

## DNA BARCODING: UMA FERRAMENTA DE APOIO MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE PEIXES

Rafael Hencke Tresbach<sup>1</sup>; Natalia Menezes Cerqueira<sup>2</sup>; Sarah Ramos Medeiros<sup>3</sup>; Harold Julian Pérez Gutierrez<sup>4</sup>; Natalia Ossa Hernández<sup>5</sup>; Marília Danyelle Nunes Rodrigues<sup>6\*</sup>

SAP 10408      Data envio: 28/07/2014      Data do aceite: 10/12/2014  
Scientia Agraria Paranaensis – SAP;    ISSN: 1983-1471  
Marechal Cândido Rondon, v. 14, n. 2, abr./jun., p. 77-81, 2015

**RESUMO** - A identificação de gêneros e espécies é feita pela sistemática, observando-se caracteres morfológicos e anatômicos, os quais são a expressão do fenótipo. Entretanto, mudanças de uma ou mais bases em genes podem resultar em semelhanças fenotípicas entre espécies diferentes, levando a um erro de identificação. Como alternativa, surgiram ferramentas moleculares baseadas em genes ribossomais e mitocondriais. O presente trabalho tem como objetivo compilar informações sobre a identificação molecular e apresentar o caso do jundiá (*Rhamdia quelen*), no qual existem controvérsias geradas pela identificação taxonômica. Os diferentes genes utilizados para identificação apresentam suas peculiaridades, como inserções e deleções no caso do 16S rRNA e do 18S rRNA. Além destes genes ribossomais, há o uso de genes mitocondriais, como o gene do citocromo b, cuja problemática se concentra no desenho de primers, e o gene da subunidade 1 do citocromo C oxidase, sendo este último a melhor alternativa para identificação, gerando um Barcode genético. Estudos de DNA *barcoding* auxiliam na identificação de espécies em nível molecular, bem como, permitem estudos evolutivos em particular, no que tange a respeito da especiação, nos revelando mecanismos que podem ter contribuído para a adaptação nos mais diversos climas brasileiros.

**Palavras-chave:** DNA *barcoding*, peixes, *Rhamdia quelen*, COI, DNA mitocondrial, DNA ribossomal.

### *DNA barcoding: a molecular appliance for fish species identification support*

**ABSTRACT** - The identification of genus and species is made by systematic, by noticing morphological and anatomical characteres which were the phenotype expression. However, changes in one or more gene bases can result in phenotypes similarities between different species, inducing an identification error. Alternatively, molecular appliances based in mitochondrial and ribosomal genes appeared. This study aims to compile information about the molecular identification and present the South American Catfish (*Rhamdia quelen*) case, for which there is controversy generated by taxonomy identification. The different genes used to identification have their particularities, like insertions and deletions on the case of 16S rRNA and the 18S rRNA. Besides these ribosomal genes, mitochondrial genes are used, like the cytochrome b gene, whose problematic focused on the primer design, and the cytochrome C oxidase subunit 1 gene, which is the best option to make the identification, by generating a genetic barcode. DNA *barcoding* studies help on the molecular identification of species and allow evolutionary studies in special, regarding the speciation process, revealing mechanisms that may have contributed to the adaption in Brazilian different climates.

**Key words:** DNA *barcoding*, fishes, *Rhamdia quelen*, COI, mitochondrial DNA, ribosomal DNA.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia, Av. Antônio Trilha 1847, Centro, São Gabriel, RS. E-mail: [tresbach@gmail.com](mailto:tresbach@gmail.com)

<sup>2</sup>Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, Av. Antônio Trilha 1847, Centro, São Gabriel, RS. E-mail: [nati\\_354@hotmail.com](mailto:nati_354@hotmail.com)

<sup>3</sup>Prefeitura Municipal de Fortaleza, Secretaria Municipal de Educação, Rua Olegário Memória 1257, Sapiroanga, Fortaleza, CE. E-mail: [ramosarah@gmail.com](mailto:ramosarah@gmail.com)

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Laboratório de Engenharia Genética Animal (LEGA), Campus Universitário s/n, Caixa Postal 354, Centro, Capão do Leão, RS. E-mail: [hajupegu@gmail.com](mailto:hajupegu@gmail.com)

