731.1	LBP-29928
Siluriformes	Loricariidae	<i>Hypostomus ancistroides</i>	GU701725.1	LBP-25965
Siluriformes	Loricariidae	<i>Hypostomus heraldoi</i>	GU701708.1	LBP-20915
Siluriformes	Loricariidae	<i>Hypostomus hermanni</i>	GU701706.1	LBP-11275
Siluriformes	Loricariidae	<i>Hypostomus iheringii</i>	JN988942.1	LBPV-17214
Siluriformes	Loricariidae	<i>Hypostomus margaritifer</i>	JN988947.1	LBPV-16653
Siluriformes	Loricariidae	<i>Hypostomus microstomus</i>	GU701698	LBP-16652
Siluriformes	Loricariidae	<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	GU701688.1	LBP-35847
Siluriformes	Loricariidae	<i>Hypostomus paulinus</i>	GU701663.1	LBP-28428
Siluriformes	Loricariidae	<i>Hypostomus regani</i>	GU701679.1	LBP-35856
Siluriformes	Loricariidae	<i>Hypostomus strigaticeps</i>	GU701668.1	LBP-10982
Siluriformes	Loricariidae	<i>Megalancistrus parananus</i>	GU701875.1	LBP-36944
Siluriformes	Loricariidae	<i>Pterygoplichthys ambrosettii</i>	GU701547.1	LBP-26349
Siluriformes	Loricariidae	<i>Harttia gracilis</i>	GU701757.1	LBP-29822
Siluriformes	Loricariidae	<i>Loricaria lentiginosa</i>	GU701637.1	LBP-37206
Siluriformes	Loricariidae	<i>Proloricaria proluxa</i>	JN989166.1	LBPV-34924
Siluriformes	Loricariidae	<i>Rineloricaria latirostris</i>	GU701524.1	LBP-26333
Siluriformes	Loricariidae	<i>Rineloricaria pentamaculata</i>	GU701522.1	LBP-35402
Siluriformes	Loricariidae	<i>Pareiorhina carrancas</i>	GU701595.1	LBP-37564
Siluriformes	Loricariidae	<i>Neoplecostomus jaguari</i>	KT362737.1	LBP7467
Siluriformes	Loricariidae	<i>Rhinelepis aspera</i>	JN989193.1	LBPV-31974
Siluriformes	Pimelodidae	<i>Pimelodus maculatus</i>	KM897672	PDca1109
Siluriformes	Pimelodidae	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	GU701558.1	LBP-38169
Siluriformes	Pimelodidae	<i>Zungaro jahu</i>	GU701452.1	LBP-15141
Siluriformes	Pseudopimelodidae	<i>Pseudopimelodus mangurus</i>	GU701870	LBP-37227
Siluriformes	Trichomycteridae	<i>Cambeva davisii</i>	KR140343.1	MZUEL11805TD
Siluriformes	Trichomycteridae	<i>Cambeva diabola</i>	JN989257.1	LBPV-21297
Siluriformes	Trichomycteridae	<i>Cambeva iheringi</i>	GU701892	LBP-21759
Siluriformes	Trichomycteridae	<i>Cambeva paolence</i>	HM376398.1	LBP-36308
Siluriformes	Trichomycteridae	<i>Trichomycterus brasiliensis</i>	GU701479.1	LBP-31575
Siluriformes	Trichomycteridae	<i>Trichomycterus candidus</i>	KY857965.1	LBP11630
Siluriformes	Trichomycteridae	<i>Cambeva davisii</i>	KR140343.1	MZUEL11805TD
Siluriformes	Trichomycteridae	<i>Cambeva diabola</i>	JN989257.1	LBPV-21297

Siluriformes	Trichomycteridae	<i>Trichomycterus maracaya</i>	JN989264.1	LBPV-29276
Siluriformes	Trichomycteridae	<i>Trichomycterus mimonha</i>	GU701462.1	LBP-37829
Siluriformes	Trichomycteridae	<i>Trichomycterus pauciradiatus</i>	GU701958.1	LBP-18617
Siluriformes	Trichomycteridae	<i>Cambeva paolence</i>	HM376398.1	LBP-36308
Cyprinodontiformes	Poeciliidae	<i>Pamphorichthys hollandi</i>	GU701603.1	LBP-26440
Cyprinodontiformes	Poeciliidae	<i>Phalloceros harpagos</i>	GU701582.1	LBP-29984
Cyprinodontiformes	Poeciliidae	<i>Phalloceros reisi</i>	GU702168.1	LBP-9180
Cyprinodontiformes	Rivulidae	<i>Simpsonichthys boitonei</i>	MK464169.1	CIUnB1331 11
Cichliformes	Cichlidae	<i>Australoheros facetus</i>	JN988750	LBPV-43486
Cichliformes	Cichlidae	<i>Cichlasoma paranaense</i>	JN988803.1	LBPV-31795
Cichliformes	Cichlidae	<i>Crenicichla britskii</i>	GU701937.1	LBP-40271
Cichliformes	Cichlidae	<i>Crenicichla haroldoi</i>	JN988829.1	LBPV-31750
Cichliformes	Cichlidae	<i>Geophagus brasiliensis</i>	KM897636	PDapt07
Cichliformes	Cichlidae	<i>Geophagus iporangensis</i>		GBRM16746c

REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, A.A. et al. The high river Paran´a basin: limnological and ichthyological aspects. In: J. G., Tundisi, C. E. M. Bicudo, T. MatsumuraTundisi (Eds.), **Limnology in Brazil**, Brazilian Academy of Sciences/Brazilian Limnological Society, Rio de Janeiro, Brazil, pp. 59–103, 1995.