<sup>5</sup>Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Estação Marinha de Aquicultura (EMA-FURG), Caixa Postal 474, Cassino, Rio Grande, RS. E-mail: [natio.biologia@gmail.com](mailto:natio.biologia@gmail.com)

<sup>6</sup>Doutora em Ciências: Melhoramento Genético Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica Rua Ramiro Barcelos de 2002 ao fim, lado par, Rio Branco, Porto Alegre, RS. E-mail: [nunes.mdnunes@gmail.com](mailto:nunes.mdnunes@gmail.com). \*Autor para correspondência

## INTRODUÇÃO

A sistemática é uma área de estudo que nos permite identificar gêneros e espécies através da observação de características morfológicas e anatômicas, as quais são o resultado da manifestação dos genes – o fenótipo. Entretanto, há espécies diferentes que apresentam fenótipos semelhantes – devido à manifestação gênica que também depende da interação com o ambiente e que pode acarretar em uma característica semelhante entre espécies diferentes, as quais podem possuir diferenças sutis ou não naqueles genes (MANCEAU et al., 2010; VANHAECKE et al., 2012).

O sistema de identificação molecular por Barcode genético foi proposto por Hebert et al. (2003). A técnica de DNA barcoding é uma ferramenta de apoio molecular à sistemática, baseando-se na sequência do gene COI localizado no DNA mitocondrial, sendo um sistema “bioidentificador”, semelhante aos códigos de barras universais (CARVALHO et al., 2008).

Alguns conceitos empíricos sobre o Barcode em trabalhos com invertebrados (HEBERT et al., 2004), pássaros (HOGG; HEBERT, 2004) e peixes (WARD et al., 2005), apresentam controvérsias na efetividade desse sistema de identificação genética (MORITZ; CICERO 2004). Para que haja uma efetividade da técnica de Barcode, as sequências de DNA dentro de uma mesma espécie precisam apresentar maior similaridade do que entre espécies (HURST; JIGGINS, 2005). Em estudos recentes esta é a situação mais comum, embora existam exceções. Em híbridos, por exemplo, isso pode gerar dúvidas taxonômicas, devido ao fato de que o mtDNA tem origem apenas materna (CARVALHO et al., 2008).

Devido a algumas dúvidas taxonômicas e outros problemas de identificação de espécies, a análise de genes ou seus produtos funcionais (RNAs, proteínas), são uma alternativa a se considerar para reforçar a identificação pela sistemática clássica.

Em peixes, a identificação é de extrema importância, até mesmo econômica; tanto em ovos, alevinos, adultos e seus produtos; proporciona a detecção de fraude ou substituição de espécies em operações comerciais (SMITH et al., 2008). A correta identificação permite a assistência na sustentabilidade; no manejo da pesca a longo prazo (METCALF et al., 2007); auxilia a pesquisa, visando a conservação de espécies em risco (CARVALHO et al., 2008); e auxilia na solução de algumas dúvidas taxonômicas como é o caso do gênero *Rhamdia* e de tantos outros.

O presente trabalho tem por objetivo a revisão de um método de apoio molecular para a sistemática clássica envolvida na identificação de peixes, o DNA barcoding.

Com a necessidade de concentrar as informações sobre identificação através da técnica de DNA barcoding, encontra-se a necessidade de traçar um panorama dos diferentes genes envolvidos na técnica, para que possam ser traçadas alternativas para estudos futuros, especialmente em espécies do gênero *Rhamdia*.

A identificação molecular de espécies pode ser efetuada de diversas maneiras, cada uma delas possuindo

seus prós e contras. Com o advento das tecnologias que permitem trabalhar com o DNA, como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), novas portas foram abertas: a identificação de espécies pelo DNA ribossomal e após, pelo DNA mitocondrial.

### DNA ribossomal

O gene do 16S rRNA também pode ser utilizado como marcador, embora Zhang et al. (2012) relatem que há grande quantidade de inserções e deleções na sequência deste gene, o que resulta em uma identificação problemática, em alguns táxons estas sequências são conservadas. Os autores também relatam que encontram tal problema no gene 18S rRNA.

Kochzius et al. (2010) afirmam que ambos os marcadores ajudaram na identificação por barcode, mas foi encontrada algumas limitações no uso deles, como diferenças nas distâncias genéticas p, apresentando diferenças nas variações genéticas intra e entre-espécies, com sobreposições maiores obtidas com o marcador 16S. Além disso, no mesmo marcador, existem limitações para separar algumas espécies de peixes, enquanto o COI separa-as claramente. Uma explicação para tal falta de resolução no caso do 16S, é a baixa taxa de mutação.

### DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial apresenta como vantagem, o fato de ser haplóide e a transmissão geralmente ser materna com ausência de recombinação gênica, tornando-o menos diferenciado entre indivíduos da mesma espécie. A estrutura do DNA é circular dupla fita, sendo fechado e compacto, não apresentando macromutações – sua evolução é cerca de 10 vezes mais rápida que a de genes nucleares de cópia única. Esta taxa permite que haja uma maior chance de serem gerados marcadores espécie-específicos, o que torna este DNA excelente para a técnica de DNA barcoding.

Outra vantagem é a abundância de DNA mitocondrial, devido à presença em vários tecidos, necessita de amostras pequenas ou até mesmo degradadas (KOSMANN, 2009). A partir desse DNA pode ser realizado o sequenciamento da região mitocondrial, o qual geralmente utiliza-se a região que codifica para a Citocromo C oxidase subunidade I (COI, também chamado de COX1 ou MT-CO1; HGNC:7419) (ZEHNER et al., 2004; WEELS et al., 2007; WEELS; STEVENS, 2008). Este gene apresenta algumas vantagens como iniciadores universais que são fortes, recuperáveis, ou seja, são bem estabelecidos em vários filões de animais e também apresenta uma maior variação de sinal filogenético em relação aos outros genes. Além disso, ele é rodeado por sequências conservadas, o que permite isolá-lo e estudá-lo através destes iniciadores universais (KOSMANN, 2009).

Rosso et al. (2012) afirmam que, apesar de encontrarem mutações (principalmente inserções e deleções) nos genes do COI, os marcadores genéticos desta sequência são funcionais, detectando também espécies diferentes com haplótipos de códigos de barras, bem como, clusters coesivos de haplótipos relacionados

(como raios da nadadeira anal, comprimento da barbatana anal e escalas de linha lateral). Observaram também que grupos de espécies como *R. quelen*, *Hoplias malabaricus*, entre outros, apresentaram divergência superior a 3% em amostras de exemplares estudadas provenientes de regiões diferentes da América do Sul. Isso nos sugere que há erros na identificação morfológica dos exemplares estudados, cujos dados não conferem quando se compara estes resultados com análises moleculares.

Além do gene COI, outro gene mitocondrial utilizado como marcador molecular é o cyt b (citocromo b). Zhang et al. (2012) relatam que este gene possui um nível elevado de variações na sequência de seu gene e isso apresenta um obstáculo na hora de desenhar primers universais, principalmente pela presença de inserções e deleções na sequência, o que pode acarretar em identificação errônea, bem como, não aplicação a nível amplo do primer. A conservação da região que será utilizada para o desenho do primer é importante para que este tenha fidedignidade na hora de utilizá-lo a nível global e consequentemente, obtenção de um alcance maior na mesma espécie.

Segundo Rosso et al. (2012), geograficamente falando, podem-se encontrar diferentes linhagens genéticas com divergência em nível de espécie, espécies semelhantes em nível taxonômico, mascarando populações isoladas. Tal premissa justifica a necessidade do estudo em nível geográfico e taxonômico, o mais completo possível. Através do DNA barcoding, Rosso e colaboradores observaram divergências genéticas profundas, principalmente devido à localização geográfica das espécies estudadas, as quais atribuíram explicação parcial de isolamento reprodutivo de algumas populações. Em algumas espécies, observaram-se também linhagens exclusivas em algumas bacias, sendo que, ao isolar-se reprodutivamente, estas espécies imitaram espécies de outro gênero, demonstrando evolução, principalmente na imitação de padrões de cores (CARVALHO et al., 2011). Essas informações destacam uma forte estrutura geográfica em sequências do COI, revelando que tal barreira física não é um impedimento para a aplicação desta técnica (ROSSO et al., 2012).