AGOSTINHO, A. A. et al. Fish diversity in the upper Paraná River basin: habitats, fisheries, management and conservation. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, v. 10, n. 2, p. 174–186, 8 jun. 2007.

AGOSTINHO, A. A. et al. The Upper Paraná river and its floodplain: main characteristics and perspectives for management and conservation. 7 nov. 2018.

ALBERT, J. S.; TAGLIACOLLO, V. A.; DAGOSTA, F. Diversification of Neotropical Freshwater Fishes. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 51, n. 1, p. 27–53, 2 nov. 2020.

ALVES, C. B. M. et al. AVANÇOS EM MÉTODOS DE COLETA DE PEIXES E CARACTERIZAÇÃO DE HABITAT DE RIACHOS TROPICAIS. **Oecologia Australis**, v. 25, n. 2, p. 265, 16 jun. 2021.

BANKS, J. C. et al. Detecting the pest fish, *Gambusia affinis* from environmental DNA in New Zealand: a comparison of methods. **New Zealand Journal of Zoology**, v. 48, n. 3–4, p. 202–216, 2 out. 2021.

BARNES, M. A.; TURNER, C. R. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. **Conservation Genetics**, v. 17, n. 1, p. 1–17, fev. 2016.

BASTOS, L. A.; FERREIRA, I. M. COMPOSIÇÕES FITOFISIONÔMICAS DO BIOMA CERRADO: estudo sobre o subsistema de Vereda. **Espaço em Revista**, v. 12, n. 1, 2010.

BESSEY, C. et al. Maximizing fish detection with eDNA metabarcoding. **Environmental DNA**, v. 2, n. 4, p. 493–504, out. 2020.

CILLEROS, Kévin et al. Unlocking biodiversity and conservation studies in high-diversity environments using environmental DNA (eDNA): A test with Guianese freshwater fishes. *Molecular ecology resources*, v. 19, n. 1, p. 27-46, 2019.

CRISTESCU, Melania E.; HEBERT, Paul DN. Uses and misuses of environmental DNA in biodiversity science and conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 49, n. 1, p. 209-230, 2018.

DA SILVA, J. M. C.; LACHER, T. E. Cerrado—South America. Em: **Encyclopedia of the World's Biomes**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 546–553.

DEINER, K. et al. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. **Biological Conservation**, v. 183, p. 53–63, mar. 2015.

EVANS, N. T.; LAMBERTI, G. A. Freshwater fisheries assessment using environmental DNA: A primer on the method, its potential, and shortcomings as a conservation tool. **Fisheries Research**, v. 197, p. 60–66, jan. 2018.

FRANÇOSO, R. D. et al. Habitat loss and the effectiveness of protected areas in the Cerrado Biodiversity Hotspot. **Natureza & Conservação**, v. 13, n. 1, p. 35–40, jan. 2015.

FERREIRA, C.P. et al. Stream biotic integrity assessed by fish assemblages in the Upper Rio Paraná basin. **Biota Neotrop**. Sep/Dec 2006 vol. 6, no. 3

GLEESON, D. Zoological applications for environmental DNA: detection, diversity, and health. **New Zealand Journal of Zoology**, v. 48, n. 3–4, p. 185–187, 2 out. 2021.

KUMAR, G.; EBLE, J. E.; GAITHER, M. R. A practical guide to sample preservation and pre-PCR processing of aquatic environmental DNA. **Molecular Ecology Resources**, v. 20, n. 1, p. 29–39, jan. 2020.

LANGEANI, F. et al. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 3, p. 181–197, 2007.

MEHINTO, A. C. et al. Applications for next-generation sequencing in fish ecotoxicogenomics. **Frontiers in Genetics**, v. 3, 2012

MIYA, M. Environmental DNA Metabarcoding: A Novel Method for Biodiversity Monitoring of Marine Fish Communities. **Annual Review of Marine Science**, v. 14, n. 1, p. annurev-marine-041421-082251, 3 jan. 2022.

ALBERT, J. S.; TAGLIACOLLO, V. A.; DAGOSTA, F. Diversification of Neotropical Freshwater Fishes. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 51, n. 1, p. 27–53, 2 nov. 2020.

BESSEY, C. et al. Maximizing fish detection with eDNA metabarcoding. **Environmental DNA**, v. 2, n. 4, p. 493–504, out. 2020.

FERREIRA, C. D. P.; CASATTI, L. Integridade biótica de um córrego na bacia do Alto Rio Paraná avaliada por meio da comunidade de peixes. **Biota Neotropica**, v. 6, n. 3, 2006.

LIZAMA, M. D. L. A. P.; AMBRÓSIO, A. M. Relação peso-comprimento e estrutura da população de nove espécies de Characidae na planície de inundação do Alto Rio Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 3, p. 779–788, 1999.

MEHINTO, A. C. et al. Applications for next-generation sequencing in fish ecotoxicogenomics. **Frontiers in Genetics**, v. 3, 2012.

QURAISHIA, S. F. et al. Molecular Characterization of Malaysian Marine Fish Species using Partial Sequence of Mitochondrial DNA 12S and 16S rRNA Markers. **Sains Malaysiana**, v. 44, n. 8, p. 1119–1123, 1 ago. 2015.