A identificação por barcode utilizando a sequência do COI é capaz de fornecer a distribuição da divergência genética das espécies (PEREIRA et al., 2013).

Para auxiliar melhor nas descobertas sobre o DNA barcoding, foi desenvolvido o *Barcode of Life Data Systems* (BOLD), uma ferramenta bioinformática aonde foi compilado os dados, suportando desde a coleta do espécime à validação da sequência deste como barcode. Esta ferramenta comporta as sequências e analisa os dados obtidos, sendo também um veículo de colaboração entre diversos grupos de pesquisa do mundo, permitindo um fácil acesso a diversas informações, obtidas dos mais diversos laboratórios de pesquisa. Critérios como nome da espécie, dados da instituição que detêm o material testemunho, dados da coleta, sequência de COI com os iniciadores usados na PCR e eletroferogramas são necessários para que aquele espécime obtenha a classificação de barcode (KOSMANN, 2009).

Além do banco de dados BOLD, existe também o FISH-BOL (*The Fish Barcode of Life Initiative*), cujo objetivo é se tornar uma biblioteca referência de sequências de todas as espécies de peixes a partir da identificação por barcode. O banco de dados além de validar as sequências de barcode de peixes, armazena dados como localização geográfica, imagens e outros dos espécimes examinados. Este banco também visa complementar outros bancos de dados existentes, como o *Catalog of Fishes* e o *FishBase*. No FISH-BOL, apenas duas espécies do gênero *Rhamdia* possuem barcode, a *R. quelen* e a *R. parryi* (Disponível em: <[http://www.fishbol.org/progress\\_reports.php?region=1&vl=genus&type=Rhamdia](http://www.fishbol.org/progress_reports.php?region=1&vl=genus&type=Rhamdia)>. Acessado em janeiro de 2015).

Barreiras como baixa diversidade gênica de alguns grupos em suas sequências, espécimes que divergiram recentemente, detecção de híbridos e pseudogenes nucleares (Numts) devem ser vencidos para que a aplicação da técnica obtenha alto sucesso. Para a identificação de anomalias nas sequências de barcode obtidas, além de sequências de baixa qualidade, o BOLD e o FISH-BOL são ferramentas de extrema importância, pois todas as sequências ali inseridas são traduzidas para aminoácidos e comparadas com a proteína do COI, visando confirmar a origem. Feito isso, é buscado sequências de parada (stop códons – detecção de possíveis pseudogenes) e contaminantes (sequências de outros organismos). Na detecção destes, o pesquisador é contatado e a sequência fica marcada, necessitando de revisão para aumentar a confiabilidade desta (KOSMANN, 2009).

Segundo Ward et al. (2005), trabalhando com peixes uma região de 655 pb da COI foi sequenciada, utilizando-se múltiplas amostras e com isto, gerou-se 754 sequências. Os autores concluem que o sequenciamento da região do gene COI pode ser utilizado como uma sequência de Barcode, possibilitando assim a identificação de espécies a nível molecular. Futuramente, esperam-se colaborações de modo a enriquecer os bancos de dados existentes, com sequências que permitam identificar uma gama maior de espécies de peixes. É salientado também o fato de que espécies distintas podem ter sequência de COI idêntica ou com alta semelhança, o que sugere uma possível fusão entre espécies. Casos desta natureza exigirão a união de profissionais da área molecular e taxonômica, visando identificar e resolver este problema (WARD et al., 2005).

Carvalho et al. (2008) utilizaram a técnica de DNA barcoding para a identificação de *Surubim* (*Pseudoplatystoma* spp.). Os autores salientam que a utilização de marcadores de mtDNA para híbridos apresenta limitações, mas pode ser utilizada para indicação de pureza; sendo observado que surubins ditos puros na verdade eram híbridos e o uso do mtDNA serviu para indicar a origem materna dos peixes híbridos.

O gênero *Rhamdia* apresenta duas espécies com barcode no FISHBOL, dentre as 20 espécies-alvo presentes no referido banco de dados. Já no BOLD, há 48 registros para o gênero *Rhamdia*, os quais representam três

espécies apenas. Para *R. quelen*, há 31 registros disponíveis neste banco de dados, o que indica que há apenas 17 registros de outras duas espécies. Do Brasil, há 14 registros de espécies denominadas *R. quelen*, havendo também ocorrência para espécies da Argentina, Guatemala e do México (Disponível em: <<http://www.boldsystems.org>>. Acessado em janeiro de 2015). Apesar de existirem registros de barcode para *R. quelen*, ainda não há aplicabilidade desta ferramenta a nível global e sobretudo, comercial.

Dentro dos peixes que englobam o gênero *Rhamdia*, o maior problema está na controvérsia gerada pela identificação taxonômica destes. Atualmente, *R. quelen* é uma espécie utilizada para nomear pelo menos outras 47 espécies do mesmo gênero e há autores que afirmam, baseado na análise cromossômica, que há um conjunto de espécies englobadas dentro de apenas uma só (GARCIA et al., 2010). Inclusive, esta espécie é a única que está amplamente distribuída em praticamente todas as bacias hidrográficas brasileiras. Os autores também sugerem uma revisão taxonômica detalhada, concordando com GARCIA et al. (2010), no que diz respeito a existência de um complexo de espécies. (MARTINEZ et al., 2011).

## CONCLUSÕES

Até o momento, uma grande variedade de métodos vem sendo utilizada para a identificação de espécies de peixes. O Barcode, técnica universal de identificação genética de espécies, é uma delas e tem sido aplicada em todo o mundo, com pelo menos 10769 espécies analisadas (Fish-Bol - <http://www.fishbol.org/> acessado em dezembro de 2014).

A identificação em nível molecular através da técnica de código de barras de DNA se mostra uma excelente opção para confirmar a sistemática clássica, principalmente em espécies de difícil identificação por meio da observação de características morfológicas. Padronizar estas técnicas auxilia na confiabilidade, além da diminuição de custos.

É observado que em estudos envolvendo a técnica de Barcode, há resultados positivos, principalmente em casos de gêneros cuja taxonomia pode ser duvidosa, como em algumas espécies de peixes, destacando-se as do gênero *Rhamdia*. Paralelamente, esta técnica pode fornecer outras informações, como divergências genéticas entre espécies geograficamente distintas, revelando mecanismos de manutenção de populações.

Mesmo que o estudo do barcode em um gênero não revele dados capazes de discriminar as espécies, é interessante estudar a divergência genética destas, comparando-se sequências de espécies similares em bancos de dados, principalmente no que tange ao ambiente. Comparações de populações a partir de dados obtidos *in silico* e *in vitro* podem revelar mecanismos de especiação ainda desconhecidos, os quais podem ter contribuído para a adaptação das espécies nos mais diversos climas brasileiros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, D.C. de; SEERIG, A.; MELO, D.C. de; SOUSA, A.B. de; PIMENTA, D.; OLIVEIRA, D.A.A. Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.). **Revista Brasileira De Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.215-219, 2008.
- CARVALHO, D.C. de; OLIVEIRA, D.A.A.; POMPEU, P.S.; LEAL, C.G.; OLIVEIRA, C.; HANNER, R. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. **Mitochondrial DNA**, v.22, n.S1, p.80-86, 2011.
- GARCIA, C.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Karyotypic evolution trends in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) with considerations about the origin and differentiation of its supernumerary chromosomes. **Genetics and Molecular Research**, v.9, n.1, p.365-384, 2010.
- HEBERT, P.D.N.; PENTON, E.H.; BURNS, J.M.; JANZEN, D.H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.41, n.101, p.14812-14812, 2004.
- HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; e DEWAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.270, n.1512, p.313-321, 2003.
- HOCHBERG, V.B.M.; ERDTMANN, B. Cytogenetical and Morphological considerations on *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae) – the occurrence of B chromosomes and polymorphic NOR regions. **Brazilian Journal of Genetics**, v.11, n.3, p.563-576, 1988.
- HOGG, I.D.; HEBERT, P.D.N. Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. **Canadian Journal of Zoology**, v.82, n.5, p.794-754, 2004.
- HURST, G.D.D.; HIGGINS, F.M. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. **Proceedings of the Royal Society**, v.272, n.1572, p.1525-1534, 2005.
- KOCHZIUS, M.; SEIDEL, C.; ANTONIOU, A.; BOTLA, S.K.; CAMPO, D.; CARIANI, A.; VAZQUEZ, E.G.; HAUSCHILD, J.; HERVET, C.; HJÖRLEIFSDOTTIR, S.; HREGGVIDSSON, G.; KAPPEL, K.; LANDI, M.; MASOUGLAS, A.; MARTEINSSON, V.; NÖLTE, M.; PLANES, S.; TINTI, F.; TURAN, C.; VENUGOPAL, M.N.; WEBER, H.; DIETMAR, B. Identifying Fishes through DNA barcodes and microarrays. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. 1-15, 2010.
- KOSMANN, C. **Código de barras (DNA barcode) de dípteros de interesse forense**. 2009. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Entomologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- MANCEAU, M.; DOMINGUES, V.S.; LINNEN, C. R.; ROSENBLUM, E.B.; HOEKSTRA, H.E. Convergence in pigmentation at multiple levels: mutations, genes and function. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v.365, n.1552, p.2439-2450, 2010.
- MARTINEZ, J.F.; LUI, R.L.; BLANCO, D.R.; TRALDI, J.B.; SILVA, L.F.; VENERE, P.C.; SOUZA, I.L.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics of three populations from the *Rhamdia quelen* species complex (Siluriformes, Heptapteridae) in two Brazilian hydrographic basins. **Caryologia**, v.64, n.1, p.121-128, 2011.
- METCALF, J.L.; PRITCHARD, V.L.; SILVESTRI, S.M.; JENKINS, J.B.; WOOD, J.S.; COWLEY, D.E.; EVANS, R.P.; SHIOZAWA, D.K.; MARTIN, A.P. Across the great divide: genetic forensics reveals misidentification of endangered cutthroat trout populations. **Molecular Ecology**, v.16, n.21, p.4445-4454, 2007.
- MORITZ, C.; CICERO, C. DNA Barcoding Promise and Pitfalls. **PLoS Biology**, v.2, n.10, p.1529-1531, 2004.
- PEREIRA, L.H.G.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics**, v.14, n.20, p.1-14.
- ROSSO, J.J.; MABRAGAÑA, E.; CASTRO, M.C.; ASTAROLA, J.M.D. de. DNA barcoding Neotropical fishes: recent advances from the Pampa Plain, Argentina. **Molecular Ecology Research**, v.12, n.6, p.999-1011, 2012.

- SMITH, P.J.; MCVEAGH, S.M.; STEINKE, D. DNA barcoding for the identification of smoked fish products. **Journal of Fish Biology**, v.72, n.2, p.464-471, 2008.
- VANHAECKE, D.; LEANIZ, C.G. de; GAJARDO, G.; YOUNG, K.; SANZANA, J.; ORELLANA, G.; FOWLER, D.; HOWES, P.; MONZON-ARGUELLO, K.; CONSUEGRA, S. DNA barcoding and microsatellites help species delimitation and hybrid identification in endangered Galaxiid fishes. **PLoS One**, v.7, n.3, p.1-10, 2012.
- WARD, R.D.; ZEMLAK, T.S.; BRONWYN, H.I.; LAST, P.R.; e HEBERT, P.D.N. DNA barcoding Australia's fish especies. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v.360, v.1462, p.1847-1857, 2005.
- WELLS, J.D.; WALL, R.; STEVENS, J.R. Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase I sequence: a cautionary tale for forensic species determination. **International Journal of Legal Medicine**, v.121, n.3, p.229-233, 2007.
- WEELS, J.D.; STEVENS, J.R. Application of DNA-Based Methods in Forensic Entomology. **Annual Reviews of Entomology**, v.53, p.103-120, 2008.
- ZHANG, J.; HANNER, R. Molecular approach to the identification of Fish in the South China Sea. **PLoS One**, v.7, n.2, p.1-9, 2007.
- ZEHNER, R.; AMENDT, J.; SCHÜTT, S.; SAUER, J.; KRETTEK, R.; POVOLNÝ, D. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). **International Journal of Legal Medicine**, v. 118, n.4, p.245-247, 2004.